UNIVERSITÄT FÜR BODENKULTUR WIEN

Masterarbeit

Auswirkungen von Mikroplastik auf die Regenwurmarten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*

verfasst von

Lukas ZISSER, BSc, BSc

im Rahmen des Masterstudiums

Umwelt- und Bioressourcenmanagement

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieur

Wien, März 2022

Betreut von:
Univ.Prof.in DIin Dr.in Marion Huber-Humer
Institut für Abfallwirtschaft
Department für Wasser-Atmosphäre-Umwelt

Danksagung

Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die mich während meiner Studien begleitet haben. Für die Unterstützung und die gemeinsame Zeit.

Mein Dank gilt den Betreuer*innen meiner Masterarbeit, Frau Univ.Prof.in DIin Dr.in Marion Huber-Humer, Assoc. Prof. Dr. Johann Zaller sowie Mag. Dr. Christian Zafiu.

Besonderer Dank gebührt hierbei Christian. Er hat mich während der gesamten Dauer der Arbeit, von der Planung über die Durchführung bis zur Auswertung der Daten, mit seiner Expertise und seinen Inputs unterstützt.

Außerdem möchte ich mich recht herzlich bei Ing. Thomas Ebner bedanken. Er hat mich im Labor eingeschult und war mir mit seinem Wissen bei allen Versuchen behilflich.

Für die Bereitstellung der Regenwürmer bedanke ich mich bei der Vermigrand Naturprodukte GmbH. Für die Bereitstellung von Salat bedanke ich mich bei der Billa Plus Filiale Muthgasse.

Vielen Dank auch an meine Kollegin Susanna Vonbank. Ohne sie wäre die Arbeit am Institut für Abfallwirtschaft nicht dieselbe gewesen.

Des Weiteren möchte ich Clarissa vo Au für ihre Vorarbeit danken.

Ebenso bedanke ich mich bei Elke Studer für ihre wertvollen Tipps.

Auch meinen Eltern, Gabriele und Karl, gebührt mein Dank, weil sie mir meine Studien erst ermöglicht haben und mir stets zur Seite stehen.

Abschließend will ich noch meiner Verlobten Tensin Studer für ihre Unterstützung danken.

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

In den letzten Jahrzehnten ist die Menge an produzierten Kunststoffen deutlich angestiegen. Durch unsachgerechte Entsorgung gelangen immer mehr Kunststoffe unkontrolliert in die Umwelt und damit steigt auch die Mikroplastik-Belastung an Land sowie im Meer an. Während die Auswirkungen von Mikroplastik auf aquatische Systeme bereits seit Jahrzehnten erforscht werden, sind die Auswirkungen von Mikroplastik auf terrestrische Systeme erst im letzten Jahrzehnt intensiver untersucht worden. Besonders oft wurden dabei die Auswirkungen von Polyethylen-Mikroplastik auf Regenwürmer untersucht. Im Zuge dieser Arbeit wurden erstmals die Auswirkungen von Polyethylenterephthalat, Polyvinylchlorid und Polypropylen in den Größenfraktionen >630, 630-200, 200-63 und <63 µm sowie in verschiedenen Konzentrationen (0,001-1,0%) auf Wachstum, Reproduktion und Mortalität der Regenwurmarten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* untersucht. Nach der Untersuchungsperiode von 28 Tagen wurden signifikante Auswirkungen auf das Wachstum festgestellt, jedoch nicht auf Mortalität und Reproduktion. Bei Polyvinylchlorid hat die Größenfraktion 200-63 µm ein signifikant niedrigeres Wachstum verursacht. Bei Polypropylen hat die Konzentration 0,1 % der Größenfraktion 200-63 µm ein signifikant niedrigeres Wachstum verursacht. In dieser Arbeit konnte erstmals beobachtet werden, dass Würmer Polypropylen-Mikroplastik >630, 630-200 und 200-63 µm in tiefere Substratschichten transportieren. Ebenso konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Würmer Polyvinylchlorid-Mikroplastik 630-200 und 200-63 µm aufnehmen. Eine Zerkleinerung von Mikroplastik durch Würmer konnte mit der angewandten Methode nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen signifikante Unterschiede in den Auswirkungen verschiedener Arten, Größen sowie Konzentrationen von Mikroplastik auf Regenwürmer und sollten Anstoß für weitere Forschung sein.

Abstract

In recent decades, the amount of plastics produced has increased significantly. Due to improper disposal, more and more plastics are being released into the environment in an uncontrolled manner, resulting in an increase in microplastic pollution on land and in the sea. While the effects of microplastics on aquatic systems have been researched for decades, the effects of microplastics on terrestrial systems have only been studied more intensively in the last decade. In particular, the effects of polyethylene microplastics on earthworms have often been studied. In the course of this work, the effects of polyethylene terephthalate, polyvinyl chloride and polypropylene in different size fractions >630, 630-200, 200-63 and <63 µm and concentrations (0.001-1.0%) on growth, reproduction and mortality of earthworm species *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* were studied for the first time. After the study period of 28 days, significant effects on growth were found, but not on mortality and reproduction. In polyvinyl chloride, the size fraction 200-63 µm caused significantly reduced growth. In polypropylene, the concentration 0.1% of the size fraction 200-63 µm caused significantly reduced growth. This work has observed for the first time that worms transport polypropylene microplastics >630, 630-200 and 200-63 µm to deeper substrate layers. Similarly, it was demonstrated for the first time that worms ingest polyvinyl chloride microplastics 630-200 and 200-63 µm. The applied research method could not demonstrate the disintegration of microplastics by worms. The results of the analysis show significant differences in the effects of different types, sizes as well as concentrations of microplastics on earthworms and should be an impetus for further research.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Ziel und Forschungsfragen der Arbeit 2

1.2 Aufbau der Arbeit 2

2. Stand des Wissens 3

2.1 Mikroplastik 3

2.1.1 Globale und europäische Kunststoffproduktion 3

2.1.2 Mikroplastik in terrestrischen Systemen 6

2.2 Regenwürmer 8

2.2.1 Vermikompostierung in Kombination mit Kompostierung 9

2.2.2 *Eisenia fetida* (Savigny) und *Eisenia andrei* (Bouché) 10

2.3 Auswirkungen von Mikroplastik auf Regenwürmer 12

2.3.1 Aufnahme und Transport von Mikroplastik durch Regenwürmer 12

2.3.2 Reduktion und Meidung von Mikroplastik durch Regenwürmer 13

2.3.3 Auswirkungen von Mikroplastik auf die Reproduktion von Regenwürmern 14

2.3.4 Auswirkungen von Mikroplastik auf Mortalität und Wachstum von Regenwürmern 14

3. Material und Methode 18

3.1 Versuchsaufbau 18

3.2 Versuchsreaktoren 18

3.2.1 1. Versuchsansatz 18

3.2.2 2. Versuchsansatz 19

3.2.3 3. Versuchsansatz 19

3.3 Substrat 20

3.4 Mikroplastik 21

3.4.1 Herstellung der Partikelgrößen 21

3.4.2 Mikroplastik-Konzentrationen 22

3.4.3 Bestimmung mittels ATR-FTIR-Spektroskopie 23

3.5 Stereomikroskopische Untersuchungen 24

3.5.1 Charakterisierung Polyethylenterephthalat 25

3.5.2 Charakterisierung Polyvinylchlorid 26

3.5.3 Charakterisierung Polypropylen 27

3.5.4 Charakterisierung Quarzsand 28

3.6 Würmer 28

3.7 Pflege und Kontrolle 29

3.8 Analyse der Wurmparameter 30

- Reproduktion der Würmer 30
- Mortalität der Würmer 30
- Wachstum der Würmer 30

3.8.1 Statistische Auswertung 31

3.9 Untersuchungen des Mikroplastiks 31

3.9.1 Entwicklung eines Verfahrens 31

3.9.2 Verfahren zur Auflösung der Würmer 33

3.9.3 ATR-FTIR Analyse 33

3.10 Untersuchungen des Substrats 34

3.10.1 Wassergehalt 34

3.10.2 pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit 34

3.10.3 Glühverlust 34

3.10.4 Gesamter organischer Kohlenstoff, Gesamtstickstoff und -kohlenstoff 35

3.10.5 Nitratstickstoff 35
3.10.6 Ammoniumstickstoff 36
4. Ergebnisse 37
4.1 Auswirkungen von Polyethylenterephthalat 37
4.1.1 Mortalität 37
4.1.2 Reproduktion 37
4.1.3 Wachstum 37
4.2 Auswirkungen von Polyvinylchlorid 37
4.2.1 Mortalität 37
4.2.2 Reproduktion 38
4.2.3 Wachstum 38
4.3 Auswirkungen von Polypropylen 40
4.3.1 Mortalität 40
4.3.2 Reproduktion 40
4.3.3 Wachstum 40
4.4 Beobachtungen bei den Versuchsansätzen 43
4.4.1 Transport von Mikroplastik durch Würmer 43
4.4.2 Abgetrennte Wurmsegmente 43
4.5 Untersuchungen des Mikroplastiks 44
4.5.1 Auflösung in der Mikrowelle MARS 6 44
4.5.2 Analyse durch ATR-FTIR 45
4.6 Veränderungen des Substrats 47
4.6.1 Wassergehalt 47
4.6.2 Glühverlust 47
4.6.3 Gesamter organischer Kohlenstoff, Gesamtstickstoff und Gesamtkohlenstoff 47
5. Diskussion 48
5.1 Auswirkungen auf Mortalität, Reproduktion und Wachstum 48
5.2 Auswirkungen der Mikroplastik-Größenfraktionen 49
5.3 Auswirkungen der Mikroplastik-Konzentration 50
5.4 Einfluss von Würmern auf Mikroplastik 50
6. Schlussfolgerungen und Ausblick 52
Literaturverzeichnis 54
Anhang 60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Produktionsmenge von Kunststoffen weltweit und in Europa von 1950 bis 2019 (Statista, 2022) 4

Abbildung 2: Anteil nachgefragter Kunststoffe im Jahr 2019 für EU28+NO/CH (PlasticsEurope, 2020) 5

Abbildung 3: Kunststoffnachfrage in Europa (EU28+NO/CH) im Jahr 2019 nach Segmenten (PlasticsEurope, 2020) 5

Abbildung 4: Globale Produktion, Verwendung und Entsorgung von Kunststoffen von 1950 bis 2015 in Millionen Tonnen (Eigene Darstellung nach Geyer et al., 2017) 6

Abbildung 5: Versuchsreaktoren im 1. Versuchsansatz, links und Mitte: Versuchsreaktoren beim Beginn des 1. Versuchsansatzes mit und ohne Alufolie (beide Clarissa von Au, rechts: Weiterentwickelter Versuchsreaktor (Eigene Aufnahme) 19

Abbildung 6: Versuchsreaktoren im 2. Versuchsansatz (Eigene Aufnahmen) 19

Abbildung 7: Versuchsreaktoren im 3. Versuchsansatz, drei verschiedene Versuchsreaktoren (Eigene Aufnahmen) 20

Abbildung 8: Mischung und Einwaage des Substrats samt Mikroplastik (Eigene Aufnahmen) 20

Abbildung 9: Die verschiedenen Ausgangsmaterialien für die Versuche, von links nach rechts: PET (Clarissa von Au), PVC sowie 2x PP (Eigene Aufnahmen) 21

Abbildung 10: links: Schneidmühle Retsch SM 2000; rechts: Zentrifugalmühle Retsch ZM 200 (Eigene Aufnahmen) 21

Abbildung 11: Mikroplastik (PP) nach der Zerkleinerung in der Zentrifugalmühle (Eigene Aufnahmen) 22

Abbildung 12: links: Siebturm auf Rüttelplatte; rechts: Filtration nach Nasssiebung (Eigene Aufnahme) 22

Abbildung 13: Mit PET-MP versetztes Substrat (Clarissa von Au) 23

Abbildung 14: Infrarotspektrum des untersuchten PET 23

Abbildung 15: Infrarotspektrum des untersuchten PVC 24

Abbildung 16: Infrarotspektrum des untersuchten PP 24

Abbildung 17: PET-MP der Größenfraktion >630 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen) 25

Abbildung 18: PET-MP der Größenfraktion 630-200 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen) 25

Abbildung 19: PET-MP der Größenfraktion 200-63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen) 25

Abbildung 20: PET-MP der Größenfraktion <63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen) 25

Abbildung 21: PVC-MP der Größenfraktion >630 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen) 26

Abbildung 22: PVC-MP der Größenfraktion 630-200 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen).....26

Abbildung 23: PVC-MP der Größenfraktion 200-63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen).....26

Abbildung 24: PVC-MP der Größenfraktion <63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen).....26

Abbildung 25: PP-MP der Größenfraktion >630 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen).....27

Abbildung 26: PP-MP der Größenfraktion 630-200 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen).....27

Abbildung 27: PP-MP der Größenfraktion 200-63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen.....27

Abbildung 28: PP-MP der Größenfraktion <63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen).....28

Abbildung 29: Quarzsand der Größenfraktion 300-60 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen).....28

Abbildung 30: links und Mitte: Bilder von der Vermigrand Naturprodukte GmbH, rechts: Regenwürmer vor dem Einsetzen in den Versuchsreaktor (Eigene Aufnahmen) 28

Abbildung 31: Salat als Futter der Würmer (Eigene Aufnahmen).....29

Abbildung 32: Mikroplastik (PP) mit Salat gemischt, 3. Versuchsansatz (Eigene Aufnahmen).....30

Abbildung 33: links: MP in den Glasphiolen; rechts: MARS 6 Mikrowelle (Eigene Aufnahmen).....31

Abbildung 34: links: gefrorene Wurmproben; rechts: Gefriertrockner Cryodos von TelStar (Eigene Aufnahmen).....33

Abbildung 35: Glühverlust, v. l. n. r.: Einwaage der Proben, Abkühlen im Exsikkator und Muffelofen (Eigene Aufnahmen).....34

Abbildung 36:Abbildung 36: Gerät vario MAX CNS der Firma Elementar (Eigene Aufnahme).....35

Abbildung 37: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Veränderung der Einzelwurmmasse sowie der prozentuellen Zunahme der Einzelwurmmasse bei PVC nach Größenfraktionen: 39

Abbildung 38: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Veränderung der Einzelwurmmasse sowie der prozentuellen Zunahme der Einzelwurmmasse bei PVC nach Konzentrationen: 40

Abbildung 39: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Veränderung der Einzelwurmmasse sowie der prozentuellen Zunahme der Einzelwurmmasse bei PP nach Größenfraktionen: 41

Abbildung 40: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Veränderung der Einzelwurmmasse sowie der prozentuellen Zunahme der Einzelwurmmasse bei PP nach Konzentrationen: 42

Abbildung 41: MP in tieferen Substratschichten; v.l.n.r.: 630, 630-200 und 200-63 µm (Eigene Aufnahmen) 43

Abbildung 42: Abgetrennte Wurmsegmente des Versuchsansatzes PP: links: F2 1 C3, rechts: F3 3 C3 (Eigene Aufnahmen) 43

Abbildung 43: Abgetrennte Wurmsegmente des Versuchsansatzes PVC: links: F1 3 C1, rechts: F1 1 C3 (Eigene Aufnahmen) 44

Abbildung 44: PET-MP der Größenfraktion 630-200 µm nach der Behandlung in der Mikrowelle; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen) 45

Abbildung 45: PVC-MP der Größenfraktion 630-200 µm nach der Behandlung in der Mikrowelle; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen) 45

Abbildung 46: Infrarotspektrum von aufgelöstem und in den Rückständen gefundenem PVC-MP 46

Abbildung 47: Kalibrationsgerade NO_3-N 61

Abbildung 48: Kalibrationsgerade NH4-N 61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Quellen von primärem und sekundärem Mikroplastik (Duis und Coors, 2016) 3

Tabelle 2: Eigenschaften der Wurmarten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* (Dominguez und Edwards, 2010a) 11

Tabelle 3: Übersicht über bisher durchgeführte Studien bezüglich der Auswirkungen von Mikroplastik auf Regenwürmer (1/2) 16

Tabelle 4: Übersicht über bisher durchgeführte Studien bezüglich der Auswirkungen von Mikroplastik auf Regenwürmer (2/2) 17

Tabelle 5: Ergebnisse der Versuchsdurchläufe zur Entwicklung eines Verfahrens, um das MP aus den Würmern zu extrahieren 32

Tabelle 6: Berechnung der Rückstände aus der Untersuchung in der Mikrowelle MARS 6 44

Tabelle 7: Ergebnisse des Abgleichs der ATR-FTIR-Spektroskopie 46

Tabelle 8: Wurmprotokoll Polyethylenterephthalat 62

Tabelle 9: Wurmprotokoll Polyvinylchlorid 63

Tabelle 10: Wurmprotokoll Polypropylen 64

Tabelle 11: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse von Polyvinylchlorid mit Sigmaplot 65

Tabelle 12: Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse von Polyvinylchlorid mit Sigmaplot 68

Tabelle 13: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse von Polypropylen mit Sigmaplot 69

Tabelle 14: Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse von Polypropylen mit Sigmaplot 72

Abkürzungsverzeichnis

ATR-FTIR	Attenuated total reflection-Fourier transform infrared
cm	Zentimeter
FM	Feuchtmasse
g	Gramm
HDPE	Polyethylen hoher Dichte
kg	Kilogramm
l	Liter
LDPE	Polyethylen niedriger Dichte
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
MP	Mikroplastik
mS	Millisiemens
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PE	Polyethylen
PET	Polyethylenterephthalat
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PUR	Polyurethane
PVC	Polyvinylchlorid
Stk	Stück
TC	Gesamtkohlenstoff
TIC	Gesamter anorganischer Kohlenstoff
TM	Trockenmasse
TN	Gesamtstickstoff
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoff

1. Einleitung

Kunststoff ist ein äußerst vielseitiges, kostengünstiges, leichtes und dennoch starkes sowie widerstandsfähiges Material (Thompson et al., 2009). Obwohl der gesellschaftliche Nutzen von Kunststoffen weitreichend ist (Andrady und Neal, 2009), sind sie zunehmend Gegenstand von Umweltbedenken (Cole et al., 2011).

Seit dem Beginn der industriellen Großproduktion von Kunststoff in den 1940er Jahren sind Produktion und Verbrauch von Kunststoffen erheblich gestiegen. Ebenso wie das Aufkommen von Kunststoffabfällen (Al-Salem et al., 2009).

Etwa die Hälfte des produzierten Kunststoffes dient nur zur einmaligen Verwendung, wie etwa als Einwegverpackungen, Mulchfolien oder andere Wegwerfprodukte (Hopewell et al., 2009). Insgesamt machen Kunststoffe etwa 10 Masseprozent der von Menschen produzierten Abfälle aus (Barnes et al., 2009).

Aufgrund unsachgemäßer Entsorgungspraktiken gelangen große Mengen an Kunststoffabfällen in die Umwelt (Geyer et al., 2017; Jambeck et al., 2015). Im Jahr 2015 allein gelangten den Berechnungen von Lebreton und Andrady (2019) zufolge weltweit 60-99 Millionen Tonnen unsachgemäß behandelter Kunststoff in die Umwelt. Sollte sich an den Praktiken nichts ändern, könnte sich diese Zahl laut den Autoren bis zum Jahr 2060 verdreifachen.

In der Umwelt können Kunststoffe unter Einwirkung von chemischen, physikalischen und biologischen Prozessen weiter zerkleinert werden (Zhang et al., 2021). Wenn die Kunststoffpartikel kleiner als 5 mm sind, werden sie in der Wissenschaft meist als Mikrokunststoffpartikel bezeichnet (Qi et al., 2020). In dieser Masterarbeit wird allerdings der aus dem Englischen eingedeutschte Begriff Mikroplastik (MP) als Synonym für den Begriff Mikrokunststoffpartikel verwendet.

Obwohl die Existenz von MP in Meeren seit den 1970ern bekannt ist (Colton et al., 1974) und seither von zahlreichen Forschern untersucht wurde (Ivar do Sul und Costa, 2014), ist die erste Publikation, die sich mit MP in Böden auseinandersetzt, gerade einmal zehn Jahre alt (Rillig, 2012). Wie Helmberger et al. (2020) zeigen, fand sogar ein Großteil der Forschung zum Thema Mikrokunststoffpartikel im Boden und deren Auswirkungen erst seit 2016 statt.

Zahlreiche dieser Studien beschäftigen sich mit den Auswirkungen von MP auf Regenwürmer (Rodriguez-Seijo et al., 2018). Dabei wurden zumeist die Auswirkungen von Polyethylen (PE) auf die Wurmart *Lumbricus terrestris* untersucht. Die Auswirkungen von weiteren Kunststoffen auf andere Wurmarten sind weit weniger erforscht.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Datenlage zu den Auswirkungen von MP auf Regenwürmer zu vergrößern. Dazu sollen MP-Partikel weiterer Kunststoffarten in verschiedenen Größenfraktionen sowie Konzentrationen untersucht werden.

Da Regenwürmer auch wesentlich härtere Materialien als MP, wie etwa Quarz oder Feldspat, in ihrem Verdauungssystem zerkleinern können (Suzuki et al., 2003), gehen Helmberger et al. (2020) von der Möglichkeit aus, dass Regenwürmer ebenfalls MP zerkleinern können. Die weitere Zerkleinerung von MP durch Regenwürmer macht wiederum die Aufnahme durch kleinere Organismen wahrscheinlicher (Lehtiniemi et al., 2018).

Daher soll im Zuge dieser Arbeit auch untersucht werden, ob Regenwürmer MP in ihrem Verdauungssystem weiter zerkleinern.

1.1 Ziel und Forschungsfragen der Arbeit

MP gelangt durch eine Reihe an Quellen in die Umwelt. Besonders die Auswirkungen auf Bodenlebewesen wurden erst in den letzten Jahren erforscht, mit teils widersprüchlichen Ergebnissen. Die Auswirkungen von MP auf Regenwürmer wurde dabei unter verschiedensten Untersuchungsparametern wie MP-Art, MP-Größe, MP-Konzentration, MP-Exposition (im Futter oder Substrat), Dauer der Versuche und Substrate untersucht. Dabei wurden meist ein oder mehrere Wurmparameter wie Mortalität, Reproduktion und Wachstum beobachtet. Eine dieser Arbeiten ist die Masterarbeit von Antonia Dimas. Diese gab Hinweise darauf, dass sowohl abbaubare als auch nicht-abbaubare Kunststoffe negative Einflüsse auf das Wachstum und die Mortalität von Regenwürmern haben (Dimas, 2020).

Das Ziel der vorliegenden Masterarbeit ist es, die derzeitigen Forschungserkenntnisse durch Untersuchungen mit MP in gleichen Konzentrationen und Größenfraktionen zu ergänzen. Aus dem Vergleich der Versuchsergebnisse sollen allgemeine Schlüsse zu den Auswirkungen von MP auf Regenwürmer gezogen werden. Im Zuge dieser Arbeit sollen daher folgende Forschungsfragen bearbeitet werden:

1. Wird die Mortalität, die Reproduktion und das Wachstum von Regenwürmern durch Mikroplastik beeinflusst?
2. Welche Kunststoffgröße beeinflusst die Regenwürmer am stärksten?
3. Bei welcher Konzentration werden die Regenwürmer am stärksten von den Kunststoffen beeinflusst?
4. Wird Mikroplastik durch Regenwürmer zerkleinert?

1.2 Aufbau der Arbeit

Die vorliegende Masterarbeit gliedert sich neben der Einleitung in folgende fünf Kapitel, Stand des Wissens, Material und Methode, Ergebnisse, Diskussion sowie Schlussfolgerung und Ausblick. In Kapitel 2 wird der aktuelle Forschungsstand bezüglich Mikroplastik, Regenwürmer sowie der Auswirkungen von Mikroplastik auf Regenwürmer behandelt. In Kapitel 3 werden der Versuchsaufbau samt aller Bestandteile sowie die damit einhergehenden Untersuchungen und Analysen beschrieben. In Kapitel 4 werden die Ergebnisse der Versuche dargestellt. In Kapitel 5 werden die Ergebnisse diskutiert, um die Forschungsfragen zu beantworten. Kapitel 6 gibt die Schlussfolgerung sowie einen Ausblick wieder.

2. Stand des Wissens

2.1 Mikroplastik

Da es derzeit keine international anerkannte Definition von Mikroplastik gibt (Hidalgo-Ruz et al., 2012), werden in der vorliegenden Arbeit unter Mikroplastik Kunststoffpartikel mit einem Durchmesser zwischen 5 mm und 1 µm verstanden (EFSA, 2016; GESAMP, 2015).

Tabelle 1: Quellen von primärem und sekundärem Mikroplastik (Duis und Coors, 2016)

Primäres MP	Sekundäres MP	
Körperpflegeprodukte, die Mikroplastik als Peelings/Abriebmittel enthalten	Unsachgemäße Entsorgung von Kunststoffabfällen in der Umwelt	Abrieb/Freisetzung von Fasern aus synthetischen Textilien, Hygieneprodukten und anderen Kunststoffen
medizinische Produkte (z. B. Zahnpolitur beim Zahnarzt)	Verluste von Kunststoffen bei Naturkatastrophen	Abrieb von Autoreifen
Industrielle Schleifmittel	Kunststoffmulch	Kunststoffteile im Bioabfall
Vorproduktionskunststoffe, Produktionsabfälle, Kunststoffregranulat: unfallbedingte Verluste, Abfluss aus Verarbeitungsanlagen	Synthetische Polymerpartikel, die zur Verbesserung der Bodenqualität und als Kompostierungszusatz verwendet werden	Farben auf Basis synthetischer Polymere (Schiffsfarben, andere Schutzfarben, Haus- und Straßenfarben): Abrieb bei Farbentfernung und Gebrauch, Verschütten, illegale Entsorgung
Bohrspülungen für die Öl- und Gasexploration	Verluste von Abfällen bei der Abfallsammlung, auf Deponien und in Recyclinganlagen	Kunststoffbeschichtetes oder laminiertes Papier: Verluste in Papierrecyclinganlagen
	Material, das von Fischereifahrzeugen und Aquakulturanlagen verloren geht oder zurückgeworfen wird	Von Handelsschiffen (einschließlich verlorener Ladung), Sportbooten, Öl- und Gasplattformen verlorenes oder weggeworfenes Material

Es wird zwischen primärem und sekundärem Mikroplastik unterschieden, siehe Tabelle 1. Primäres Mikroplastik sind Kunststoffe, die ursprünglich in dieser Größe hergestellt wurden, etwa Peelings. Sekundäres Mikroplastik entsteht aus der Fragmentierung von größeren Kunststoffteilen, etwa aus Kunststoffabfällen oder Autoreifen (EFSA, 2016).

2.1.1 Globale und europäische Kunststoffproduktion

Die jährliche Produktion von Kunststoff ist weltweit von 1,5 Millionen Tonnen im Jahr 1950 (Statista, 2022) auf 368 Millionen Tonnen im Jahr 2019 gestiegen. Allein in den letzten 20 Jahren hat sich die produzierte Menge an Kunststoff annähernd verdoppelt

(PlasticsEurope, 2020). Abbildung 1 zeigt den Anstieg der Kunststoffproduktion in den letzten 70 Jahren.

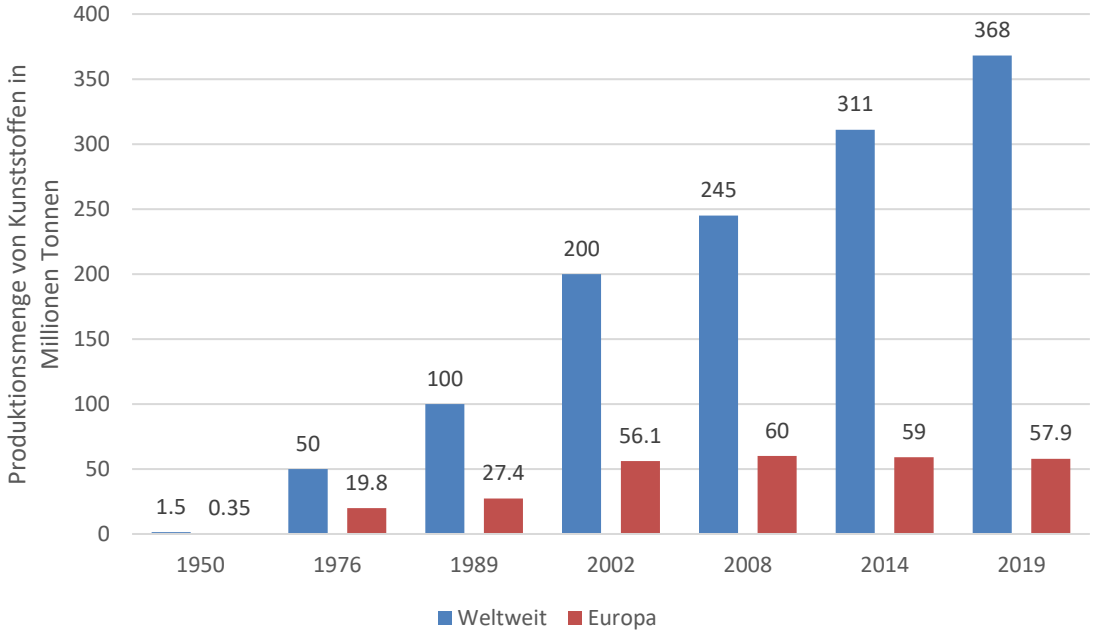

Abbildung 1: Produktionsmenge von Kunststoffen weltweit und in Europa von 1950 bis 2019 (Statista, 2022)

In Europa (EU28+NO/CH) ist die Kunststoffproduktion von 350.000 Tonnen im Jahr 1950 auf 57,9 Millionen Tonnen im Jahr 2019 gestiegen (Statista, 2022). Wobei sich das Produktionsniveau in Europa in den letzten 20 Jahren nur geringfügig verändert hat, wie Abbildung 1 zu entnehmen ist. Aktuell ist Europa mit einem Anteil von 16 % an der weltweiten Kunststoffproduktion, nach Asien (51%) und den ehemaligen NAFTA-Staaten (19%), der drittgrößte Kunststoffproduzent. Nach Ländern betrachtet ist China mit 31 % der weltweit größte Produzent von Kunststoffen (PlasticsEurope, 2020).

Weltweit machen Polyethylen (36%), Polypropylen (PP) (21%) und Polyvinylchlorid (PVC) (12%) die größten Gruppen an produzierten Kunststoffen aus. Polyethylenterephthalat (PET), Polyurethane (PUR) und Polystyrol (PS) haben jeweils einen Anteil von unter 10 % an der Gesamtproduktion (Geyer et al., 2017).

In Europa zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Hier machen PP (19,4%), PE-LD (17,4%), PE-HD (12,4%), PVC (10%), PET (7,9%) und PUR (7,9%) den Großteil der Nachfrage nach Kunststoffen aus (PlasticsEurope, 2020). Dies ist in Abbildung 2 veranschaulicht.

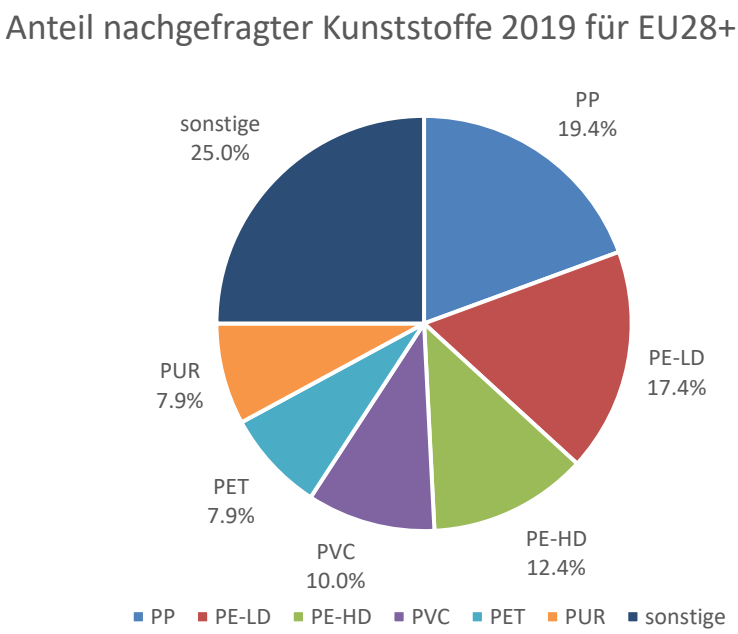

Abbildung 2: Anteil nachgefragter Kunststoffe im Jahr 2019 für EU28+NO/CH (PlasticsEurope, 2020)

Etwa 60 % der Kunststoffprodukte haben eine Nutzungsphase von mehr als einem Jahr, während gut 40 % eine Nutzungsphase haben, die kürzer als 12 Monate ist. Daher liegt die Summe, der in Europa (EU28+NO/CH) im Jahr 2018 gesammelten Kunststoffabfälle, mit 29,1 Millionen Tonnen auch deutlich unter dem Verbrauch von 50,7 Millionen Tonnen. Kunststoff kommt dabei besonders oft in der Verpackungsindustrie (39,6%), im Bausektor (20,4%) oder in der Automobilbranche (9,6%) zum Einsatz (PlasticsEurope, 2020), siehe Abbildung 3.

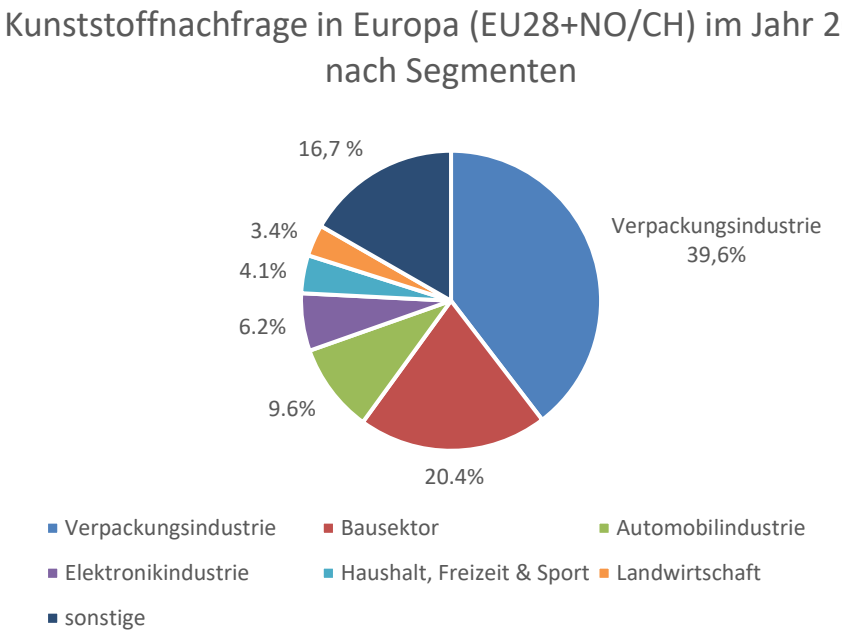

Abbildung 3: Kunststoffnachfrage in Europa (EU28+NO/CH) im Jahr 2019 nach Segmenten (PlasticsEurope, 2020)

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen in der Vergangenheit bereits Clark und Hardy (2004). Laut ihnen sind Verpackungen für 37,2 % des gesamten Kunststoffverbrauchs

in Europa und 35 % weltweit verantwortlich. Rund ein Drittel aller Kunststoffverpackungen werden dabei nicht fachgerecht entsorgt und landen in der Umwelt (World Economic Forum et al., 2016).

Insgesamt wurden weltweit bis zum Jahr 2015 etwa 8.300 Millionen Tonnen Primärkunststoff produziert, siehe Abbildung 4. Davon waren 2015 noch 2.500 Millionen Tonnen oder 30 % in Gebrauch. Bis 2015 wurden 6.300 Millionen Tonnen Primär- und Sekundärkunststoff als Kunststoffabfall behandelt: 600 Millionen Tonnen oder 9 % wurden recycelt (500 Millionen Tonnen aus Primär- und 100 Millionen Tonnen aus Sekundärkunststoff), 800 Millionen Tonnen oder 12 % der thermischen Verwertung zugeführt und 4.900 Millionen Tonnen oder 79 % wurden in Deponien abgelagert oder sind in die Umwelt gelangt (Geyer et al., 2017).

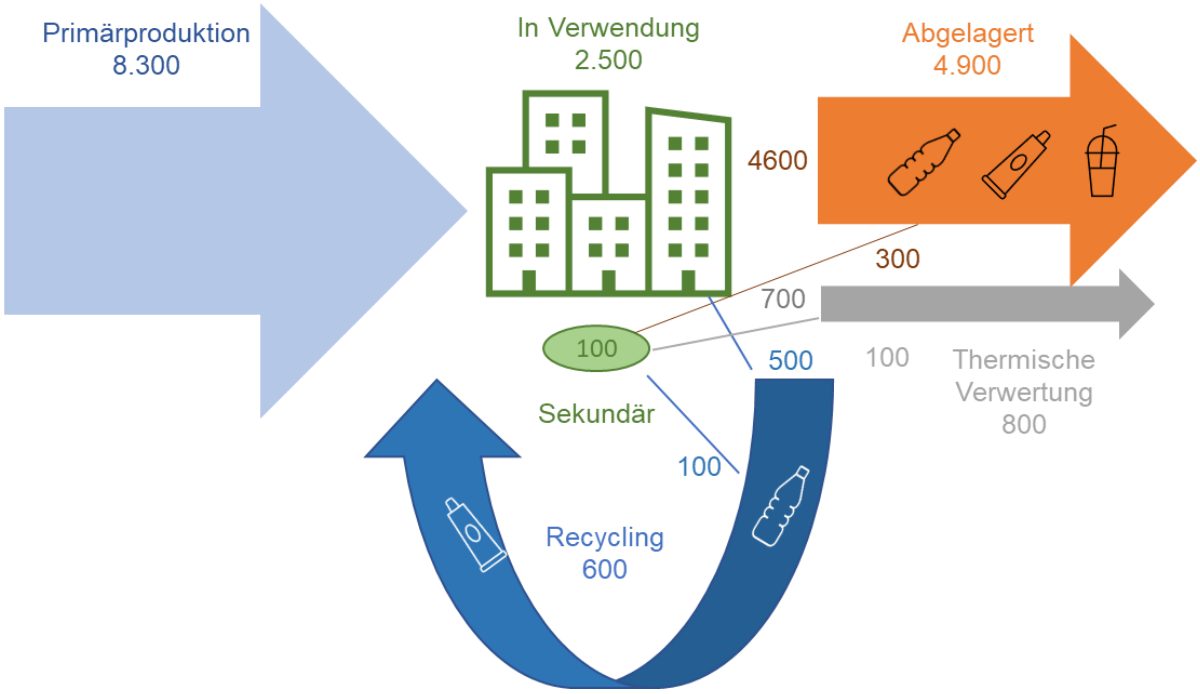

Abbildung 4: Globale Produktion, Verwendung und Entsorgung von Kunststoffen von 1950 bis 2015 in Millionen Tonnen (Eigene Darstellung nach Geyer et al., 2017)

Die durchschnittliche jährliche Wachstumsrate der globalen Kunststoffproduktion war von 1950 bis 2015 mit 8,4 % etwa 2,5-mal so hoch wie die des Welt-Bruttoinlandsprodukts. Sollten sich dieser Verbrauch sowie derzeitige Abfallbehandlungspraktiken fortsetzen, werden bis zum Jahr 2050 schätzungsweise 34.000 Millionen Tonnen Kunststoff produziert worden sein. Davon werden etwa 9.000 Millionen Tonnen recycelt worden sein, etwa 12.000 Millionen Tonnen verbrannt worden sein und etwa 12.000 Millionen Tonnen Kunststoffabfälle auf Deponien oder in der Umwelt gelandet sein (Geyer et al., 2017).

Die meisten der weltweit hergestellten Kunststoffe sind nicht biologisch abbaubar. Dies hat zur Folge, dass sich Kunststoffe, die unbeabsichtigt in die Umwelt gelangen, mit der Zeit dort anreichern (Sintim et al., 2019).

2.1.2 Mikroplastik in terrestrischen Systemen

Wie viele Tonnen Kunststoff jährlich in die Umwelt gelangen, lässt sich aufgrund der unzureichenden Datenlage und der Unterschiede in der Abfallerzeugung und Abfallbehandlung nur schwer bestimmen (Horton et al., 2017). So wurden laut Jambeck et al. (2015) im Jahr 2010 jeweils in Küstennähe in China 76 % des

Kunststoffabfalls (8,82 Millionen Tonnen) nicht fachgerecht entsorgt, während es in den USA nur 2 % (0,28 Millionen Tonnen) waren. Dabei identifiziert die Studie zwei Quellen für nicht fachgerecht entsorgten Kunststoffabfall. Zum einen Littering und zum anderen die informelle Bewirtschaftung auf unkontrollierten Deponien oder Ablagerungsplätzen.

Ausgehend von diesen Berechnungen sowie Schätzungen von Nizzetto et al. (2016) haben Horton et al. (2017) berechnet, dass in der EU jährlich zwischen 473.000 und 910.000 Tonnen Kunststoffabfälle freigesetzt und in terrestrischen Systemen zurückgehalten werden. Dies entspricht der 4- bis 23-fachen Menge, die schätzungsweise in die Meere gelangt.

Während die Auswirkungen von MP auf aquatische Systeme bereits seit längerer Zeit erforscht werden, wurde mit der Forschung der Folgen von MP auf terrestrische Systeme erst vor einigen Jahren begonnen (Nizzetto et al., 2016).

Agrarflächen zählen neben Abfalldeponien, städtischen Räumen und Stränden zu den am meisten mit MP kontaminierten terrestrischen Systemen (Ng et al., 2018). Bei der Untersuchung eines Ackers im Südosten Deutschlands auf Kunststoffkontamination haben Piehl et al. (2018) hochgerechnet auf einen Hektar eine Makroplastik-Kontamination von 206 Teilchen ermittelt, an MP schätzen sie bis zu 292.400 Teilchen je Hektar.

Die Quellen von MP auf Agrarflächen sind vielseitig und reichen von Primärmikroplastik-Quellen in Form von Klärschlamm über verschiedenste Kunststoffverschmutzung bis hin zu Sekundärmikroplastik-Quellen in Form von Mulch- und Gewächshausfolien (Duis und Coors, 2016; Horton et al., 2017; Rillig, 2012). Piehl et al. (2018) haben bei ihren Untersuchungen jedoch bewusst eine Agrarfläche gewählt, die weder mit Kompost oder Klärschlamm gedüngt wurde, der mit MP kontaminiert sein könnte noch mit einer künstlichen Bewässerung, Mulchfolien, Netzen oder Gewächshäusern bewirtschaftet wurde. Sollten solche Bewirtschaftungsmethoden eingesetzt werden, könnte die MP-Kontamination höher sein.

Erkenntnisse von Weithmann et al. (2018) zeigen, dass organischer Dünger aus der Kompostierung und Vergärung von organischen Abfällen, wie er weltweit in der Landwirtschaft sowie im Gartenbau eingesetzt wird, je nach Vorbehandlung eine Quelle für MP in der Umwelt darstellt. Laut ihren Hochrechnungen gelangen so allein in Deutschland jährlich 3,5 Milliarden bis 2,2 Billionen MP-Partikel in die Umwelt, obwohl nur MP-Partikel >1 mm berücksichtigt wurden.

Klärschlamm als Quelle von MP auf landwirtschaftlich genützten Böden wurde laut Nizzetto et al. (2016). bisher zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Denn in Städten in Umlauf gelangtes MP, etwa durch Reifenabrieb, Wäschefasern oder industrielle Prozesse, wird über die kommunale Abwassersammlung zu Kläranlagen geleitet (Nizzetto et al., 2016). Bei der Abwasserreinigung in Kläranlagen wird der überwiegende Teil des MP aus städtischen Abwässern entfernt und reichert sich so im Klärschlamm an (Carr et al., 2016; Ziajahromi et al., 2016).

Da die Verwendung von Klärschlamm als landwirtschaftlicher Dünger wirtschaftlich vorteilhaft und in vielen entwickelten Regionen üblich ist, werden in Europa und Nordamerika etwa 50 % des anfallenden Klärschlamms auf diese Art genutzt. Dabei gibt es teils strenge Regularien, die laut Nizzetto et al. (2016) allerdings weder in Europa noch in den USA die Behandlung von MP erwähnen.

Nizzetto et al. (2016) gehen weiter davon aus, dass durch die Anwendung von Klärschlamm als Dünger in der Landwirtschaft jährlich 6.300 – 430.000 Tonnen MP auf europäische Ackerflächen ausgebracht werden. In den USA sind es den Berechnungen zufolge 44.000 – 300.000 Tonnen MP, die auf diesem Wege auf Ackerflächen und somit in die Umwelt gelangen. Im Vergleich dazu haben sich im Jahr 2014 weltweit schätzungsweise 93.000 – 236.000 Tonnen MP in den obersten Wasserschichten der Weltmeere befunden (van Sebille et al., 2015).

Bereits vor einem Jahrzehnt hat Rillig (2012) darauf hingewiesen, dass die Auswirkungen von MP in terrestrischen Systemen gründlich untersucht werden müssen. Doch vermehrte Versuche gab es erst in den letzten fünf Jahren. Ein Fokus dabei lag auf den Untersuchungen der Auswirkungen von MP auf Regenwürmer.

2.2 Regenwürmer

Die Familie der Regenwürmer gehört im Stamm der Annelida (Ringelwürmer) zur Ordnung der Oligochaeta (Wenigborster), welcher mehr als 8.000 Arten angehören (Dominguez und Edwards, 2010a; Edwards, 2004). Zu den Regenwürmern gehören davon etwa 3.000 Arten, die unter verschiedensten klimatischen Bedingungen leben. (Butt und Lowe, 2010). Regenwürmer sind in fast allen Regionen der Welt zu finden, mit Ausnahme von Wüsten und Permafrostböden (Edwards, 2004). In Österreich sind 62 Regenwurmarten beheimatet (Christian und Zicsi, 1999).

Regenwürmer sind segmentierte Würmer mit einer äußeren Drüse (Clitellum) zur Herstellung der Kokons, einem sensorischen Lappen vor dem Mund (Prostomium) und einem Anus am anderen Ende des Körpers (Dominguez und Edwards, 2010a).

Bei den meisten Regenwurmarten wird davon ausgegangen, dass sie fremdbefruchtende Hermaphroditen sind. Das heißt, sie pflanzen sich fort, indem sie bei der Kopulation gleichzeitig Spermien in ihr Clitellum empfangen und übertragen. Die Befruchtung findet dann im Kokon statt. Wobei aus einem Kokon ein oder mehrere Jungtiere schlüpfen können (Cosín et al., 2010). Allerdings wurde bei manchen Arten, etwa *Eisenia andrei*, auch Selbstbefruchtung beobachtet. Dabei biegen sich die Würmer dermaßen, dass sie sich selbstbefruchten können (Domínguez et al., 2003).

Die Regenwurmpopulation hängt von den Bodenbedingungen und dem verfügbaren organischem Material ab. Die Zahl der Regenwürmer nimmt so lange zu, bis die Nahrung ein limitierender Faktor ist. Bei den Ausscheidungen gibt es Unterschiede zwischen jungen und adulten Regenwürmern. Während die Ausscheidungen von Jungwürmer fast vollständig aus verdauter Nahrung und somit organischer Substanz besteht, ist bei den Ausscheidungen von adulten Würmern auch Erde enthalten (Singh et al., 2011).

Verschiedene Regenwurmarten haben unterschiedliche Lebensweisen und besetzen unterschiedliche ökologische Nischen. Auf der Grundlage ihrer Ernährungsstrategien und ihres Lebensraums wurden sie in drei Kategorien eingeteilt: epigäische, endogäische und anektische Regenwürmer (Bouché, 1977). Während die beiden letztgenannten Arten in Erdröhren im Boden leben, halten sich epigäische Wurmarten vorwiegend in der Streuschicht auf.

Epigäische Regenwürmer sind tolerant gegenüber einer Vielzahl an Umweltfaktoren, dennoch weisen sie gewisse Limits auf, ab denen Fortpflanzung, Wachstum und Überleben gefährdet sind. Einer dieser Faktoren ist die Temperatur. Für die meisten Arten herrschen bei 25 °C ideale Temperaturbedingungen und viele Arten tolerieren

auch Temperaturbereiche von 15-25 °C bis 0-35 °C. Zwei weitere Faktoren sind pH-Wert und Feuchtigkeitsgehalt des Substrats. Regenwürmer tolerieren pH-Werte von 5 – 9, bevorzugen allerdings saure Werte um 5,0. Das Substrat soll optimalerweise einen Feuchtigkeitsgehalt von 50 – 90 % bezogen auf die Trockenmasse (TM) aufweisen. Außerdem benötigen Regenwürmer ein ausreichend belüftetes Substrat, um über die Haut atmen zu können. Zu hohe Ammoniak- und Salzgehalte überleben die Würmer nicht (Dominguez und Edwards, 2010a).

Durch diese natürlichen Toleranzen sind epigäische Regenwurmarten besonders für die Vermikompostierung geeignet (Dominguez und Edwards, 2010a). Unter Vermikompostierung versteht man den biochemischen Abbauprozess, bei dem Regenwürmer mit Hilfe von Mikroorganismen organische Materialien in Wurmbiomasse und Wurmkot umwandeln (Khwairakpam und Bhargava, 2009; Lee et al., 2018). Würmer sind dabei die Prozesstreiber, die das Substrat konditionieren und die biologische Aktivität beeinflussen, während Mikroorganismen den biochemischen Abbau von organischen Materialien vorantreiben (Aira, 2002; Suthar, 2009).

Vermikompostierung besteht aus zwei Phasen: Eine Phase, in der die Regenwürmer die Abfälle für ihr Wachstum verarbeiten und dabei die physikalischen und chemischen Eigenschaften sowie die mikrobielle Zusammensetzung des Abfalls verändern. Und eine Reifungsphase, in der die Regenwürmer in Schichten mit frischen Abfällen abwandern und die Mikroorganismen die Zersetzung der Abfälle übernehmen (Castillo et al., 2013; Dominguez und Edwards, 2010b).

Epigäische Regenwurmarten zeichnen sich durch eine Reihe von Eigenschaften besonders für die Vermikompostierung aus:

- natürliche Fähigkeit zur Besiedlung von organischen Abfällen
- hohe Verbrauchs-, Verdauungs- und Assimilationsraten von organischem Material
- Toleranz gegenüber einer Vielzahl von Umweltfaktoren
- kurze Lebenszyklen
- hohe Reproduktionsraten
- Ausdauer und Toleranz bei der Handhabung

Jedoch weisen nur wenige Regenwurmarten all diese Eigenschaften auf und nur fünf Arten werden tatsächlich für die Vermikompostierung großtechnisch verwendet:

- *Eisenia fetida* (Savigny)
- *Eisenia andrei* (Bouché)
- *Dendrobaena veneta* (Savigny)
- *Perionyx excavatus* (Perrier)
- *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) (Dominguez und Edwards, 2010a)

2.2.1 Vermikompostierung in Kombination mit Kompostierung

Die Kompostierung ist eine einfache und kosteneffiziente Methode zur Behandlung organischer Abfälle (Diaz, 2007). Eine weitere sichere, effektive und nachhaltige Methode zur Behandlung von organischen Abfällen als Alternative zur Kompostierung ist die Vermikompostierung (Lee et al., 2018).

Würmer sind in der Lage organischen Siedlungsabfall, Klärschlamm und organische Abfallreste aus verschiedenen Industrien zu verarbeiten (Edwards und Arancon, 2004). Darüber hinaus können sie auch Mist, Gülle und Kot aus der Viehzucht ebenso wie Gärreste verwerten und zu wertvollen Vermikompost umwandeln (Ali et al., 2015).

In Kombination mit Tierkot sind auch ansonsten nicht recyclingfähige Rückstände aus der Papierproduktion für die Vermikompostierung geeignet (Gupta und Garg, 2009). Allerdings gibt es auch einige Lebensmittelabfälle wie Milchprodukte, Fleisch- und Fischabfälle, Fette und Öle, salzige und essighaltige Lebensmittel, die die Würmer nicht vertragen. Kleinere Stoffpartikel vergrößern die Oberfläche des Materials und erhöhen somit die Geschwindigkeit des Abbaus und der Vermikompostierung (Lohri et al., 2017).

Würmer nehmen organische Abfälle auf, zermahlen und verdauen sie mit Hilfe der aeroben und anaeroben Mikroflora ihres Darms. Dabei werden physikalische und biochemische Prozesse von den Würmern durchgeführt (Ali et al., 2015). Dabei entsteht eine feine, homogene, stabile sowie mikrobiell aktive Substanz (Maboeta und van Rensburg, 2003), der sogenannte Vermikompost (Ndegwa und Thompson, 2001). Daher folgern Singh et al. (2011), dass Vermikompostierung fester organischer Abfälle industrieller und kommunaler Herkunft eine geeignete alternative Technologie für die Bewirtschaftung dieser Abfälle sein kann.

Des Weiteren kann Vermikompostierung auch für die Aufnahme und Entfernung von toxischen Metallen und den Abbau komplexer Chemikalien in ungiftige Formen verwendet werden (Jain et al., 2004). Bei der Aufnahme von organischem Substrat durch Würmer werden die in der organischen Substanz enthaltenen Schwermetalle von den Würmern aufgenommen (Shahmansouri et al., 2005).

Vermikompostierung kann nicht nur statt Kompostierung zur Behandlung von organischen Abfällen eingesetzt werden, sondern auch in Kombination mit einer technischen Kompostierung. Dabei kann sowohl Kompostierung auf Vermikompostierung folgen als auch Vermikompostierung auf Kompostierung (Ali et al., 2015; Dominguez et al., 1997).

Während es eine Vielzahl an Studien zu den Einsatzmöglichkeiten von Vermikompostierung in der Behandlung von organischen Abfällen gibt, ist die Anzahl an Studien, die die Auswirkungen von MP auf Regenwürmer untersucht noch überschaubar. Bevor Vermikompostierung weiter in die Behandlung organischer Abfälle integriert wird, sollten die Auswirkungen weiter untersucht werden. Speziell in Anbetracht der großen Mengen an MP in Klärschlamm und kommunal hergestelltem Kompost, denen Regenwürmer durch eine Vermikompostierung dieser Substrate potenziell ausgesetzt wären.

2.2.2 *Eisenia fetida* (Savigny) und *Eisenia andrei* (Bouché)

Die eng miteinander verwandten Regenwurmarten *Eisenia fetida* (Savigny) und *Eisenia andrei* (Bouché) sind aufgrund ihrer Eigenschaften weit verbreitet bei der Vermikompostierung.

Sie sind weit verbreitet, besiedeln von Natur aus organische Streuschichten, haben kurze Lebenszyklen und dank großer Temperatur- und Feuchtigkeitstoleranzen sind sie widerstandsfähig und leicht zu handhaben. Neben Unterschieden in der Pigmentierung sind sie morphologisch ähnlich und benötigen die gleichen Umweltbedingungen. Daher leben die beiden Wurmarten auch oftmals in der Natur zusammen. Ihre Lebenszyklen sowie Fortpflanzungseigenschaften sind ebenfalls sehr ähnlich, wobei die Wachstums- und Reproduktionsraten von *Eisenia andrei* etwas höher sind. Die Lebenszyklen von gelegtem Kokon bis geschlechtsreifen Wurm dauern

zwischen 45 und 51 Tagen. Das Temperaturoptimum liegt bei 25°C und der optimale Wassergehalt bei 85 %. Ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt 594 Tage bei 18°C und 589 Tage bei 28°C und die maximale Lebenserwartung beträgt 4,5 bis 5 Jahre (Dominguez und Edwards, 2010a). Weitere Informationen sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Eigenschaften der Wurmarten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* (Dominguez und Edwards, 2010a)

Epigäische Würmer	***Eisenia fetida***	***Eisenia andrei***
Farbe	Braune und rötliche Bänder	Rot
Größe der erwachsenen Regenwürmer [mm]	Durchmesser: 4-8 x Länge: 50-100	Durchmesser: 4-8 x Länge: 50-100
Mittleres Gewicht der Erwachsenen [g]	0,55	0,55
Zeit bis zur Geschlechtsreife [Tage]	28-30	21-30
Anzahl der Kokons [je Tag]	0,35-0,5	0,35-0,5
Mittlere Größe der Kokons [mm]	4,85 x 2,82	4,8 x 2,82
Inkubationszeit [Tage]	18-26	18-26
Schlüpfwahrscheinlichkeit [%]	73-80	72
Anzahl der Würmer [Kokon-1]	2,5-3,8	2,5-3,8
Selbstbefruchtung	+	+
Lebenszyklus [Tage]	45-51	45-51
Optimale Temperatur (Limits) [°C]	25 (0–35)	25 (0–35)
Optimale Feuchtigkeit (Limits) [% TM]	80–85 (70–90)	80–85 (70–90)

2.3 Auswirkungen von Mikroplastik auf Regenwürmer

In diesem Unterkapitel werden die derzeitigen Erkenntnisse aus Untersuchungen des Einflusses von MP auf Regenwürmer dargestellt. Bei diesen Studien wurden meist mehrere Wurmparameter untersucht beziehungsweise verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Um einen besseren Überblick zu vermitteln, wurden Unterkapitel eingefügt. In diesen werden immer alle Studien betreffend eines untersuchten Parameters vorgestellt. Anschließend werden die Ergebnisse zu den untersuchten Parametern zusammengefasst. Um eine Wiederholung zu vermeiden, werden alle relevanten Studienergebnisse vorgestellt. Also auch solche, die erst in späteren Kapiteln verglichen werden.

Anfangs werden viele Studien mit der Wurmart *Lumbricus terrestris* vorgestellt, gefolgt von einigen mit den in dieser Arbeit untersuchten Wurmarten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*.

2.3.1 Aufnahme und Transport von Mikroplastik durch Regenwürmer

In einem Versuch haben Rillig et al. (2017) die Auswirkungen von PE-MP auf die Wurmart *Lumbricus terrestris* untersucht. In dem 21 Tage dauernden Versuch wurde nachgewiesen, dass die Würmer MP in verschiedenen Größenfraktionen (710-850 µm, 1.180-1.400 µm, 1.700-2.000 µm, 2.360-2.800 µm) von der Bodenoberfläche in den Boden transportieren, wobei nur die kleinste Fraktion in der untersten Bodenschicht gefunden wurde. Dabei gibt es zwei potenzielle Transportwege. Zum einen haben die Forscher beobachtet, dass MP aller Größen an der Haut der Würmer anhaftet. Zum anderen wurden die kleineren beiden MP-Größen im ausgeschiedenen Wurmkot nachgewiesen. Signifikante Auswirkungen durch MP auf die Mortalität und das Gewicht konnten die Forscher nicht feststellen.

Auch Huerta Lwanga et al. (2016a) haben die Auswirkungen von Mikroplastik auf die Wurmart *Lumbricus terrestris* untersucht. Dabei wurde PE-MP <150 µm in verschiedenen Konzentrationen (0, 7, 28, 45 und 60%) den als Futter zum Einsatz kommenden Pflanzenabfällen (*Populus nigra*) beigemengt. Nach 14 Tagen konnten keine Auswirkungen auf die Mortalität (0%) festgestellt werden. Nach 60 Tagen wiederum war die Mortalität mit 8 und 25 % bei den MP-Konzentrationen von 28 und 60 % signifikant erhöht gegenüber den anderen Konzentrationen und der Kontrolle. Die Wachstumsrate, gemessen in Gewichtszunahme je Wurm, war bei der Kontrolle und der MP-Konzentration 7 % signifikant höher als bei den höheren MP-Konzentrationen, bei denen in einem Fall (60%) auch eine signifikante Gewichtsreduktion festgestellt wurde. Die Reproduktion gemessen in Kokonanzahl und -gewicht wies keine signifikanten Unterschiede auf.

In einem vier Tage dauernden Versuch mit denselben MP Fraktionen sowie Konzentrationen beobachteten Huerta Lwanga et al. (2016a) außerdem, dass die Ausscheidungsrate (mg Wurmkot / Tag und Wurm) bei einer Konzentration von 45 % signifikant höher war als bei 7 %. Bei der Konzentration von Mikroplastik im Wurmkot (Vergleich Konzentration Ausgangssubstrat zu Wurmkot) wurde bei einer Konzentration von 7 % ein signifikant erhöhter Wert gegenüber den MP-Konzentrationen 45 und 60 % festgestellt. Außerdem kam es zu einer Anreicherung von MP <50 µm im Wurmkot. Im Futter waren 50 % der PE-Partikel <50 µm, in den Ausscheidungen der Würmer hingegen waren es 90 %.

Bei einem 14 Tage dauernden Versuch wurde der Transport und die Einarbeitung von MP in Wurmtunnel der Wurmart *Lumbricus terrestris* weiter untersucht (Huerta Lwanga

et al., 2016b). Dabei wurde LDPE-MP in denselben Konzentrationen (0, 7, 28, 45 und 60%) den Pflanzenabfällen (*Populus nigra*) beigemengt. Nach zwei Wochen wurden alle Untersuchungsbehälter bei -17°C tiefgefroren, um anschließend die Wurmtunnel sowie die Würmer zu untersuchen. Dabei wurde bei allen Würmern eine Gewichtsabnahme festgestellt. Bei allen MP-Konzentrationen konnte MP in den Tunneln der Würmer festgestellt werden. Die Tunnelbildung (Tunnelanzahl/Wurmmasse in g) wies keine signifikanten Unterschiede auf. Allerdings wurden in den Versuchsreaktoren der Konzentration von 7 % signifikant mehr Tunnel festgestellt. Außerdem wurde bei der 7 % Konzentration auch anteilig am meisten MP bezogen auf die anfängliche Menge in die Tunnelwände eingearbeitet (73,5%). Die absolut höchste Menge an MP, das in die Tunnel eingearbeitet wurde, wurde bei der Konzentration von 60 % festgestellt. Bei den Konzentrationen von 7, 28 und 45 % konnte ein größenselektiver Transport von MP <50 µm in den Boden festgestellt werden. Im Vergleich zur anfänglichen Größenverteilung des MP hat sich der Anteil von <50 µm um 65 % erhöht. Huerta Lwanga (2016b) schließen daraus, dass besonders der erhöhte Eintrag kleiner MP-Fraktionen in den Boden Auswirkungen auf terrestrische Lebewesen sowie das Grundwasser haben könnte.

Huerta Lwanga et al. (2017) haben in einem Feldversuch ebenfalls die Aufnahme von MP durch Regenwürmer in Hausgärten nachgewiesen. Dabei erhöhte sich die Anzahl an MP-Partikeln je g Wurmkot (14,8 +- 28,8 Partikel/g) gegenüber den MP-Partikeln je g Boden (0,87 +- 1,9 Partikel/g).

Hodson et al. (2017) führten Untersuchungen zu den Auswirkungen von mit Zink versetztem HDPE-MP (durchschnittliche Fläche der MP-Stücke betrug 0,92 ± 1,09 mm^2) auf die Wurmart *Lumbricus terrestris* durch. Bei dem 28 Tage dauernden Versuch wurden bei einer MP-Konzentration von 0,35 % TM im Substrat weder Auswirkungen auf das Gewicht noch auf die Mortalität der Würmer festgestellt. Allerdings zeigte sich, dass die Würmer MP zwar aufnehmen, aber kein MP in ihrem Darm zurückhalten.

Prendergast-Miller et al. (2019) haben in einem 35 Tage dauernden Versuch mit Würmern der Art *Lumbricus terrestris* die Auswirkungen von PE-Mikrofasern (Durchschnittliche MF Länge 361.6 ± 387.0 µm und Durchmesser s 40.7 ± 3.8 µm) untersucht. Dabei konnten bei MP-Konzentrationen von 0,1 sowie 1,0 % TM im Substrat keine signifikanten Auswirkungen auf Gewichtsveränderungen sowie Mortalität festgestellt werden. Die Forscher konnten jedoch PE-Mikrofasern im Wurmkot nachweisen und folgern daraus, dass Würmer die Fasern nicht meiden.

Die Aufnahme von PE-MP wurde in Laborversuchen bei der Wurmart *Lumbricus terrestris* nachgewiesen. Ebenso wie die Aufnahme von MP durch Regenwürmer in Hausgärten. Zu diesem Ergebnis kommen Studien trotz verschiedener Untersuchungszeiträume, MP-Größen sowie MP-Konzentrationen. Darüber hinaus wurde mehrfach eine Anreicherung der kleineren MP-Größen der Versuche im Wurmkot festgestellt. Entweder nehmen die Würmer bevorzugt kleinere MP-Größen auf oder Würmer zerkleinern MP weiter. Neben dem Transport von MP durch Aufnahme und Ausscheidung wurde auch ein Transport durch Anheften an der Haut der Würmer beobachtet.

2.3.2 Reduktion und Meidung von Mikroplastik durch Regenwürmer

Huerta Lwanga et al. (2018) haben gezeigt, dass die aus dem Darm der Wurmart *Lumbricus terrestris* extrahierten Bakterien Phylum Actinobacteria und Firmicutes in der Lage sind LDPE abzubauen. Nach 21 Tagen war 60 % des MP abgebaut. Das

verbleibende MP wurde signifikant zerkleinert. In Hinblick auf die Entwicklung von Sanierungstechniken für mit PE verschmutzte Böden wurden damit vielversprechende Fortschritte erzielt. Auch Kwak und An (2021) konnten die Reduktion von PE-MP durch die Wurmart *Eisenia andrei* in einem 21 Tage dauernden Versuch nachweisen.

Judy et al. (2019) haben zwei Versuche mit HDPE, PET sowie PVC-MP <2 mm durchgeführt. Beim ersten Versuch konnten bei MP-Konzentrationen von 0,01 bis 1,0 % TM im Substrat nach 28 Tagen keine Auswirkungen von MP auf Wachstum und Mortalität der Wurmart *Eisenia fetida* festgestellt werden. Nach 56 Tagen konnten ebenfalls keine Auswirkungen auf die Fortpflanzung der Würmer beobachtet werden.

In ihrem zweiten Versuch haben Judy et al. (2019) untersucht, ob *Eisenia fetida* Substrat ohne MP gegenüber Substrat mit MP (0,5% TM) bevorzugen. Dabei konnten sie, ebenso wie Hodson et al. (2017) und Prendergast-Miller et al. (2019) bei ihren Versuchen mit der Wurmart *Lumbricus terrestris*, nicht feststellen, dass Würmer ein mit MP versetztes Substrat meiden.

2.3.3 Auswirkungen von Mikroplastik auf die Reproduktion von Regenwürmern

Sforzini et al. (2016) haben die Auswirkungen von biologisch abbaubaren Kunststoffen bei einer MP-Konzentration von 1,25 % TM im Substrat auf die Wurmart *Eisenia andrei* untersucht. Nach 28 Tagen konnten sie keine Auswirkungen auf Mortalität und Reproduktion feststellen.

Rodriguez-Seijo et al. (2017) führten Versuche mit *Eisenia andrei* und LDPE-MP in der Größenfraktion 250µm-1.000µm durch. Dabei konnten im Versuchszeitraum von ebenfalls 28 Tagen keine Auswirkungen der MP-Konzentrationen von 0,00625 %, 0,0125 %, 0,025 %, 0,05 % und 0,1 % TM auf das Überleben, die Fortpflanzung und das Gewicht der Würmer festgestellt werden. Allerdings wurden schwerwiegende histologische Schäden im Darm der Würmer beobachtet.

Bisher wurden in mehreren Studien keine Auswirkungen von MP (verschiedene MP-Arten, -Größen, -Konzentrationen) auf die Reproduktion der Wurmarten *Lumbricus terrestris*, *Eisenia fetida* sowie *Eisenia andrei* festgestellt.

2.3.4 Auswirkungen von Mikroplastik auf Mortalität und Wachstum von Regenwürmern

Rodriguez-Seijo et al. (2018) haben den negativen Einfluss von LDPE-MP auf *Eisenia fetida* gezeigt. Durch die Untersuchung verschiedener Biomarker wurde nachgewiesen, dass MP-Konzentrationen ab 0,5 % TM zu oxidativem Stress bei *Eisenia fetida* führen. Signifikante Auswirkungen auf Mortalität und Gewicht der Würmer wurden nach 28 Tagen allerdings nicht beobachtet.

Dass die MP-Konzentration eine Rolle spielt, haben auch Cao et al. (2017) bei ihren Versuchen mit der Wurmart *Eisenia fetida* und Polystyrol-MP in der Größe von 58 µm festgestellt. Bei MP-Konzentrationen von 0,25 und 0.5 % TM im Substrat wurden kaum Effekte auf das Gewicht der Würmer festgestellt. Bei Konzentrationen von 1 und 2 % TM im Substrat hingegen war das Gewicht gegenüber der Kontrollgruppe um jeweils mehr als 25 % niedriger. Die Mortalität der Würmer stieg mit erhöhter Konzentration, mit Ausnahme von der 1 % Konzentration. Besonders bei der höchsten Konzentration (2%) sind 40 % der Würmer verendet.

Jiang et al. (2020) haben bei ihren 14 Tage dauernden Untersuchungen von PS-MP in den Größen 0,1-1,3 µm in den Konzentrationen 0,0001 und 0,00001 % TM im Substrat sowohl signifikante Unterschiede auf die Mortalität als auch auf die

Gewichtsveränderung von Würmern der Art *Eisenia fetida* beobachtet. Überraschenderweise nahmen MP ausgesetzte Würmer mehr an Gewicht zu als Würmer der Kontrollgruppe. Besonders groß war der Unterschied bei den Konzentrationen 0,0001 %. Im Vergleich zur anderen Konzentration war hier auch die Mortalität signifikant erhöht. Ebenso war die Mortalität in der Kontrolle signifikant höher als jene der Konzentration 0,00001 %.

Die Ergebnisse zu den Auswirkungen von MP auf Gewicht und Mortalität sind bisher nicht eindeutig. Während bei vielen Studien keine signifikanten Unterschiede durch das MP auftraten, konnten dies Cao et al. (2017), Huerta et al. (2016a) und Jiang et al. (2020) sehr wohl beobachten. Doch auch bei diesen Untersuchungen sind die Ergebnisse widersprüchlich. So führte MP gegenüber Kontrollen ohne MP sowohl zu signifikant erhöhten Wachstumsraten (Jiang et al., 2020) als auch zu signifikant verringerten Wachstumsraten (Cao et al., 2017; Huerta Lwanga et al., 2016a) gegenüber Kontrollen ohne MP. Dies könnte eine Vielzahl an Gründen haben, etwa die Wurmart, das MP selbst, dessen Größe oder Konzentration oder die Art und Weise in welcher Form die Würmer MP ausgesetzt wurden.

Tabelle 3 veranschaulicht den gegenwärtigen Stand der Wissenschaft bezüglich der Untersuchungen der Auswirkungen von MP auf Regenwürmer. Die Studien sind dabei nach den untersuchten Wurmarten geordnet.

Tabelle 3: Übersicht über bisher durchgeführte Studien bezüglich der Auswirkungen von Mikroplastik auf Regenwürmer (1/2)

Wurmart	Dauer [in Tagen]	MP-Art	MP-Größe [in µm]	MP-Konzentration [% TM]	Substrat	Erhobene Parameter	Ergebnisse	Autoren
Lumbricus terrestris	21	PE	4 Fraktionen: 710-850, 1.180-1.400, 1.700-2.000 und 2.360-2.8000	0.03%	73,6% Sand, 18,8% Schluff und 7,6 % Ton	Transport von MP	Würmer transportieren MP in den Boden, je kleiner die Partikel sind, desto weiter nach unten. Die beiden kleineren MP-Fraktionen konnten im Wurmkot nachgewiesen werden. MP aller Größen haftet sich an Würmer an.	(Rillig et al., 2017)
						Mortalität	Keine signifikanten Auswirkungen auf Mortalität.	
						Wachstum	Keine signifikanten Auswirkungen auf Wachstum .	
	14 (Mortalität)	PE	Mischung aus: 50% <50µm, 27% 50-100µm und 23% 100-150µm	MP wurde Futter (*Populus nigra*) in folgenden Konzentrationen beigemengt: 7, 28, 45 und 60%. MP-Konzentration bezogen auf das Substrat: 0,2; 0,4; 0,5 und 1,2%	50% Sand, 50% lehmiger Schluff mit 0,2% organischem Anteil	Mortalität	Keine Auswirkungen auf die Mortalität nach 14 Tagen. Nach 60 Tagen signifikant erhöhte Mortalität bei den MP-Konzentrationen 0,4 und 1,2%.	(Huerta Lwanga et al., 2016a)
	60 (Mortalität, Wachstum und Reproduktion)					Reproduktion	Keine signifikanten Auswirkungen auf Reproduktion.	
						Wachstum	Signifikant erhöhtes Wachstum bei der Kontrolle und der MP Konzentrationen von 0,2%.	
	4	PE	Mischung aus: 40% <50 und 60% 63-150	7, 28, 45 und 60% im Futter	Futter *Populus nigra*	Ausscheidungen und MP-Konzentration im Wurmkot	Die Ausscheidungsrate war bei der MP-Konzentration von 45% signifikant höher als bei 7%. Die Konzentration von MP im Wurmkot bei 7% signifikant höher als bei 45 und 60%. Konzentration von MP <50µm im Wurmkot deutlich erhöht gegenüber Substrat. Entweder selektiver Verzehr oder Zerkleinerung.	
	14	LDPE	Mischung aus: 40% <=50 und 60% 63-150	7, 28, 45 und 60% im Futter (*Populus nigra*), keine Angaben zur Konzentration im Substrat	50% Sand, 50% lehmiger Schluff mit 0,2% organischem Anteil	Wachstum	Gewichtsabnahme bei allen Würmern (inklusive Kontrolle).	(Huerta Lwanga et al., 2016b)
						Gang-Charakteristik	Bei einer Konzentration von 7 % wurden signifikant mehr Tunnel festgestellt. Die Tunnelbildung je Masse Wurm wies jedoch keine signifikanten Unterschiede auf.	
						MP in Gängen	Bei allen MP-Konzentrationen konnte MP in den Tunneln nachgewiesen werden. Größenselektiver Transport von MP <50µm in den Boden.	
	28	HDPE	durchschnittliche Fläche der MP-Stücke betrug 0,92 ± 1,09 mm²	0.35%	52% Sand, 48% Schluff und 1% Lehm	Mortalität	Keine signifikanten Auswirkungen auf Mortalität.	(Hodson et al., 2017)
						Wachstum	Keine signifikanten Auswirkungen auf Wachstum.	
						Ausweichtest, MP-Aufnahme	Würmer meiden mit MP versetztes Substrat nicht. Würmer halten kein MP in ihrem Darm zurück.	
	35	PE-Mikrofasern	Durchschnittliche MF Länge 361.6 ± 387.0 µm und Durchmesser s 40.7 ± 3.8 µm	0,1 und 1,0%	Ackerboden	Mortalität	Keine signifikanten Auswirkungen auf Mortalität.	(Prendergast-Miller et al., 2019)
						Wachstum	Keine signifikanten Auswirkungen auf Wachstum.	
						Ausweichtest, MP-Aufnahme	Würmer meiden mit MP versetztes Substrat nicht. Mikrofasern in Wurmkot gefunden.	

Tabelle 4: Übersicht über bisher durchgeführte Studien bezüglich der Auswirkungen von Mikroplastik auf Regenwürmer (2/2)

Wurmart	Dauer [in Tagen]	MP-Art	MP-Größe [in µm]	MP-Konzentration [% TM]	Substrat	Erhobene Parameter	Ergebnisse	Autoren
Eisenia andrei	56	biologisch abbaubares MP	Keine Angabe	1.25%	70% Quarzsand, 10% Ton, 16% gesiebter Ackerboden, 4% gesiebter reifer Kompost	Mortalität	Keine signifikanten Auswirkungen auf Mortalität.	(Sforzini et al., 2016)
						Reproduktion	Keine signifikanten Auswirkungen auf Reproduktion.	
	28	LDPE	250-1.000	0,00625%, 0,0125%, 0,025%, 0,05% und 0,1%	Torf, Kaolin und Quarzsand nach OECD 222	Mortalität	Keine signifikanten Auswirkungen auf Mortalität.	(Rodriguez-Seijo et al., 2017)
						Reproduktion	Keine signifikanten Auswirkungen auf Reproduktion.	
						Wachstum	Keine signifikanten Auswirkungen auf Wachstum. Beweise für Schäden und Reaktionen des Immunsystems auf MP.	
	21	PE	180-212 und 250-300	0,1%	lehmiger Sand	MP-Reduktion	Würmer zerkleinern MP.	(Kwak und An, 2021)
Eisenia fetida	28	LDPE	250-1.000	0,00625%, 0,0125%, 0,025%, 0,05% und 0,1%	Torf, Kaolin und Quarzsand nach OECD 222	Mortalität	Keine signifikanten Auswirkungen auf Mortalität.	(Rodriguez-Seijo et al., 2018)
						Wachstum	Keine signifikanten Auswirkungen auf Reproduktion.	
						Biomarker	Signifikante Auswirkungen auf Biomarker bei höheren MP-Konzentrationen.	
	14	PS	0,1 und 1,3	0,00001 und 0,0001%	70% Sand, 20% Kaolin Ton und 10% Kuhdung	Mortalität	Signifikante Auswirkungen auf Mortalität festgestellt.	(Jiang et al., 2020)
						Wachstum	Signifikante Auswirkungen auf Wachstum festgestellt.	
	30	PS	58	0,25%, 0,5%, 1% und 2%	40% Sand, 60% Erde	Mortalität	Signifikante Auswirkungen auf Mortalität, außer bei 1%.	(Cao et al., 2017)
						Wachstum	Signifikante Unterschiede bei hohen MP-Konzentrationen auf Wachstum.	
	2	HDPE, PET, PVC	<2.000	0.50%	3 verschiedene Böden: Sand, Ton und Lehm + Bioabfall	Ausweichtest	Würmer meiden mit MP versetztes Substrat nicht.	(Judy et al., 2019)
	56	HDPE, PET, PVC	<2,000	0,01; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0%		Mortalität	Keine signifikanten Auswirkungen auf Mortalität.	
						Reproduktion	Keine signifikanten Auswirkungen auf Reproduktion.	
						Wachstum	Keine signifikanten Auswirkungen auf Wachstum festgestellt.	

3. Material und Methode

3.1 Versuchsaufbau

In der vorliegenden Masterarbeit wurden die Auswirkungen von MP der Kunststoffe PET, PVC und PP auf die Regenwurmarten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* untersucht. Dafür wurden die Würmer in Reaktoren für die Dauer von 28 Tagen MP ausgesetzt. Das MP befand sich entweder schon im Substrat (PET & PVC) oder wurde kontinuierlich dem Futter (PP) beigemengt. Es wurden verschiedene MP-Größenfraktionen (F1 >630 µm; F2 630-200 µm; F3 200-63 µm; F4 <63 µm) und Konzentrationen (0,002 - 1,0%) bezogen auf die TM untersucht. Es gab drei Versuchsansätze (für jede Kunststoffart einen), die jeweils im Triplikat und gegenüber vier Kontrollen ohne MP durchgeführt wurden. Jeweils 20 Würmer wurden in die Versuchsreaktoren eingesetzt. Sie wurden regelmäßig mit geschnittenem Salat gefüttert und das Substrat wurde mit deionisierten Wasser befeuchtet, um einen Wassergehalt von etwa 35 % TM zu erreichen. Die Reaktoren waren entweder in einer Klimakammer bei konstanten Bedingungen von 25 °C oder nach dem Sommer bei Raumtemperatur in einem Versuchsraum aufgestellt.

In jedem der drei Versuchsansätze wurden insgesamt 40 Versuchsreaktoren mit Substrat und Würmern befüllt. Um die verschiedenen Fraktionen und Konzentrationen zu kennzeichnen, wurden die Versuchsreaktoren nach einem einheitlichen Muster beschriftet:

PET F2 3 C1

Zuerst wurde die MP-Art (PET, PVC oder PP) angegeben. Danach folgte die MP-Größenfraktion (F1-F4). Die nächste Nummer bezieht sich auf die Nummer des Triplikats (1-3). Zuletzt wurde noch die MP-Konzentration angegeben (C1-C3). Die untersuchten Konzentrationen haben sich dabei im Zuge der Masterarbeit verändert, die Größenfraktionen nicht. Das obige Beispiel ist also ein Versuchsreaktor der Untersuchungen von PET mit der MP-Größe 630-200 µm. Es handelt sich um den dritten Versuchsreaktor des Triplikats mit einer Konzentration von 0,2 %. Die vier Kontrollen wurden mit einem „C“ gekennzeichnet (C1-C4).

3.2 Versuchsreaktoren

Nach jedem der drei Versuchsansätze wurden die Reaktoren evaluiert und an aufgetretene Probleme angepasst. Dadurch kamen verschiedene Versuchsreaktoren zum Einsatz.

3.2.1 1. Versuchsansatz

Für den 1. Versuchsansatz mit PET wurden runde Metallgefäße mit einem Durchmesser von 19 cm und einer Höhe von 6 cm verwendet. Um in einem Metallgefäß zwei Versuchsansätze durchführen zu können, wurden diese durch Trennwände (zugeschnittenes Polystyrol 2 mm) in zwei Teile unterteilt. Die Trennwände wurden mit Hilfe von Kunststoffschläuchen und Sanitärsilikon abgedichtet. Als Abdeckung wurde zuerst mit Luftlöchern ausgestattete Alufolie auf die Trennwand geklebt und an den Rändern festgedrückt.

Da ein Tag-Nacht-Rhythmus (12-12 Stunden) simuliert werden sollte, wurde die Alufolie an Wochentagen täglich geöffnet. Nach 20 Tagen wurde die Alufolie durch eine mit Luftlöchern ausgestattete Plexiglasscheibe ersetzt. Die Trennwände wurden

mit einem Dichtband ausgestattet und in der Klimakammer wurde eine Lampe mit Zeitschaltuhr installiert. Damit verringerte sich der Pflegeaufwand der Versuche erheblich.

Wie sich während des Versuchs schon zeigte und ebenso bei der anschließenden Erhebung der Würmer, war es einigen Würmern bei diesem Reaktortyp möglich, den Versuchsreaktor zu verlassen. Die Würmer sind dabei entweder in andere Reaktoren gelangt oder außerhalb der Reaktoren verendet.

Abbildung 5: Versuchsreaktoren im 1. Versuchsansatz, links und Mitte: Versuchsreaktoren beim Beginn des 1. Versuchsansatzes mit und ohne Alufolie (beide Clarissa von Au, rechts: Weiterentwickelter Versuchsreaktor (Eigene Aufnahme)

3.2.2 2. Versuchsansatz

Nachdem es den Würmern im 1. Versuchsansatz mit PVC möglich war sich zwischen den Reaktoren zu bewegen, wurde für den zweiten Versuchsansatz ein neuer Reaktortyp konzipiert. Hierfür wurden Aluschalen (Grilltassen) an der Oberkante mit einer selbstklebenden Schaumstoffdichtung ausgestattet. Die Reaktoren wurden dann wieder durch mit Luftlöchern ausgestattete Plexiglasscheiben abgedichtet und zusätzlich mit Gewichten beschwert, um den Würmern ein Entkommen aus den Reaktoren zu erschweren. Nachdem anfangs allerdings zu wenige Gewichte verwendet wurden, gelang es Würmern der Fraktionen F1, F2 und F3 abermals sich zwischen den Reaktoren zu bewegen.

Abbildung 6: Versuchsreaktoren im 2. Versuchsansatz (Eigene Aufnahmen)

3.2.3 3. Versuchsansatz

Beim 3. Versuchsansatz mit PP kamen drei verschiedene Versuchsreaktoren zum Einsatz. Erstens die Metallgefäße vom 1. Versuchsansatz allerdings ohne Trennwand und abgedichtet mit Hilfe eines mit Gummiband abgedichteten Pollengitters. Außerdem kamen Kunststoffgefäße mit einem Durchmesser von ebenfalls 19 cm und einer Höhe von 7 cm zum Einsatz. Diese wurden ebenfalls mit Pollengitter und

Gummiband abgedichtet. Die Metall- und Kunststoffgefäße wurden zusätzlich noch mit Plexiglasscheiben abgedichtet, die mit Luftlöchern ausgestattet und mit Gewichten beschwert waren. Da nicht ausreichend Behälter vorhanden waren, kamen auch Aluschalen nach dem Prinzip des 2. Versuchsansatzes zum Einsatz, mit deutlich mehr Gewichten. Bei diesem Versuchsansatz konnten keine Würmer zwischen den Reaktoren wandern.

Abbildung 7: Versuchsreaktoren im 3. Versuchsansatz, drei verschiedene Versuchsreaktoren (Eigene Aufnahmen)

3.3 Substrat

Das Substrat aller drei Versuchsansätze wurde gemäß dem OECD Guideline Test "Guideline for the Testing of Chemicals (222/2016) Earthworms reproduction test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*)"(OECD, 2016) sowie dem Test "Earthworm, Acute Toxicity Tests" (OECD, 1984) gemischt. Dabei bestand das Substrat aus den folgenden Bestandteilen:

- 69,7 % Quarzsand (Rundkorn gewaschen; Korngröße 300-60 µm)
- 20,0 % Kaolin
- 10,0 % Torf (kleingeschnitten)
- 0,3 % Kalziumkarbonat (CaCO3)

Abbildung 8: Mischung und Einwaage des Substrats samt Mikroplastik (Eigene Aufnahmen)

Die einzelnen Bestandteile wurden separat abgewogen und anschließend vermengt. Das Kalziumkarbonat wurde beigemengt um einen pH-Wert von 6,0 ± 0.5 zu erhalten. Um den empfohlenen Wassergehalt von ~35 % TM zu erhalten (OECD, 1984), wurden je 500 g des trockenen Substrats mit 175 ml deionisiertem Wasser vermischt. Für jedes einzelne Experiment wurden somit 675 g gemischtes Substrat verwendet. In den

ersten beiden Versuchsansätzen wurde außerdem noch MP in das feuchte Substrat gemengt.

3.4 Mikroplastik

Für die Versuche wurden die Kunststoffarten PET, PVC und PP gewählt, da sie 2019 nach PE die drei meist nachgefragten Kunststoffe in Europa waren (PlasticsEurope, 2020). Auf die Untersuchung von PE wurde verzichtet, da sich der Großteil der bisher durchgeführten Studien bezüglich der Auswirkungen von MP auf Regenwürmer mit diesem Kunststoff beschäftigt hat (siehe Tabelle 3).

PET-MP wurde aus Getränkeflaschen hergestellt, PVC-MP aus einem Isolationsschlauch und PP-MP aus einem Pflanztopf und, aufgrund von hohen Verlusten bei der Herstellung, auch aus einem Deckel von einem Kübel.

Abbildung 9: Die verschiedenen Ausgangsmaterialien für die Versuche, von links nach rechts: PET (Clarissa von Au), PVC sowie 2x PP (Eigene Aufnahmen)

3.4.1 Herstellung der Partikelgrößen

Zuerst wurden die Kunststoffe PET, PVC und PP händisch mit einer Schere zerschnitten und bei -27 °C tiefgefroren. Dann wurde das MP unter Einsatz von Trockeneis durch Mahlen in der Schneidmühle (Retsch SM 2000) weiterzerkleinert.

Abbildung 10: links: Schneidmühle Retsch SM 2000; rechts: Zentrifugalmühle Retsch ZM 200 (Eigene Aufnahmen)

Anschließend wurde das Material im Verhältnis von 1:2 mit Trockeneis gemischt und in der Zentrifugalmühle (Retsch ZM 200) weiter zerkleinert. Dabei kamen Ringsiebe mit den Lochungen von 0,5 mm und sowie 0,125 mm zum Einsatz.

Abbildung 11: Mikroplastik (PP) nach der Zerkleinerung in der Zentrifugalmühle (Eigene Aufnahmen)

Die dadurch entstandenen Mikroplastikfragmente, die sekundärem Mikroplastik entsprechen, wurden nach dem Trocknen bei 40 °C mittels einer sequenziellen Siebung im Rüttelsieb in folgende Größenfraktionen aufgetrennt: F1 >630 µm; F2 630-200 µm; F3 200-63 µm; F4 <63 µm

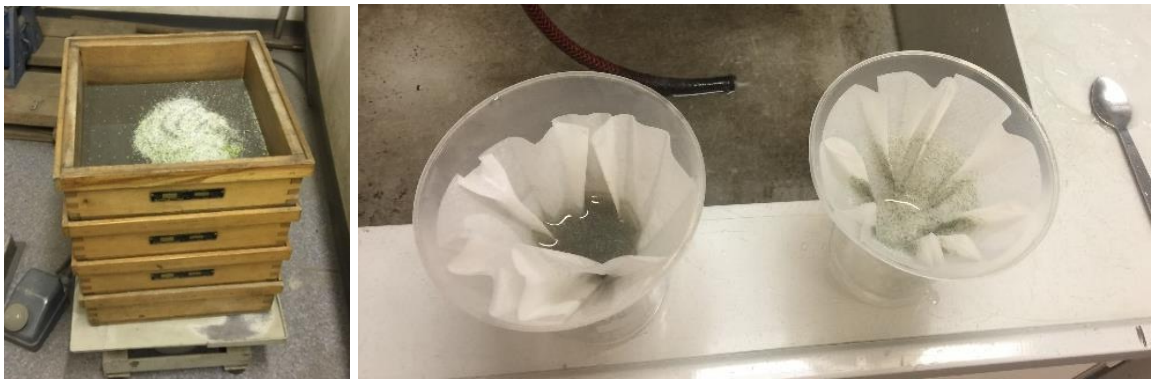

Abbildung 12: links: Siebturm auf Rüttelplatte; rechts: Filtration nach Nasssiebung (Eigene Aufnahme)

Die Erzeugung von größeren Mengen von PP-MP <200 µm fiel dabei besonders schwer. Daher wurden PP-MP F3 und F4 auch mit Hilfe einer Nasssiebung und einer anschließenden Filtration gewonnen.

3.4.2 Mikroplastik-Konzentrationen

Bei den Versuchen mit PET wurde den Reaktoren 0,2 %, 0,02 % und 0,002 % der TM des Substrates (500 g) an MP in den verschiedenen Größenfraktionen hinzugefügt. Also 1 g, 0,1 g und 0,01 g PET-MP und mit dem Substrat vermengt.

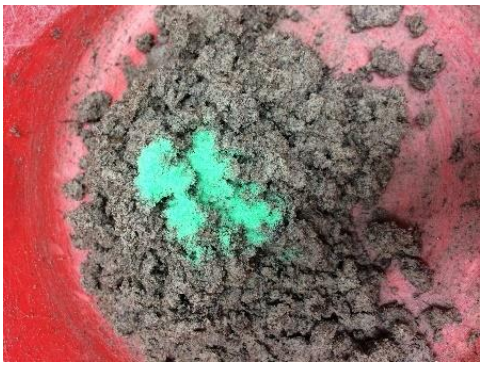

Abbildung 13: Mit PET-MP versetztes Substrat (Clarissa von Au)

Bei PVC wurden die Gewichtskonzentrationen auf 1 %, 0,5 % und 0,1 % bzw. 5 g, 2,5 g und 0,5 g erhöht. Für die Versuche mit PP wurden ebenfalls die Gewichtskonzentrationen auf 1 %, 0,5 % und 0,1 % verwendet. Außer für die kleinste Fraktion F4. Bei F4 wurde aufgrund von Schwierigkeiten bei der Herstellung auf 0,1 %, 0,01 % und 0,001 % bzw. 0,5 g, 0,05 g und 0,005 g umgestellt.

3.4.3 Bestimmung mittels ATR-FTIR-Spektroskopie

Die drei untersuchten MP-Arten wurden mittels ATR-FTIR-Spektroskopie analysiert und mithilfe der Spektraldatenbank des Instituts für Abfallwirtschaft der Universität für Bodenkultur Wien bestimmt.

Im Folgenden sind die ATR-FTIR Charakteristika der untersuchten Kunststoffe sowie die Ergebnisse der Datenbank dargestellt. Die Übereinstimmung der Spektren wird durch die Hit quality angegeben, wobei Werte zwischen 1-1000 erreicht werden können und Spektren mit der höchsten Übereinstimmung gegenüber einem Datenbankspektrum eines bekannten Kunststoffes einen Wert von 1000 erreicht.

ATR-FTIR PET

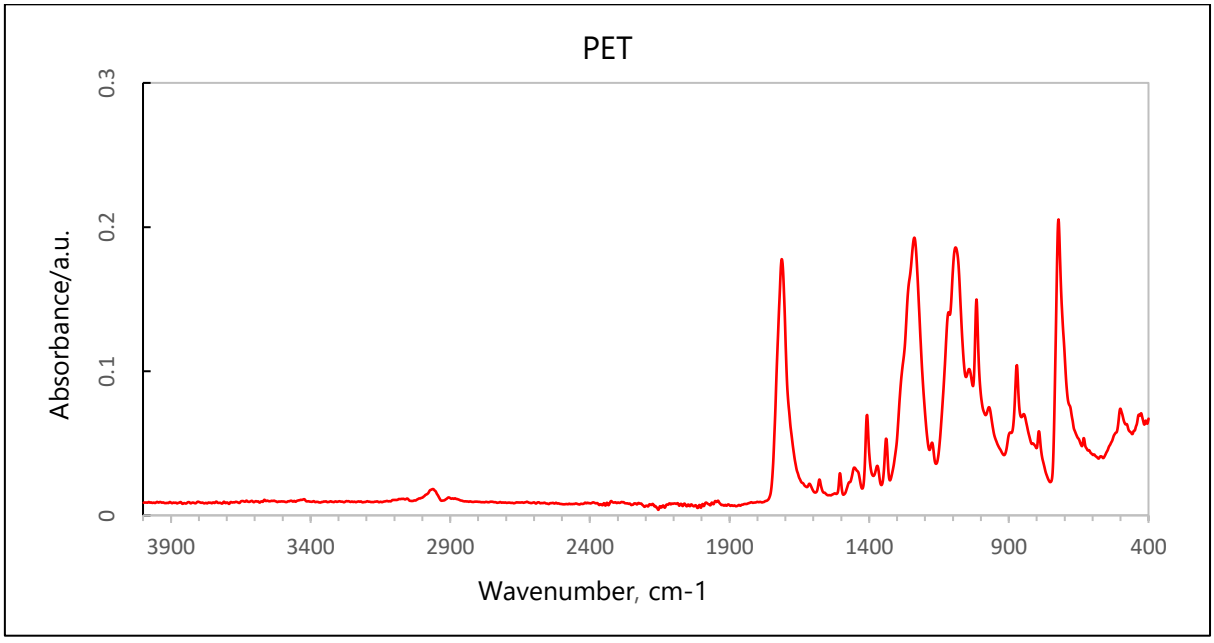

Abbildung 14: Infrarotspektrum des untersuchten PET

Laut der Datenbank handelt es sich um PET (Hit quality 816).

ATR-FTIR PVC

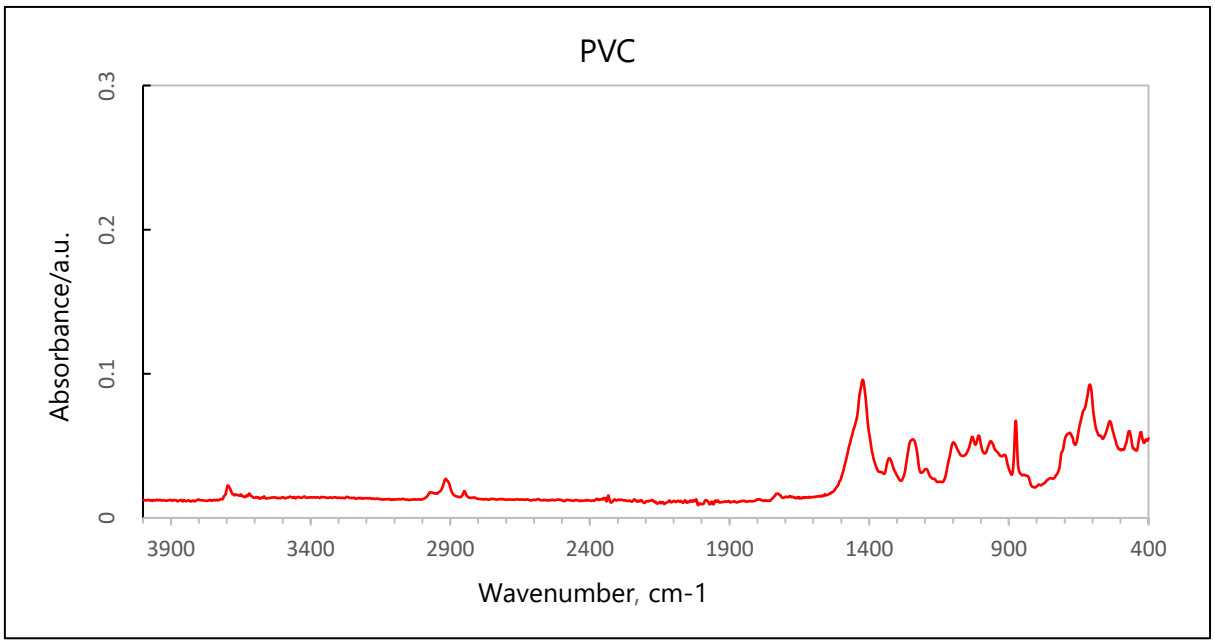

Abbildung 15: Infrarotspektrum des untersuchten PVC

Laut der Datenbank des Instituts handelt es sich um PVC (Hit quality 633).

ATR-FTIR PP

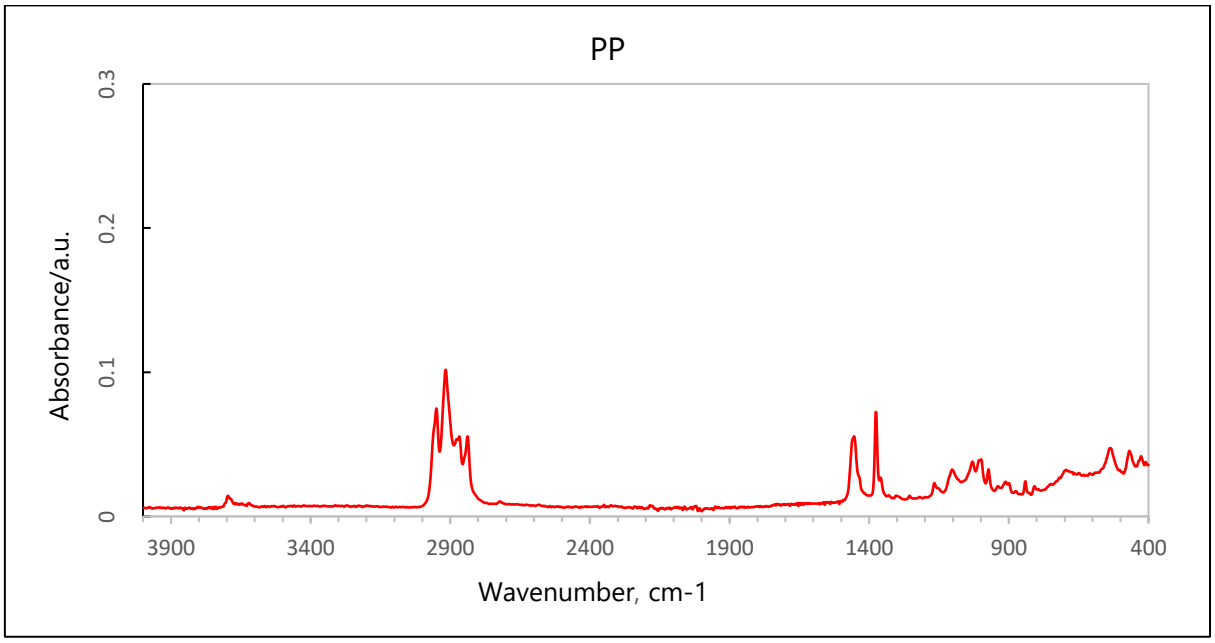

Abbildung 16: Infrarotspektrum des untersuchten PP

Laut der Datenbank des Instituts handelt es sich um PP (Hit quality 867).

3.5 Stereomikroskopische Untersuchungen

Die verschiedenen MP-Fraktionen wurden vor den Versuchen mittels Stereomikroskop in verschiedenen Vergrößerungen dokumentiert und charakterisiert. Ebenso der Quarzsand. Dies diente zum einen zur Dokumentation und zum anderen zur besseren Identifikation von MP-Partikeln bei der Untersuchung der Rückstände nach der Auflösung der Würmer.

3.5.1 Charakterisierung Polyethylenterephthalat

3.5.1.1 Polyethylenterephthalat >630 µm

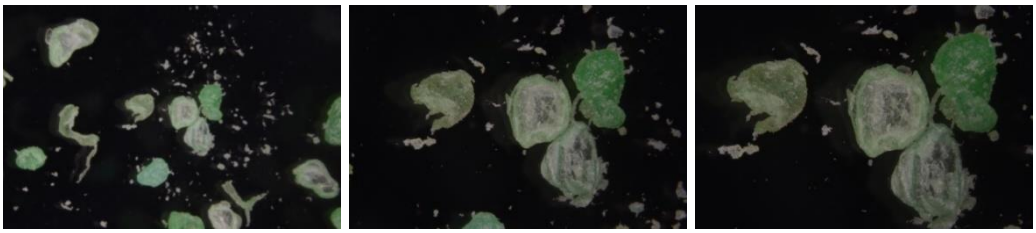

Abbildung 17: PET-MP der Größenfraktion >630 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Leicht durchsichtig bis weiß, und hell bis dunkelgrüne Farbtöne: Vielfältige Formen mit unterschiedlicher Größenverteilung zu erkennen, siehe Abbildung 17.

3.5.1.2 Polyethylenterephthalat 630-200 µm

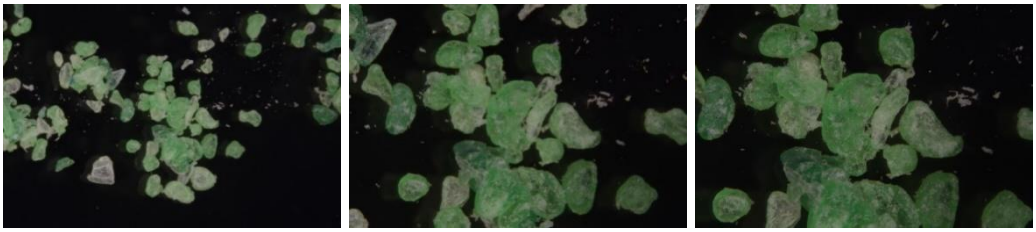

Abbildung 18: PET-MP der Größenfraktion 630-200 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Leicht durchsichtig bis weiß, und hell bis dunkelgrüne Farbtöne: Vielfältige Formen mit unterschiedlicher Größenverteilung zu erkennen, siehe Abbildung 18.

3.5.1.3 Polyethylenterephthalat 200-63 µm

Abbildung 19: PET-MP der Größenfraktion 200-63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Leicht durchsichtig, weiß bis hellgrüne Farbtöne: Sehr vielfältige Formen mit unterschiedlicher Größenverteilung zu erkennen, siehe Abbildung 19.

3.5.1.4 Polyethylenterephthalat <63 µm

Abbildung 20: PET-MP der Größenfraktion <63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Fast nur noch weiße Farbe zu erkennen. Sehr selten hellgrün. Gleichförmiger als die größeren Fraktionen, siehe Abbildung 20.

3.5.2 Charakterisierung Polyvinylchlorid

3.5.2.1 Polyvinylchlorid >630 µm

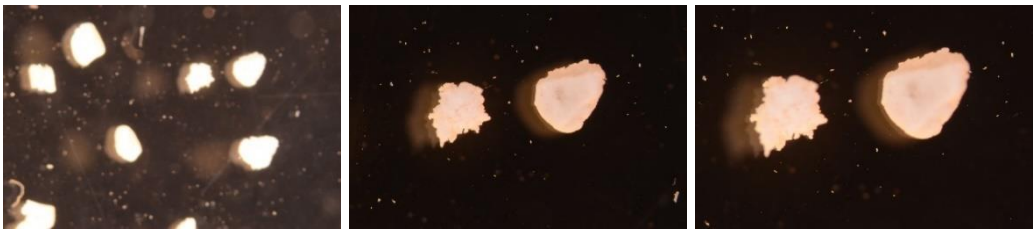

Abbildung 21: PVC-MP der Größenfraktion >630 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Sehr gleichmäßige weiße Färbung. Gleichmäßige Form mit ungleichmäßigen Rändern, siehe Abbildung 21.

3.5.2.2 Polyvinylchlorid 630-200 µm

Abbildung 22: PVC-MP der Größenfraktion 630-200 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Sehr gleichmäßige weiße Färbung. Vielfältige Formen mit ungleichmäßigen Rändern und unterschiedlicher Größenverteilung, siehe Abbildung 22.

3.5.2.3 Polyvinylchlorid 200-63 µm

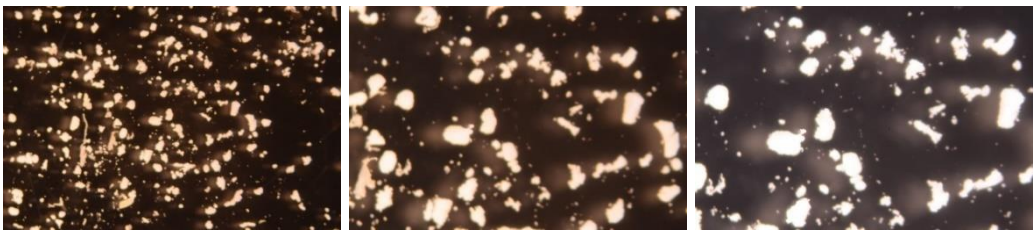

Abbildung 23: PVC-MP der Größenfraktion 200-63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Sehr gleichmäßige weiße Färbung. Vielfältige Formen mit ungleichmäßigen Rändern und unterschiedlicher Größenverteilung, siehe Abbildung 23.

3.5.2.4 Polyvinylchlorid <63 µm

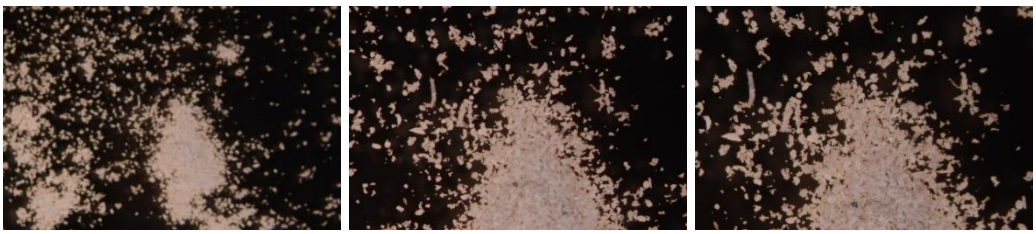

Abbildung 24: PVC-MP der Größenfraktion <63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Sehr gleichmäßige weiße Färbung. Vielfältige Formen mit unterschiedlicher Größenverteilung, siehe Abbildung 24.

3.5.3 Charakterisierung Polypropylen

3.5.3.1 Polypropylen >630 µm

Abbildung 25: PP-MP der Größenfraktion >630 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Schwarz bis gelbgrüne Färbung. Ungleichförmige, kantige Gestalt in ungleichen Größen, siehe Abbildung 25.

3.5.3.2 Polypropylen 630-200 µm

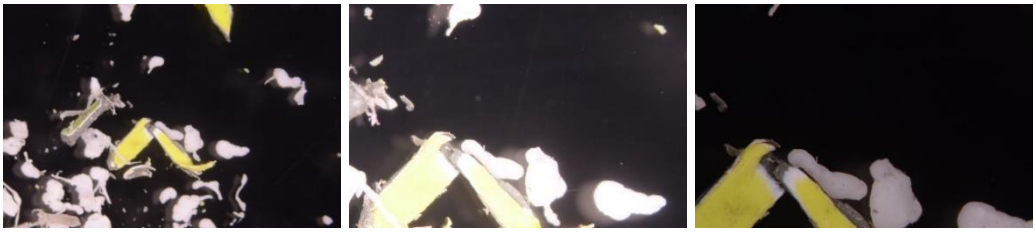

Abbildung 26: PP-MP der Größenfraktion 630-200 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Die zwei Ausgangsstoffe sind deutlich zu erkennen. Zum einen weiße, abgerundete Partikel mit gleichmäßiger Größenverteilung, zum anderen schwarz bis gelbgrüne, längliche Partikel, siehe Abbildung 26.

3.5.3.3 Polypropylen 200-63 µm

Abbildung 27: PP-MP der Größenfraktion 200-63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen

Die zwei Ausgangsstoffe sind deutlich zu erkennen. Zum einen weiße, abgerundete Partikel mit einer gleichmäßigeren Größenverteilung, zum anderen schwarz bis gelbgrüne, längliche Partikel mit ein ungleichmäßigeren Größenverteilung, siehe Abbildung 27. Die Partikel dieser Größenfraktion dürften bei den Aufnahmen von einander angezogen worden sein, daher erscheint es, als wären es nur sehr wenige Partikel auf den Aufnahmen.

3.5.3.4 Polypropylen <63 µm

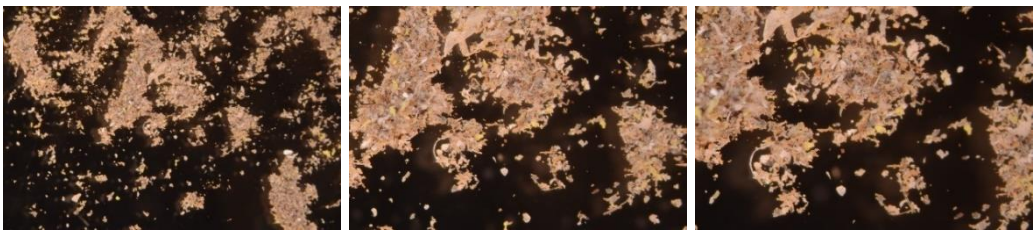

Abbildung 28: PP-MP der Größenfraktion <63 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Weiße bis graue Färbung, mit wenigen gelbgrünen Partikeln. Sehr unterschiedliche Größenverteilung und Form, siehe Abbildung 28.

3.5.4 Charakterisierung Quarzsand

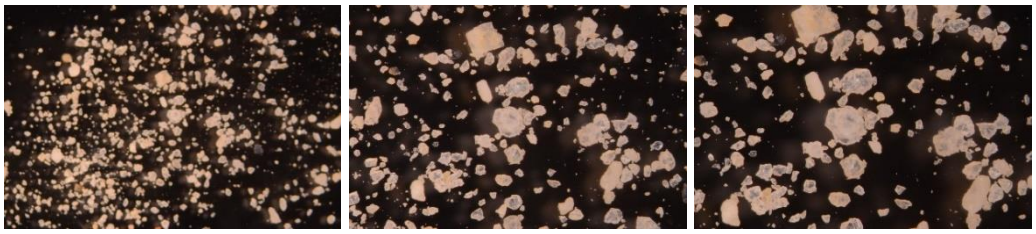

Abbildung 29: Quarzsand der Größenfraktion 300-60 µm; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Leicht durchsichtig, weiß bis gelblich gefärbt. Kristallstruktur klar erkennbar, sehr kantig. Sehr unterschiedliche Größenverteilung, siehe Abbildung 29.

3.6 Würmer

Für die vorliegende Masterarbeit wurden Regenwürmer der Arten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* ausgewählt, weil diese Regenwürmer, wie schon erwähnt, eine wichtige Testspezies in mehreren ökotoxikologischen Standardtests sind (OECD, 2016, 1984) Außerdem sind sie wichtig für den Erhalt der Bodenstruktur, für die Belüftung und die Durchlässigkeit des Bodens sowie für den Abbau organischer Substanz (Button et al., 2010).

Abbildung 30: links und Mitte: Bilder von der Vermigrand Naturprodukte GmbH, rechts: Regenwürmer vor dem Einsetzen in den Versuchsreaktor (Eigene Aufnahmen)

Die Vermigrand Naturprodukte GmbH hat die Regenwürmer der Arten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* für die drei Versuchsansätze zur Verfügung gestellt. Bei den Ansätzen wurde darauf geachtet möglichst nur adulte Tiere (erkennbares Clitellum) zu

verwenden. Aufgrund der begrenzten Anzahl an verfügbaren Würmern war dies allerdings nicht immer möglich. Daher wurden auch Würmer für die Versuchsansätze herangezogen, bei denen kein Clitellum zu erkennen war.

3.7 Pflege und Kontrolle

Während des 1. Versuchsansatzes wurden die Würmer drei Mal wöchentlich gefüttert und mit deionisierten Wasser versorgt. Außerdem wurde einmal wöchentlich kontrolliert, ob noch lebende Würmer vorhanden sind, um die Mortalität aller Würmer auszuschließen. Dabei wurde die oberste Substratschicht untersucht.

Bei den Versuchsansätzen 2 und 3 wurden die Würmer wöchentlich mit Salat und deionisierten Wasser versorgt. Auf eine Kontrolle wurde verzichtet, da der Salat immer zumindest zu einem Teil verzehrt wurde.

Der Salat wurde von der Billa Plus Filiale Muthgasse (zum Zeitpunkt der Versuche noch Merkur) zur Verfügung gestellt. Regenwürmer können täglich die Hälfte oder mehr ihres Körpergewichts als organische Substanz zu sich nehmen (Evans und Furlong, 2010). Beim Ansatz des 1. Versuchsansatzes betrug der Mittelwert an Wurmbiomasse aller 40 Versuchsreaktoren 4,41 g. Um den Würmern ausreichend Futter zur Verfügung zu stellen, wurden sie mit 2 g Futter je Tag versorgt. Der Salat wurde dabei in allen Versuchen klein geschnitten und oberflächig auf das Substrat ausgebracht. In den weiteren Versuchsansätzen wurden die 2 g Futter je Tag beibehalten.

Abbildung 31: Salat als Futter der Würmer (Eigene Aufnahmen)

Im 3. Versuchsansatz wurde das MP nicht in das Substrat gemengt, sondern ins Futter. Daher wurde ein Teil des Salates geschnitten und mit dem MP vermengt. Dieses Gemisch wurde anschließend auf einem Salatblatt liegend auf das Substrat aufgebracht. Damit sollte sichergestellt werden, dass das gesamte MP am Futter der Würmer festhaftet. Besonders bei den MP-Konzentrationen von 1 % wäre ansonsten ein erheblicher Teil des MP direkt auf die Substratoberfläche gelangt. Um zu gewährleisten, dass die Würmer im 3. Versuchsansatz das mit MP versetzte Futter zu sich nehmen, wurde gegen Ende des Versuchsansatzes weniger Salat zugefüttert.

Die Zugabe an deionisierten Wasser wurde an den gemessenen Wasserverlust der Versuchsreaktoren angepasst und betrug in der Regel 20 ml je Woche.

Abbildung 32: Mikroplastik (PP) mit Salat gemischt, 3. Versuchsansatz (Eigene Aufnahmen)

3.8 Analyse der Wurmparameter

Für Versuche wurden möglichst adulte Tiere ausgewählt, mit deionisierten Wasser gewaschen, auf Papierhandtüchern getrocknet und anschließend gewogen. Außerdem wurden zur Dokumentation und für eine mögliche weitere Bestimmung noch Fotos und Videos der Würmer gemacht. Dafür wurden die Würmer auf einer Kunststoffplatte mit einem Lineal zur Größenbestimmung abgelegt.

Beim 1. Versuchsansatz wurden wöchentlich, die sich auf der Oberfläche befindenden Würmer gezählt und gewogen, um festzustellen, ob sich noch lebende Würmer im Substrat befinden. Außerdem wurden die Würmer bei der wöchentlichen Kontrolle fotografiert und gefilmt. Bei den Versuchsansätzen 2 und 3 wurde darauf verzichtet.

Nach 28 Tagen wurden die Würmer den Reaktoren entnommen und gezählt. Alle gefundenen Würmer wurden anschließend wieder gewaschen, getrocknet, gewogen, fotografiert und gefilmt. Dabei wurde auch auf Auffälligkeiten bei den Würmern sowie beim Substrat geachtet. Alle Würmer wurden anschließend für weitere Untersuchungen separat in verschiedenen Behältern tiefgefroren.

- **Reproduktion der Würmer**

Zur Ermittlung der Reproduktion der Würmer wurde das Substrat auf Kokons und Jungwürmer untersucht.

- **Mortalität der Würmer**

Die Mortalität der Würmer wurde als Prozentsatz der Veränderung an Würmern je Versuchsreaktor berechnet.

- **Wachstum der Würmer**

Das Wachstum wurde als Veränderung der Einzelwurmbiomasse ermittelt. Das gemessene Gewicht der Wurmbiomasse wurde durch die Ausgangspopulation an Würmern (20) je Versuchsansatz dividiert, um die mittlere Einzelwurmbiomasse je Versuchsreaktor zu berechnen. Analog dazu wurde auch nach Beendigung der Versuche vorgegangen, wobei die gefundene Anzahl der adulten Würmer je Versuchsreaktor herangezogen wurde. Aus der Differenz dieser beiden Werte wurde die Veränderung der Einzelwurmbiomasse berechnet. Hieraus wurde dann ebenfalls die prozentuelle Veränderung an Einzelwurmbiomasse errechnet.

3.8.1 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten zu den Wurmparametern wurden mithilfe von Microsoft Excel und der Statistik-Software Sigmaplot ausgewertet. Dabei wurden zuerst die erhobenen Wurmparameter in Excel übertragen, um anschließend die Veränderungen der einzelnen Versuche und die Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate zu berechnen.

Die dabei berechneten Daten wurden anschließend in Sigmaplot einer zweifaktoriellen Varianzanalyse unterzogen. Mittels Bonferroni-Paarvergleichen wurden signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Parametern festgestellt.

Signifikante Unterschiede werden im Text samt p-Wert angegeben. In den Abbildungen werden die Signifikanzen mithilfe von Sternen dargestellt (*: p≤0,05, **: p≤0,01, ***: p≤0,001). Die relevanten Auszüge von Sigmaplot sind in Anhang 3 zu finden.

3.9 Untersuchungen des Mikroplastiks

3.9.1 Entwicklung eines Verfahrens

Um festzustellen, ob Würmer das MP aufnehmen und gegebenenfalls weiter zerkleinern, wurde ein eigenes Verfahren konzipiert. Die Wurmmasse sollte mithilfe von Säure aufgelöst werden, um anschließend die Rückstände zu untersuchen. Dabei sollten die Rückstände zuerst auf MP untersucht werden. Danach sollte evaluiert werden, ob das MP weiter zerkleinert wurde.

Zur Erprobung des Verfahrens wurde zunächst untersucht, ob sich MP-Partikel durch das Verfahren auflösen lassen. Dafür wurden jeweils 0,3 g MP und 10 ml Salpetersäure in Glasphiolen gefüllt. Nach einer Wartezeit von 10 Minuten wurden bei verschiedenen Temperaturen (100 °C, 150 °C und 200 °C) Versuchsdurchläufe in der Mikrowelle MARS 6 durchgeführt. Nach Ende der Behandlung in der Mikrowelle und einer Abkühlphase, wurden die Proben unter einem Abzug geöffnet.

Abbildung 33: links: MP in den Glasphiolen; rechts: MARS 6 Mikrowelle (Eigene Aufnahmen)

Der Inhalt der Glasphiolen wurde mit deionisiertem Wasser ausgespült und durch zuvor abgewogene Papierfilter abfiltriert. Die Filter wurden für mehrere Stunden bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend erneut abgewogen. Aus der Differenz der beiden Gewichte wurde der MP-Rückstand errechnet. In Tabelle 5 werden die drei Versuchsdurchläufe verglichen.

Tabelle 5: Ergebnisse der Versuchsdurchläufe zur Entwicklung eines Verfahrens, um das MP aus den Würmern zu extrahieren

Temperatur	MP >630 µm	Gewicht getrockneter Filter [mg]	Gewicht getrockneter Filter nach Filtration [mg]	MP-Rückstand [mg]	MP-Rückstand in % von 300 mg Einwaage
100 °C	PET	998	1.217	219	73.0%
		918	1.172	254	84.7%
		936	1.183	247	82.3%
	PVC	1.024	1.291	267	89.0%
		883	1.157	274	91.3%
		983	1.255	272	90.7%
	PP	901	894	-7	-2.3%
		1.001	1.245	244	81.3%
		940	939	-1	-0.3%
150 °C	PET	947	1.142	195	65.0%
		941	1.150	209	69.7%
		960	1.177	217	72.3%
	PVC	1.032	1.273	241	80.3%
		953	1.208	255	85.0%
		1.027	1.281	254	84.7%
	PP	1.059	1.040	-19	-6.3%
		1.084	1.068	-16	-5.3%
		1.001	980	-21	-7.0%
200 °C	PET	824	921	97	32.3%
		847	1.038	191	63.7%
		969	1.145	176	58.7%
	PVC	797	847	50	16.7%
		945	1.000	55	18.3%
		842	908	66	22.0%
	PP	856	851	-5	-1.7%
		878	878	0	0.0%
		782	778	-4	-1.3%

Die Behandlung bei 100 °C wies die höchsten Rückstandsquoten auf und wurde daher als Untersuchungsmethode für die Versuchsansätze gewählt. Allerdings konnten nur bei PET und PVC Rückstände festgestellt werden. Bei PP hingegen war dies nicht der Fall. Daher wurde auf die Auflösung der Würmer aus den Versuchen mit PP verzichtet.

3.9.2 Verfahren zur Auflösung der Würmer

Untersucht wurden zwei der drei Triplikate aus den Versuchen mit den Größenfraktionen >630 µm, 630-200 µm und 200-63 µm jeweils in der höchsten Konzentration (PET: 0,2 % und PVC: 1,0%). Um die tiefgefrorenen Würmer in der Mikrowelle untersuchen zu können, wurden sie für 24 Stunden im Gerät Cryodos des Unternehmens TelStar gefriergetrocknet.

Untersucht wurden jeweils 300 mg gefriergetrocknete Wurmmasse mit 10 ml Salpetersäure in der Mikrowelle bei 100 °C.

Abbildung 34: links: gefrorene Wurmproben; rechts: Gefriertrockner Cryodos von TelStar (Eigene Aufnahmen)

3.9.3 ATR-FTIR Analyse

Für die Analyse der anfänglichen MP-Partikel sowie der aus den Würmern extrahierten MP-Partikeln wurde die „Attenuated total reflection-Fourier transform infrared“ (ATR-FTIR) verwendet. Das verwendete Gerät war ein Bruker ALPHA-P mit einem Detektionsbereich von 4.000 – 400 $cm^{-1.}$

Dabei werden die zu untersuchenden Materialien gegen einen ATR-Diamantenkristall gepresst und in einem bestimmten Winkel mit einem Infrarotstrahl beleuchtet. Der Infrarotstrahl wird dabei von der Probenoberfläche zurückgeworfen. Dadurch entstehen evaneszente Wellen, die sich über den ATR-Diamantenkristall hinaus ausbreiten. Bei Berührung der Probe durch den ATR-Diamantenkristall wird der Infrarotstrahl teilweise absorbiert. Diese Absorptionsspektren zeichnet das Gerät auf. (Guerrero-Pérez und Patience, 2020)

Jede Probe wurde vier Mal gemessen, um einen Mittelwert der Absorptionsspektren zu bilden. Dieser wurde außerdem gegen die Umgebungsluft korrigiert. Mithilfe der ATR-FTIR Analyse sollten die aus den Würmern extrahierten MP-Partikel zweifelsfrei als MP-Partikel identifiziert werden.

3.10 Untersuchungen des Substrats

3.10.1 Wassergehalt

Um den Wassergehalt zu ermitteln, wurden die Proben vor und nach dem Trocknen für 24 Stunden bei 105 °C gewogen. Die Differenz zwischen Feuchtmasse (FM) und TM dividiert durch die Feuchtmasse entspricht dem Wassergehalt in Prozent der Feuchtmasse.

Das Substrat wies zu Versuchsbeginn einen Wassergehalt von 27,3 % FM aus.

3.10.2 pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit

Um den pH-Wert und die elektrische Leitfähigkeit zu ermitteln, wurde jeweils ein Eluat hergestellt. Hierfür wurden 10 g Substrat (1 Masseanteil) mit 100 ml deionisierten Wasser (10 Volumenanteile) in ein Probefläschchen gefüllt. Dieses wurde zuerst drei Stunden lang in einem Überkopfschüttler vermengt und anschließend mit einem Faltenfilter gefiltert.

Für die pH-Wert-Messung wurde das pH Meter WTW pH 531 nach einer geeigneten Kalibration verwendet. Der pH-Wert des Substrats betrug 6,75.

Für die Messung der elektrischen Leitfähigkeit wurde das Konduktometer WTW LF 318 nach einer geeigneten Kalibration verwendet. Es misst den Ohm'schen Widerstand und berechnet daraus die elektrische Leitfähigkeit bei 25 °C. Um diesen Wert auf eine Temperatur von 20 °C beziehen zu können, wurde er mit 0,90446 multipliziert.

Die Leitfähigkeit bei 25 °C betrug 0.28 mS/cm. Umgerechnet auf eine Temperatur von 20 °C betrug die Leitfähigkeit 0.25 mS/cm.

3.10.3 Glühverlust

Für den Glühverlust wurden die getrockneten Proben (24 Stunden bei 105 °C) in der Schneidmühle (Retsch SM 2000) feingemahlen. Anschließend wurden jeweils zwei Keramikbehälter mit mindestens 6 g Probe eingewogen, bei 105 °C für 3 Stunden getrocknet und anschließend im Exsikkator ausgekühlt, um die Restfeuchte zu bestimmen. Danach wurden die Proben in einen Muffelofen von Nabertherm bei 550°C für 5 Stunden verbrannt. Der Muffelofen wurde zuvor für 7 Stunden vorgeheizt, bis 550°C erreicht waren. Nach der Verbrennung im Muffelofen blieb der anorganische Anteil der Probe als Aschegehalt in den Keramikgefäßen zurück, während die organischen Bestandteile bei 550°C verbrannt wurden. Die Proben wurden nach dem Auskühlen im Exsikkator ausgewogen. Die Differenz zwischen Trockensubstanz und Aschewert ist der Glühverlust und wird in Prozent der Trockensubstanz ausgedrückt. Der Glühverlust wurde stets im Duplikat durchgeführt.

Abbildung 35: Glühverlust, v. l. n. r.: Einwaage der Proben, Abkühlen im Exsikkator und Muffelofen (Eigene Aufnahmen)

3.10.4 Gesamter organischer Kohlenstoff, Gesamtstickstoff und -kohlenstoff

Um den gesamten organischen Kohlenstoff (TOC) und den gesamten anorganischen Kohlenstoff (TIC) zu erhalten, kam das Gerät vario MAX CNS der Firma Elementar zum Einsatz. Dabei wurde zum einen die Ausgangsprobe (gemahlen und getrocknet für 24h bei 105 °C) analysiert, um den Gesamtkohlenstoff (TC) zu bestimmen. Zum anderen wurde die Asche analysiert, die bei der Ermittlung des Glühverlusts zurückgeblieben ist und somit keinen organischen Anteil mehr enthält, um den TIC zu ermitteln. Der TOC wurde aus der Differenz von TC und TIC ermittelt. Alle Werte sind in % TM angegeben.

Jeweils 200 mg der Proben wurden in dem Gerät bei 900 °C unter ständiger Sauerstoffzufuhr verbrannt. Dabei entstehen Kohlendioxid CO_2 und Stickoxid NO_X, die jeweils gemessen werden. Jede Bestimmung erfolgte im Duplikat.

Für die Kalibration des Geräts wurde jeweils drei Mal 90 mg L-Glutaminsäure eingewogen, um das Gerät mit den bekannten Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt dieser Säure auf Richtigkeit zu prüfen.

Abbildung 36:Abbildung 36: Gerät vario MAX CNS der Firma Elementar (Eigene Aufnahme)

3.10.5 Nitratstickstoff

Nitratstickstoff (NO_3-N) wurde mithilfe des Photometers HACH LANGE DR 5000 ermittelt. Durch das Beimengen von Chemikalien entsteht eine rötliche Lösung, die mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 324 nm gemessen werden kann. Die Untersuchungen wurden nach der Methode des Instituts für Abfallwirtschaft der Universität für Bodenkultur Wien durchgeführt und im Folgenden kurz beschrieben.

Folgende Lösungen wurden für die Untersuchung benötigt:

<u>Säuremischung</u>

Schwefelsäure (H_2SO_4) + Orthophosphorsäure (H_3PO_4) im Verhältnis 1:1

<u>Farbreagenz</u>

0,12 g 2,6-Dimethylphenol + 100 ml Essigsäure (CH_3COOH)

<u>Stammlösung</u>

0.3609 g Kaliumnitrat (KNO_3) getrocknet bei 105 °C + 1000 ml deionisiertes Wasser

Für die Kalibration des Geräts wurden aus den obigen Lösungen geeignete Kalibrationslösungen hergestellt. Für den Ansatz dieser wurden in einem 25 ml

Messkolben 1 ml Stammlösung, 3-5 Körner Amidosulfonsäure, 8 ml Säuremischung und 1 ml Farbreagenz vermengt. Durch die Hitzeentwicklung wurde die Messung am Photometer bei einer Wellenlänge von 324 nm erst nach 10 Minuten durchgeführt. Aus den Werten wurde eine Kalibrationsgerade ermittelt, siehe Anhang 1.

Die Messung des Eluats erfolgte im Duplikat. Dabei ergab die Untersuchung am Photometer einen Messwert von 10 mg/kg TM.

3.10.6 Ammoniumstickstoff

Ammoniumstickstoff (NH_4-N) wurde mithilfe des Photometers HACH LANGE DR 5000 ermittelt. Ammonium reagiert in den nachfolgenden Lösungen zu einer grünen Lösung, die mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 655 nm gemessen werden kann. Die Untersuchungen wurden nach der Methode des Instituts für Abfallwirtschaft der Universität für Bodenkultur Wien durchgeführt und im Folgenden kurz beschrieben.

Folgende Lösungen wurden für die Untersuchung benötigt:

Salicylat-Citrat-Lösung

13 g Natriumsalycilat ($C_7H_5O_3Na$) + 13 g Natriumcitrat ($C_6H_5O_7Na_3*2H_2O$) + 0,097 g Natriumnitroprussid ($Na_2Fe(CN)_5NO*2H_2O$) + 100 ml deionisiertes Wasser

NaOH-Lösung

3.2 g NaOH + 0,2 g Natriumdichlorcyanorat ($C_3Cl_2N_3NaO_3$) + 100 ml deionisiertes Wasser

Stammlösung

0.4717 g Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$ (getrocknet bei 105 °C) + 1000 ml deionisiertes Wasser

Für die Kalibration des Geräts wurden aus den obigen Lösungen geeignete Kalibrationslösungen hergestellt. Für den Ansatz dieser wurden in einem 25 ml Messkolben jeweils die benötigte Stammlösung gefüllt und bis etwa zur Hälfte mit deionisiertem Wasser angefüllt. Anschließend wurden 2 ml Salicylat-Citrat-Lösung hinzugefügt und durch Schwenken vermengt. Danach wurden 2 ml NaOH-Lösung hinzugefügt und auf 25 ml mit deionisiertem Wasser angefüllt. Nach einer Stunde wurden die Extinktionen am Photometer bestimmt. Aus diesen Werten und einem Blindwert wurde eine Kalibrationsgerade ermittelt, siehe Anhang 1.

Die Messung des Eluats erfolgte im Duplikat. Dabei ergab die Untersuchung am Photometer einen Messwert von 40 mg/kg TM

4. Ergebnisse

4.1 Auswirkungen von Polyethylenterephthalat

4.1.1 Mortalität

Im Versuchsansatz mit PET sind 35 Würmer weniger gefunden worden als in die Versuchsreaktoren eingefügt wurden, siehe Tabelle 8 in Anhang 2. Dies entspricht 4,375 % der zum Einsatz gekommenen Würmer. Da manche Behälter in diesem Versuchsansatz undicht waren, konnte nicht festgestellt werden, ob die Würmer in den Reaktoren oder außerhalb verendet sind. Statistische Untersuchungen bezüglich der Anzahl der Würmer wurden daher bei diesem Versuch nicht durchgeführt.

4.1.2 Reproduktion

Insgesamt sind im Versuchsansatz mit PET 20 junge Würmer geschlüpft. Außerdem wurden insgesamt 65 Kokons in den Versuchsreaktoren gefunden. Wenn man von einem jungen Wurm je Kokon ausgeht, ergibt sich somit eine Reproduktion von mehr als 20 % bezogen auf die anfänglichen 800 Würmer.

Hierzu muss allerdings angemerkt werden, dass lediglich in 7 Versuchsreaktoren junge Würmer und in 21 Versuchsreaktoren Kokons gefunden wurden. Sowohl ein Großteil der jungen Würmer als auch der Kokons wurde in 6 Versuchsreaktoren entdeckt, die aufgrund eines Covid-19-bedingten Betretungsverbots der Versuchsräumlichkeiten erst nach 35 Tagen untersucht werden konnten. Die Reproduktionszahlen dieses Versuchsansatzes wurden daher nicht ausgewertet.

4.1.3 Wachstum

Da lediglich in zwei Versuchsreaktoren alle 20 Würmer gefunden wurden und die Anzahl an gefundenen Würmern ansonsten zwischen 9 und 29 Würmern je Versuchsreaktor variierte, wurden hierzu keine statistischen Untersuchungen durchgeführt.

4.2 Auswirkungen von Polyvinylchlorid

4.2.1 Mortalität

Im Versuchsansatz mit PVC sind 22 Würmer weniger gefunden worden als in die Versuchsreaktoren eingefügt wurden. Dies entspricht 2,75 % der zum Einsatz gekommenen Würmer, siehe Tabelle 9 in Anhang 2.

Da manche Behälter der Fraktionsgrößen >630, 630-200 und 200-63 µm sowie der Kontrollen dieser Größen undicht waren, konnte nicht festgestellt werden, ob die Würmer in den Reaktoren oder außerhalb verendet sind. Statistische Untersuchungen bezüglich der Anzahl der Würmer wurden daher bei diesen Größen nicht durchgeführt.

Bei der Größenfraktion <63 µm wurden alle Würmer nach 28 Tagen in ihren Versuchsreaktoren gefunden. Signifikante Auswirkungen auf die Mortalität der Würmer konnten somit nicht festgestellt werden.

4.2.2 Reproduktion

Im Versuchsansatz mit PVC gab es keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen sowie Größenfraktionen und der Kontrolle bei der Reproduktion. Lediglich bei einem der 40 Versuchsansätze mit PVC wurde ein Kokon gefunden. Außerdem wurden keine Jungwürmer gefunden. Signifikante Auswirkungen von PVC auf die Reproduktion der Würmer konnten somit nicht festgestellt werden.

4.2.3 Wachstum

Im Versuchsansatz mit PVC wurden durchschnittlich 2,753 g an Wurmbiomasse je Versuchsreaktor hinzugefügt. Dies entspricht einem durchschnittlichen Gewicht von 138 mg je Wurm.

Nach der Versuchsperiode lag das durchschnittliche Gewicht an Wurmbiomasse bei 4,663 g je Versuchsreaktor oder 242 mg Einzelwurmmasse. Damit legte jeder Wurm durchschnittlich um 106 mg an Gewicht zu. Dies entspricht einem Wachstum von 77 %. In diesem Versuchsansatz konnte bei jedem einzelnen Versuchsreaktor ein Gewichtszuwachs verzeichnet werden.

Die Größenfraktionen >630, 630-200 und 200-63 µm sowie die Kontrolle wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse ausgewertet. Die Fraktionsgröße <63 µm wurde aufgrund der abweichenden MP-Konzentrationen (0,2; 0,02 und 0,002%) nur mittels einfaktorieller Varianzanalyse ausgewertet.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigt signifikante Auswirkungen der MP-Größe ($p=0,007$) auf das Wachstum der Würmer. Signifikante Auswirkungen der MP-Konzentration ($p= 0,591$) als auch der Interaktion der beiden Faktoren bestehen hingegen nicht ($p=0,749$), siehe Tabelle 11 in Anhang 3.

Bei der Größenfraktion 200-63 µm ist das Wachstum signifikant niedriger als bei den Größenfraktionen >630 ($p=0,029$) und 630-200 ($p=0,020$) sowie der Kontrolle ($p=0,020$), siehe Abbildung 37.

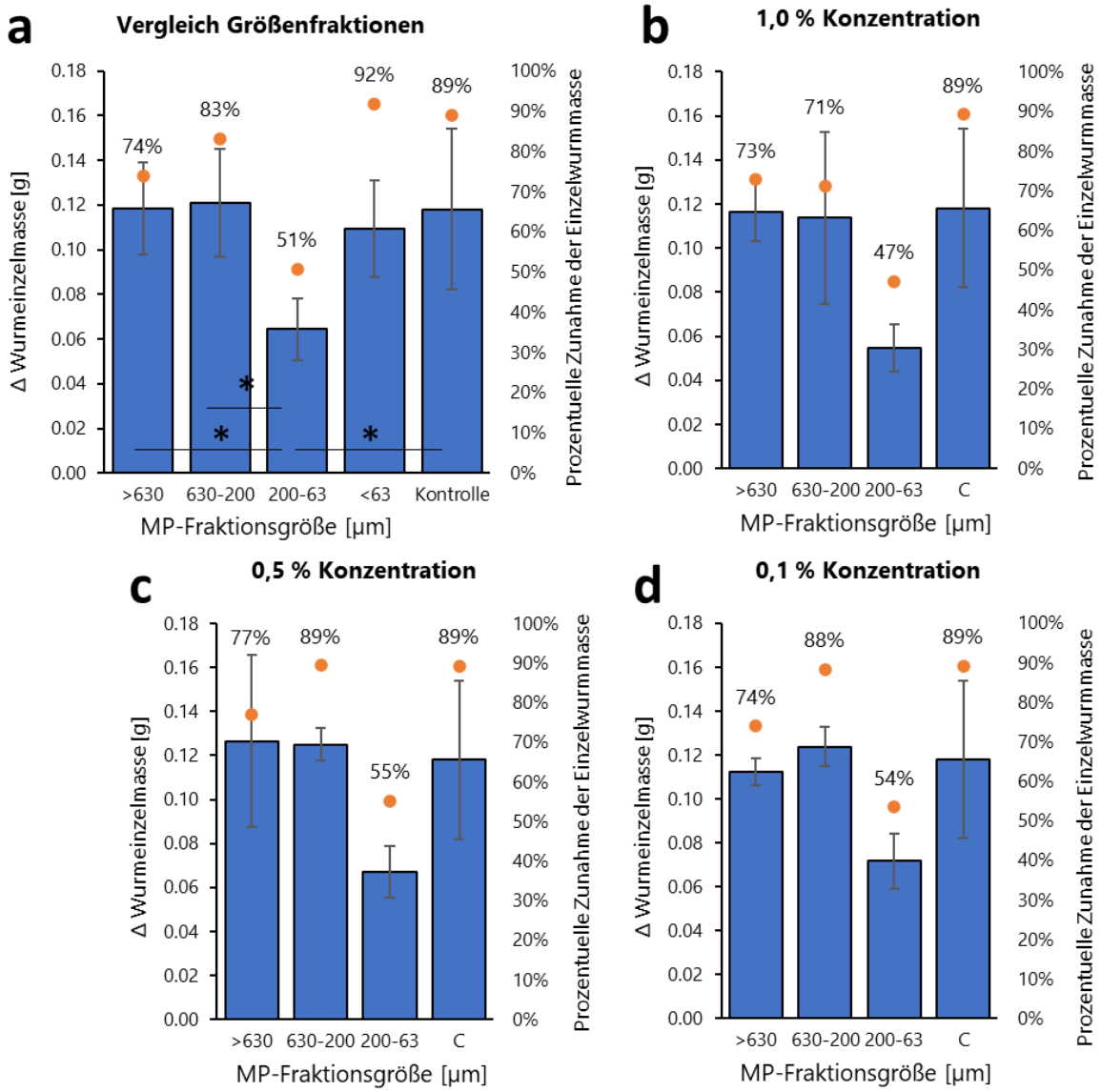

Abbildung 37: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Veränderung der Einzelwurmmasse sowie der prozentuellen Zunahme der Einzelwurmmasse bei PVC nach Größenfraktionen:
a: Vergleich Größenfraktionen (Größenfraktion<63 µm nicht in zweifaktorieller Varianzanalyse inkludiert); b: 1,0 % Konzentration; c: 0,5 % Konzentration; d: 0,1 % Konzentration; Sternchen zeigen die Signifikanzniveaus (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$)

Das Wachstum wurde durch die verschiedenen Konzentrationen nicht signifikant beeinflusst, weder bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse noch bei der einfaktoriellen Varianzanalyse der Größenfraktion <63 µm (p=0,431), siehe Abbildung 38 und Tabelle 12 in Anhang 3.

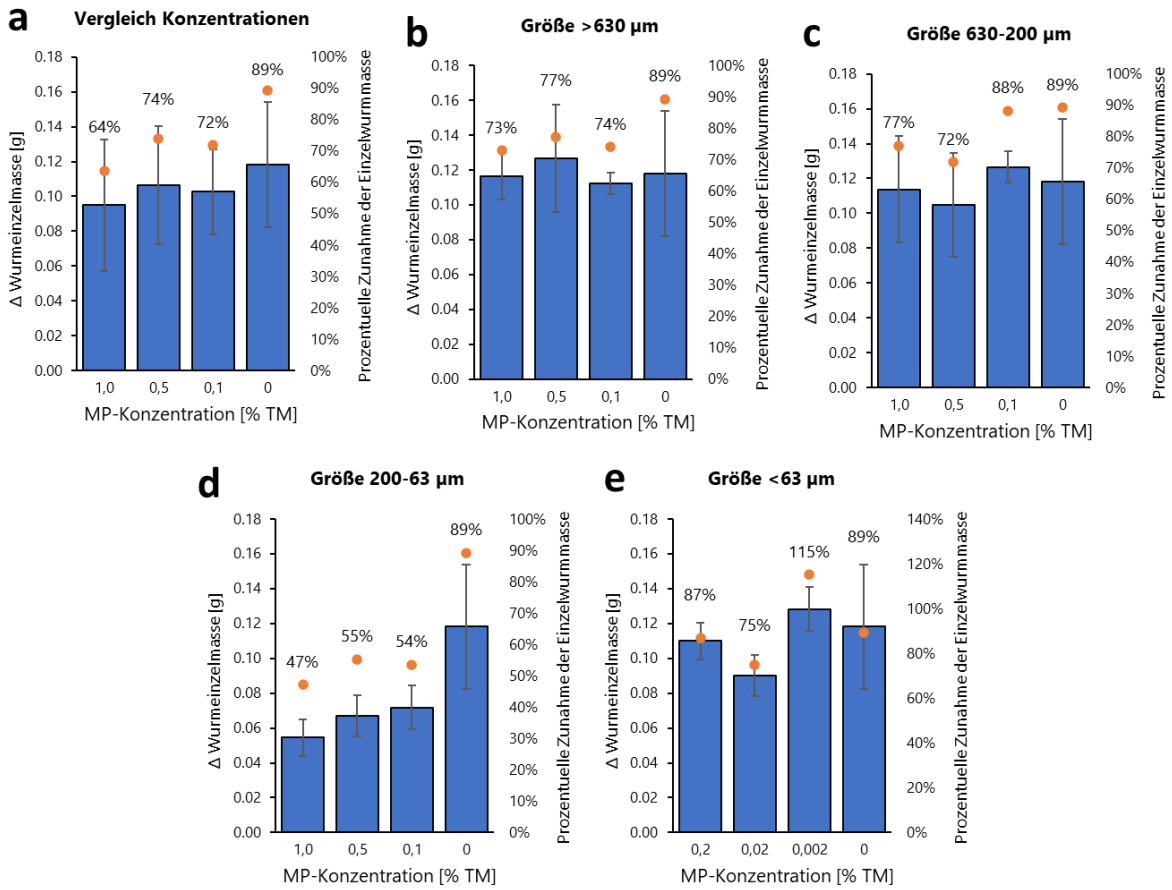

Abbildung 38: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Veränderung der Einzelwurmmasse sowie der prozentuellen Zunahme der Einzelwurmmasse bei PVC nach Konzentrationen:
a: Vergleich Größenfraktionen (Größenfraktion<63 µm nicht in zweifaktorieller Varianzanalyse inkludiert); b: 1,0 % Konzentration; c: 0,5 % Konzentration; d: 0,1 % Konzentration; e: Größenfraktion <63 µm.

4.3 Auswirkungen von Polypropylen

4.3.1 Mortalität

Im Versuchsansatz mit PP haben alle 800 Würmer überlebt, siehe Tabelle 10 in Anhang 2. Signifikante Auswirkungen von PP auf die Mortalität der Würmer konnten somit nicht festgestellt werden.

4.3.2 Reproduktion

Im Versuchsansatz mit PP gab es keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen sowie Größenfraktionen und der Kontrolle bei der Reproduktion. Lediglich bei einem der 40 Versuchsansätze mit PP wurde ein Kokon gefunden. Außerdem wurden keine Jungwürmer gefunden. Signifikante Auswirkungen von PP auf die Reproduktion der Würmer konnten somit nicht festgestellt werden.

4.3.3 Wachstum

Im Versuchsansatz mit PP wurden durchschnittlich 4,645 g an Wurmbiomasse je Versuchsreaktor hinzugefügt. Dies entspricht einem durchschnittlichen Gewicht von 232 mg je Wurm.

Nach der Versuchsperiode lag das durchschnittliche Gewicht an Wurmbiomasse bei 5,893 g je Versuchsreaktor oder 295 mg Einzelwurmmasse. Damit legte jeder Wurm durchschnittlich um 62 mg an Gewicht zu. Dies entspricht einem Wachstum von 27 %. In diesem Versuchsansatz wurde bei jedem einzelnen Versuchsreaktor ein Gewichtszuwachs verzeichnet.

Bei den Untersuchungen mit PP wurde das Wachstum signifikant von der MP-Konzentration (p≤0,001) sowie von der Interaktion der beiden Faktoren (p=0,002) beeinflusst. Signifikante Auswirkungen der MP-Größe bestehen hingegen nicht (p=0,068), siehe Abbildung 39 und Tabelle 13 in Anhang 3.

Bei der Konzentration 0,1 % war das Wachstum bei der Größenfraktion 200-63 µm signifikant niedriger als bei den Größenfraktionen >630 (p=0,023) und 630-200 µm (p≤0,001) sowie der Kontrolle (p≤0,001), siehe Abbildung 39.

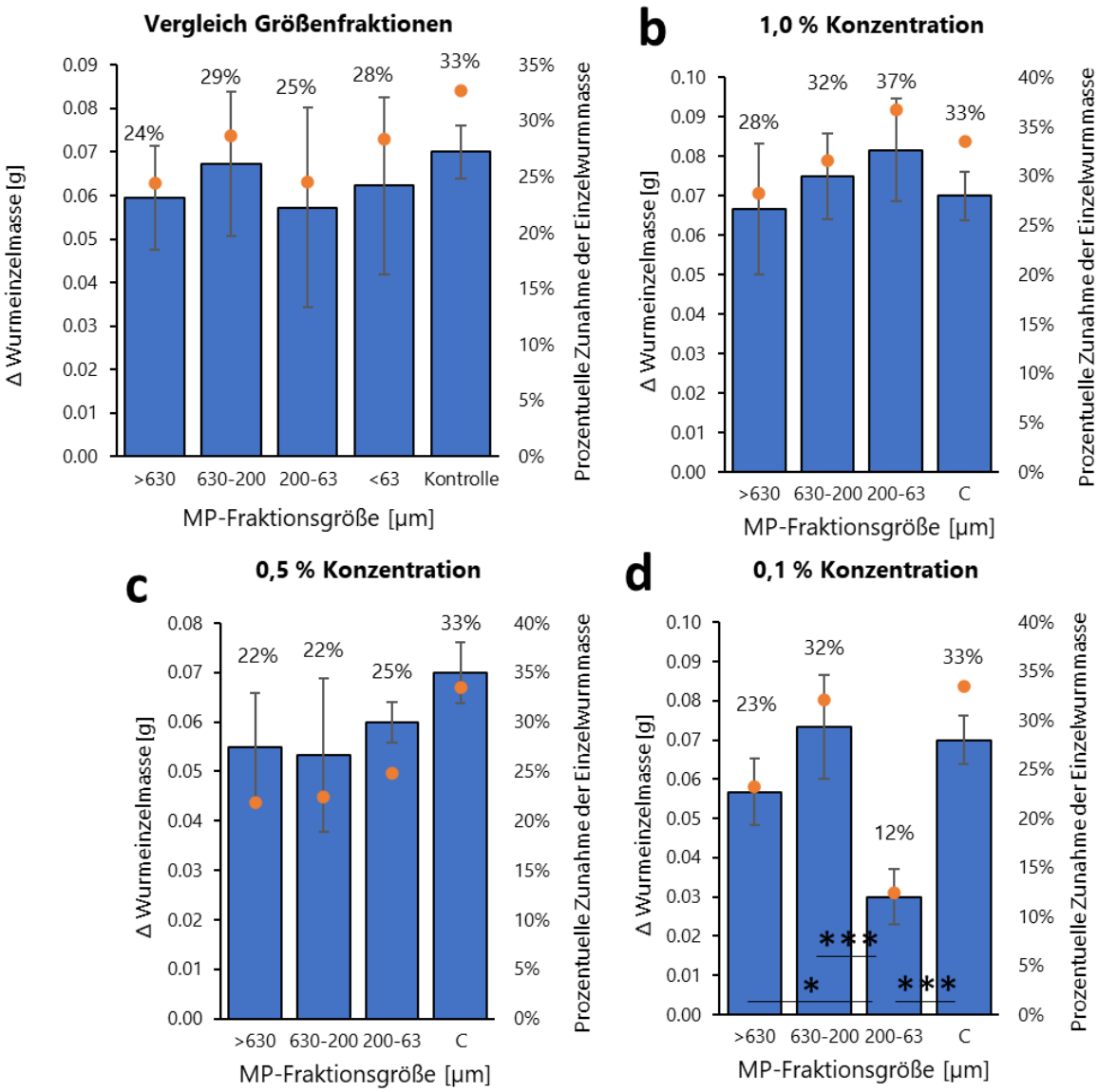

Abbildung 39: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Veränderung der Einzelwurmmasse sowie der prozentuellen Zunahme der Einzelwurmmasse bei PP nach Größenfraktionen:
a: Vergleich Größenfraktionen (Größenfraktion<63 µm nicht in zweifaktorieller Varianzanalyse inkludiert); b: 1,0 % Konzentration; c: 0,5 % Konzentration; d: 0,1 % Konzentration; Sternchen zeigen die Signifikanzniveaus (*: p ≤ 0.05; **: p ≤ 0.01; ***: p ≤ 0.001)

Das Wachstum war bei der Konzentration 0,1 % signifikant niedriger als bei der Konzentration 1,0 % (p=0,003) und der Kontrolle (p=0,020). Ebenso war das Wachstum der Konzentration 0,5 % signifikant niedriger als bei der Konzentration 1,0 % (p=0,013), siehe Abbildung 40.

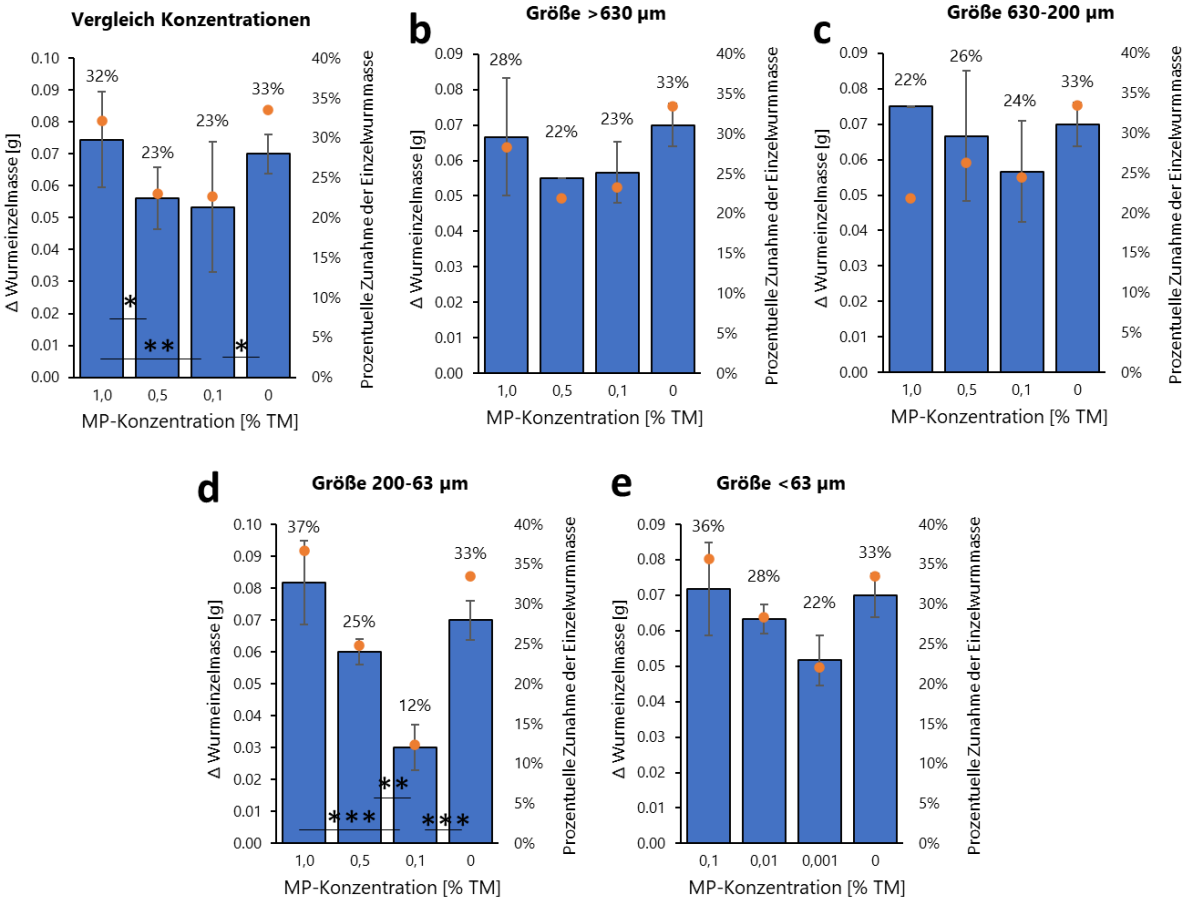

Abbildung 40: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Veränderung der Einzelwurmmasse sowie der prozentuellen Zunahme der Einzelwurmmasse bei PP nach Konzentrationen:
a: Vergleich Größenfraktionen (Größenfraktion<63 µm nicht in zweifaktorieller Varianzanalyse inkludiert); b: 1,0 % Konzentration; c: 0,5 % Konzentration; d: 0,1 % Konzentration; e: Größenfraktion <63 µm; Die Sternchen zeigen die Signifikanzniveaus (*: p ≤ 0.05; **: p ≤ 0.01; ***: p ≤ 0.001)

Bei der Größe 200-63 µm war das Wachstum bei der Konzentration 0,1 % signifikant niedriger als bei den Konzentrationen 1,0 (p≤0,001) und 0,5 % (p=0,008) sowie der Kontrolle (p≤0,001), siehe Abbildung 40.

Die einfaktorielle Varianzanalyse der Größenfraktion <63 µm zeigt keine signifikanten Auswirkungen der Konzentrationen auf das Wachstum, siehe Abbildung 40 und Tabelle 14 in Anhang 3.

4.4 Beobachtungen bei den Versuchsansätzen

Im Zuge der Versuchsansätze wurden Auffälligkeiten notiert, die zwar interessant sind, aber nicht unbedingt der Beantwortung der Forschungsfragen der vorliegenden Arbeit dienen. Hierbei waren die zwei folgenden Beobachtungen besonders interessant.

4.4.1 Transport von Mikroplastik durch Würmer

Bei der Entnahme der Würmer des Versuchsansatzes mit PP-MP wurde bei mehreren Versuchsreaktoren MP in tieferen Substratschichten entdeckt, siehe Abbildung 41. Insgesamt wurde dies bei fünf Versuchsreaktoren der Größenfraktionen >630 (2), 630-200 (2) und 200-63 µm (1) beobachtet, siehe Wurmprotokoll PP.

Abbildung 41: MP in tieferen Substratschichten; v.l.n.r.: 630, 630-200 und 200-63 µm (Eigene Aufnahmen)

Da das MP in diesem Versuchsansatz nicht dem Substrat selbst, sondern dem Futter beigemengt war, müssen es die Würmer in die tieferen Substratschichten transportiert haben.

4.4.2 Abgetrennte Wurmsegmente

Eigentlich sollte auch das Verhalten der Würmer analysiert werden. Hierfür wurden die Würmer jeweils vor und nach (bei PET-Versuchen auch während) der Inkubation des Substrates fotografiert und gefilmt. Ein geeigneter Schlüssel zur Auswertung dieser Daten konnte allerdings nicht erstellt werden.

Abbildung 42: Abgetrennte Wurmsegmente des Versuchsansatzes PP: links: F2 1 C3, rechts: F3 3 C3 (Eigene Aufnahmen)

Bei der Entnahme der Würmer aus den Versuchsreaktoren wurden bei einzelnen Würmern nach dem Waschen und Abtrocknen abgetrennte Segmente gefunden, siehe Abbildungen 42 und 43.

Abbildung 43: Abgetrennte Wurmsegmente des Versuchsansatzes PVC: links: F1 3 C1, rechts: F1 1 C3 (Eigene Aufnahmen)

4.5 Untersuchungen des Mikroplastiks

Mit dem entwickelten Verfahren wurden die Würmer zuerst aufgelöst, um die Rückstände anschließend mittels Stereomikroskopie und ATR-FTIR-Spektroskopie auf vorhandenes MP zu untersuchen.

4.5.1 Auflösung in der Mikrowelle MARS 6

Rund 300 mg der gefriergetrockneten Wurmmasse je untersuchten Versuchsansatz (PET und PVC) wurden mit 10 ml Salpetersäure bei 100 °C in der Mikrowelle MARS 6 behandelt. Untersucht wurde jeweils die höchste Konzentration (PET: 0,2% und PVC: 1%) der drei größten Fraktionen (<630, 630-200 und 200-63 µm). Anschließend wurde die Flüssigkeit mit Papierfiltern abfiltriert und getrocknet. Die Filter wurden auch vor der Filtration getrocknet, um die Restfeuchte zu entfernen. Somit ließ sich der Rückstand des Filtrats erheben. Die Ergebnisse werden in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Berechnung der Rückstände aus der Untersuchung in der Mikrowelle MARS 6

Probenbezeichnung		Gewicht Einwaage getrocknete Würmer [mg]	Gewicht getrockneter Filter [mg]	Gewicht getrockneter Filter nach Filtration [mg]	Rückstand Filtrat [mg]	Rückstand in % von Einwaage
PET	F1 1 C1	345	937	1063	126	36.5%
	F1 2 C1	303	1,037	1139	102	33.7%
	F2 1 C1	300	978	1036	58	19.3%
	F2 2 C1	313	954	1040	86	27.5%
	F3 1 C1	307	1,001	1097	96	31.3%
	F3 2 C1	307	908	960	52	16.9%
PVC	F1 1 C1	301	891	997	106	35.2%
	F1 2 C1	300	890	973	83	27.7%
	F2 1 C1	305	813	898	85	27.9%
	F2 2 C1	306	931	1032	101	33.0%
	F3 1 C1	318	927	992	65	20.4%
	F3 2 C1	315	882	949	67	21.3%

4.5.2 Analyse durch ATR-FTIR

Um bestehende MP-Partikel in den Rückständen der Auflösung bestimmen zu können, wurde reines MP in der Größe 630-200 µm nach gleichem Verfahren in der Mikrowelle behandelt. Das MP wurde nach der Behandlung ebenfalls mit dem Stereomikroskop untersucht.

Außerdem wurden die aufgelösten Partikel auch anhand der Datenbank des Instituts für Abfallwirtschaft der Universität für Bodenkultur klassifiziert. Jeweils das Ergebnis mit der höchsten Übereinstimmung wurde angegeben.

4.5.2.1 Aufgelöstes Polyethylenterephthalat

Abbildung 44: PET-MP der Größenfraktion 630-200 µm nach der Behandlung in der Mikrowelle; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Eindeutig keine grüne Färbung mehr zu erkennen. Leicht durchsichtig bis weiße Färbung. Kantige bis runde, teilweise glänzende Erscheinung mit vielfältigen Erscheinungsformen und einer ungleichmäßigen Größenverteilung, siehe Abbildung 44.

Laut der Datenbank handelt es sich um PET (Hit quality 622).

4.5.2.2 Aufgelöstes Polyvinylchlorid

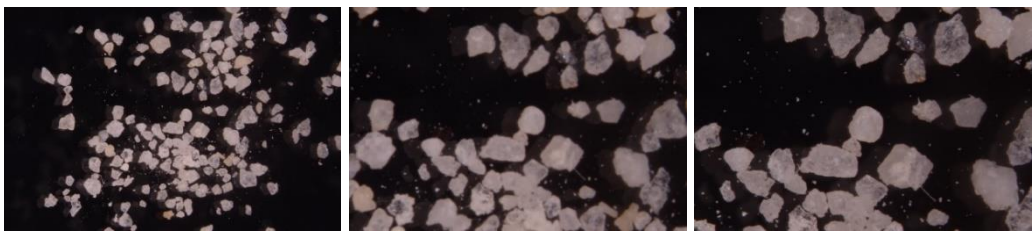

Abbildung 45: PVC-MP der Größenfraktion 630-200 µm nach der Behandlung in der Mikrowelle; v.l.n.r.: 7-fache Vergrößerung, 16-fache Vergrößerung und 20-fache Vergrößerung (Eigene Aufnahmen)

Leicht durchsichtig bis weiße Färbung. Kantige bis runde, teilweise glänzende Erscheinung mit einer ungleichmäßigen Größenverteilung, siehe Abbildung 45.

Laut der Datenbank handelt es sich um PVC (Hit quality 724).

4.5.2.3 ATR-FTIR-Spektroskopie

Mithilfe der Aufnahmen wurden die Filterrückstände unter dem Stereomikroskop untersucht. Partikel, die jenen auf den zuvor gemachten Aufnahmen ähnlich sahen, wurden aussortiert und anschließend mittels ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht.

In den Filterrückständen der Untersuchungen mit PET konnten keine MP-Partikel gefunden werden. In den Filterrückständen der Untersuchungen mit PVC wurden in den Proben F2 1 C1, F2 2 C1 sowie F3 1 C1 vermeintliche MP-Partikel gefunden. In der anschließenden Untersuchung mittels ATR-FTIR-Spektroskopie zeigten sich

teilweise deutliche Ähnlichkeiten mit dem ebenfalls untersuchten aufgelösten PVC. Die Infrarotspektren sind in Abbildung 46 überlappend dargestellt.

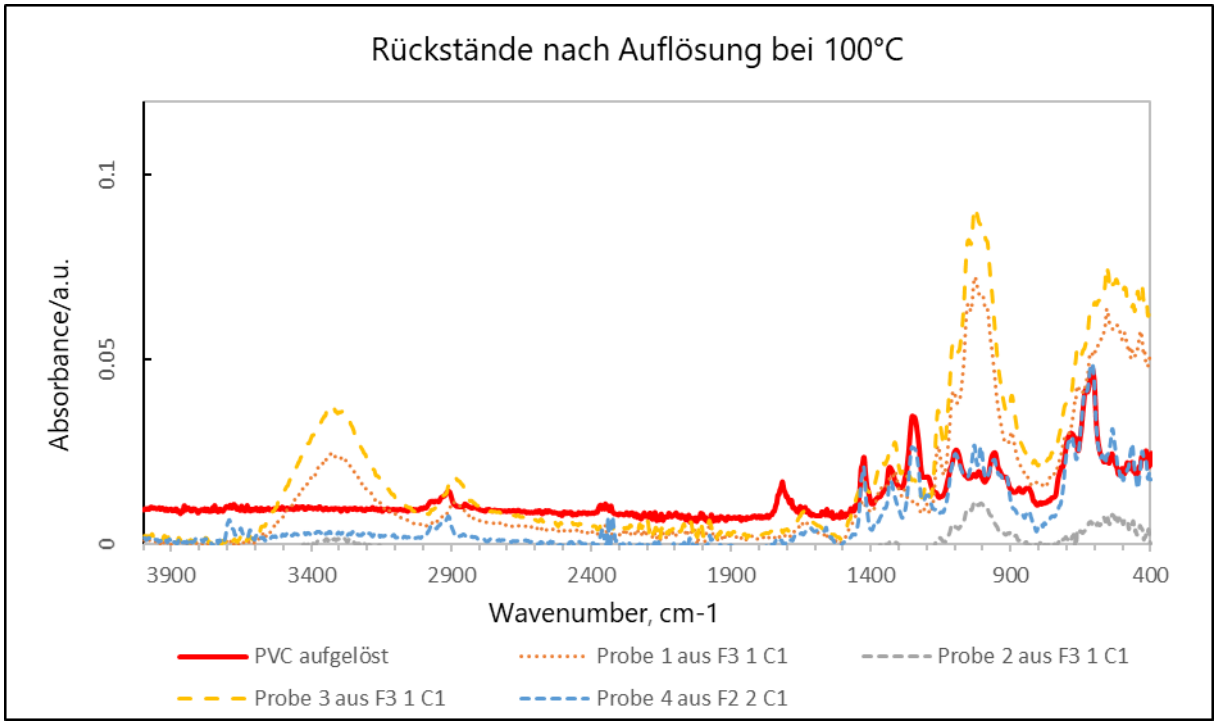

Abbildung 46: Infrarotspektrum von aufgelöstem und in den Rückständen gefundenem PVC-MP

Die in Abbildung 46 dargestellten gefundenen Partikel wurden anhand der Datenbank des Instituts klassifiziert. Jeweils das Ergebnis mit der höchsten Übereinstimmung ist in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7: Ergebnisse des Abgleichs der ATR-FTIR-Spektroskopie

Probenbezeichnung	**Ergebnisse Datenbank**
Aufgelöstes PVC	PVC-Hard (Hit quality 724)
Probe 1 aus PVC F3 1 C1	PVC-Hard (Hit quality 696)
Probe 2 aus PVC F3 1 C1	PVC-Hard (Hit quality 291)
Probe 3 aus PVC F3 1 C1	PVC-Hard (Hit quality 714)
Probe 4 aus PVC F2 2 C1	PVC (Hit quality 617)

Die Hit quality.der vier Proben lag dabei zwischen 291 und 714, die Hit quality des aufgelösten, reinen PVC-MP betrug 724. Sowohl das aufgelöste reine PVC-MP als auch das in den Filterrückständen der Untersuchungen mit PVC gefundene MP wurde mittels ATR-FTIR-Spektroskopie als PVC beziehungsweise als PVC-Hard klassifiziert. Somit konnte die Aufnahme von PVC-MP durch Regenwürmer dokumentiert werden.

4.6 Veränderungen des Substrats

Zur Dokumentation wurde das Substrat nach Beendigung der Versuche untersucht. Dabei wurden folgende Analysen durchgeführt.

4.6.1 Wassergehalt

Der Wassergehalt der Substrate aus den Versuchsreaktoren lag zwischen 28,7 und 35,9 % FM. Der Mittelwert war 33,79 % FM. Weitere Informationen sind den Wurmprotokollen in den Tabellen 8, 9 und 10 in Anhang 2 zu entnehmen.

4.6.2 Glühverlust

Der Glühverlust der Substrate aus den Versuchsreaktoren lag zwischen 6,7 und 10,6 % TM. Der Mittelwert war 8,84 % TM. Untersucht wurden jeweils nur die höchsten und niedrigsten Konzentrationen der verschiedenen MP-Größenfraktionen der drei MP-Arten sowie alle Kontrollen. Weitere Informationen sind den Wurmprotokollen in den Tabellen 8, 9 und 10 in Anhang 2 zu entnehmen.

4.6.3 Gesamter organischer Kohlenstoff, Gesamtstickstoff und Gesamtkohlenstoff

TC, TOC und TIC sollten ebenso wie TN mithilfe des Geräts vario MAX CNS durchgeführt werden. Allerdings lieferte das Gerät mit steigender Nummer an Versuchen auch steigende Messwerte. Dies gab deutliche Hinweise darauf, dass die vom Gerät ausgegebenen Messdaten nicht verlässlich waren. Auf weitere Auswertungen mit dem Gerät vario MAX CNS wurde daher verzichtet.

5. Diskussion

5.1 Auswirkungen auf Mortalität, Reproduktion und Wachstum

In den beiden statistisch ausgewerteten Versuchsansätzen (mit MP aus PVC und PP) wurde das Wachstum der Würmer signifikant durch MP beeinflusst. Entweder durch die MP-Größe, die MP-Konzentration oder die Interaktion dieser beiden Faktoren. Signifikante Auswirkungen auf die Mortalität und die Reproduktion wurden hingegen in keinem der Versuchsansätze festgestellt.

Das deutlich größere Wachstum der Würmer aus den Versuchen mit PVC (77%) gegenüber denen aus PP (27%) ist wahrscheinlich auf das Alter und den Entwicklungszustand der Würmer zurückzuführen. Im Verhältnis zur anfänglichen Wurmbiomasse wurde den Würmern bei PVC dadurch proportional mehr Futter zugeführt als jenen von PP.

Die beiden Versuche haben sich allerdings auch in der Art und Weise unterschieden, wie die Würmer MP ausgesetzt wurden. Bei PVC wurde das MP anfangs in das Substrat gemischt, bei PP jedoch kontinuierlich dem Futter beigemengt. Im Großteil der bisherigen Studien zu den Auswirkungen von MP auf Regenwürmer wurde das MP ins Substrat gemischt. Huerta Lwanga et al. (2016b, 2016a) haben bei ihren Versuchen mit *Lumbricus terrestris* PE-MP dem Futter *Populus nigra* beigemengt. Bei einem der Versuche konnten signifikante Auswirkungen auf das Wachstum festgestellt werden. Ob und inwiefern die MP-Zufuhr Auswirkungen auf Regenwürmer hat, sollte in künftigen Studien geklärt werden.

Die beim Versuch mit PET gefundenen Kokons und Jungwürmer wurden nicht für statistische Untersuchungen herangezogen, da sowohl der Großteil der Kokons als auch der Jungwürmer in sechs Versuchsreaktoren gefunden wurde, die aufgrund eines Covid-19-bedingten Betretungsverbot der Versuchsräumlichkeiten erst nach 35 Tagen untersucht werden konnten. Bei den Versuchen mit PVC und PP konnten keine signifikanten Auswirkungen auf die Reproduktion von *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* festgestellt werden.

Dies unterstützt die Ergebnisse von Huerta Lwanga et al. (2016a), Judy et al. (2019), Rodriguez-Seijo et al. (2017) und Sforzini et al. (2016), die bei ihren Versuchen ebenfalls keine Auswirkungen von MP auf die Reproduktion von Regenwürmern festgestellt haben, siehe Tabelle 3 und 4 auf den Seiten 16 und 17. Für zukünftige Erhebungen der Reproduktionsraten sollte ein längerer Versuchszeitraum in Betracht gezogen werden, vergleichbar mit jenem von 60 Tagen bei Huerta et al. (2016a) oder 56 Tagen bei Judy et al. (2019).

Bei den Versuchsansätzen mit PET und PVC (>630, 630-200 und 200-63µm) konnte nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Würmer außerhalb der Versuchsreaktoren verendet sind, da diese zumindest teilweise undicht waren. Somit konnte bei den Versuchsansätzen mit PET und PVC (>630, 630-200 und 200-63µm) nicht erhoben werden, ob Würmer aufgrund des MP verstorben sind. Bei den Versuchsansätzen mit PVC und PP wurden nach dem Abwaschen und Abtrocknen abgetrennte Wurmsegmente gefunden. Dies könnte entweder von einer zu großen Krafteinwirkung beim Abtrocknen verursacht worden sein oder durch die Aufnahme von MP. Rodriguez-Seijo et al. (2017) haben bei ihren Untersuchungen histologische Schäden im Darm der Würmer bei allen untersuchten MP-Konzentrationen gefunden.

Wobei diese mit steigender Konzentration größer wurden. Diese Beobachtungen könnten in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden.

Beim Versuchsansatz mit PVC <63 µm haben alle Würmer überlebt. PVC in dieser Größenfraktion und den Konzentrationen 0,2; 0,02 und 0,002 % hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Mortalität von *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*. Auch beim Versuchsansatz mit PP haben alle Würmer überlebt. Damit hatte PP-MP ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen auf die Mortalität der Regenwürmer.

Signifikante Auswirkungen von MP auf die Mortalität von Regenwürmern wurden bisher von drei Studien berichtet (Cao et al., 2017; Huerta Lwanga et al., 2016a; Jiang et al., 2020), wobei Cao et al. und Jiang et al. jeweils die Auswirkungen von Polystyrol in den Größen 58 beziehungsweise 0,1 und 1,3 µm auf die Wurmart *Eisenia fetida* untersuchten. Dieser Umstand sollte womöglich weiter erforscht werden. Dies war im Zuge dieser Masterarbeit nicht möglich und bietet sich für weitere Masterarbeiten an.

Huerta Lwanga et al. (2016a) untersuchten die Auswirkungen von PE (<150µm) auf die Wurmart *Lumbricus terrestris*. Nach 14 Tagen wurden keine Auswirkungen auf die Mortalität festgestellt, aber nach 60 Tagen sehr wohl. Somit könnte womöglich ebenfalls eine längere Untersuchungsperiode sinnvoll sein. Wobei Judy et al. (2019) bei ihren ähnlich langen Untersuchungen von 56 Tagen keine signifikanten Auswirkungen auf die Mortalität der Wurmart *Eisenia fetida* feststellen konnten. Untersucht wurden von Judy et al. drei MP-Arten (HDPE, PET und PVC) in der Größenfraktion <2 mm. Ob die Größenfraktion einen wesentlichen Einfluss auf Würmer hat, wird im folgenden Unterkapitel erläutert.

5.2 Auswirkungen der Mikroplastik-Größenfraktionen

Bei den Versuchen mit PVC hatte die MP-Größe signifikante Auswirkungen ($p=0,007$) auf das Wachstum der Würmer, bei PP hingegen nicht ($p=0,068$).

Das Wachstum war bei PVC bei der Größenfraktion 200-63 µm signifikant niedriger als bei den Größenfraktionen >630 ($p=0,029$) und 630-200 µm ($p=0,020$) und der Kontrolle ($p=0,020$). Dies deutet darauf hin, dass zumindest PVC-MP in der Größenfraktion 200-63 µm Würmer stärker beeinflusst als andere Größenfraktionen von PVC-MP.

Bei PP war in der Konzentration 0,1 % und der Größe 200-63 µm das Wachstum ebenfalls signifikant niedriger als bei den Größen >630 ($p=0,023$) und 630-200 µm ($p\leq0,001$) und der Kontrolle ($p\leq0,001$).

Insgesamt ergeben sich deutliche Hinweise, dass MP in der Größenfraktion 200-63 µm besonders wachstumshemmend für die Würmer ist. Dies zeigt sich bei PVC im Vergleich aller Konzentrationen deutlich. Und auch bei PP gibt es bei einer Konzentration Hinweise darauf.

Die drei bereits erwähnten Studien, die signifikante Auswirkungen auf die Mortalität verzeichnet haben, sind auch jene bei denen signifikante Auswirkungen auf das Wachstum festgestellt wurden (Cao et al., 2017; Huerta Lwanga et al., 2016a; Jiang et al., 2020). Während die Forscher die Auswirkungen von verschiedenen Kunststoffen (PE und PS) auf verschiedene Wurmarten (*Lumbricus terrestris* und *Eisenia fetida*) untersuchten, war ihnen gemein, dass sie sehr kleine MP-Größenfraktionen (0,1 µm bis 150 µm) untersucht haben. Nur eine einzige weitere Studie (Huerta Lwanga et al., 2016b) untersuchte ähnlich kleine MP-Größenfraktionen, jedoch ohne signifikante Auswirkungen festzustellen.

Die MP-Größe scheint somit eine wesentliche Bedeutung bei den Auswirkungen von MP auf Regenwürmer zu haben. Außerdem liegt die Annahme nahe, dass zumindest bestimmte MP-Arten erst ab einer Größe von <200 µm signifikante Auswirkungen auf Regenwürmer haben.

5.3 Auswirkungen der Mikroplastik-Konzentration

Bei den Versuchen mit PP hatte die MP-Konzentration signifikante Auswirkungen ($p \leq 0{,}001$) auf das Wachstum der Würmer, bei PVC hingegen nicht ($p = 0{,}591$).

Bei PP war das Wachstum bei der Konzentration 0,1 % signifikant niedriger als bei der Konzentration 1,0 ($p = 0{,}003$) und der Kontrolle ($p = 0{,}020$). Ebenso war das Wachstum bei der Konzentration 0,5 % signifikant niedriger gegenüber der Konzentration 1,0 % ($p = 0{,}013$).

Innerhalb der Größe 200-63 µm war das Wachstum der Würmer bei der Konzentration 0,1 % signifikant niedriger als bei den Konzentrationen 1,0 ($p \leq 0{,}001$) und 0,5 % ($p = 0{,}008$) und der Kontrolle ($p \leq 0{,}001$). Somit hat bei PP die Kombination 200-63 µm in einer 0,1 % Konzentration sowohl im Vergleich der Größen als auch der Konzentrationen ein signifikant verringertes Wachstum verursacht. Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigt einen signifikanten Einfluss der Interaktion beider Faktoren ($p = 0{,}002$). Ob sich dies auch bei weiteren Kunststoffen zeigt, sollte in zukünftigen Arbeiten eruiert werden.

Zumindest bei PP hat eine Konzentration von 0,1 % signifikant verringertes Wachstum zur Folge. Bisher wurde verringertes Wachstum eher bei höheren Konzentrationen (0,5-2,0 %) festgestellt (Cao et al., 2017; Huerta Lwanga et al., 2016a). Jiang et al. (2020) hingegen haben bei ihren Versuchen mit *Eisenia fetida* und PS-MP ein erhöhtes Wachstum gegenüber der Kontrolle beobachtet.

Prendergast-Miller et al. (2019) haben ebenfalls die Auswirkungen von PVC-MP (<2mm) in verschiedenen Konzentrationen (0,01-1,0%) untersucht, ohne dabei Auswirkungen festzustellen. Die Erkenntnisse aus den Untersuchungen mit PVC unterstützen diese Ergebnisse, wobei die in dieser Arbeit untersuchten MP-Größen deutlich kleiner waren.

Während bei PVC kein Einfluss verschiedener Konzentrationen zu erkennen ist, zeigt sich ein solcher bei PP in der Konzentration 0,1 %. Wobei dies besonders deutlich bei einer MP-Größe von 200-63 µm zu erkennen ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen deuten darauf hin, dass es bei verschiedenen MP-Arten und -Größenfraktionen verschiedene Auswirkungen der MP-Konzentrationen geben könnte.

5.4 Einfluss von Würmern auf Mikroplastik

Im Zuge dieser Arbeit konnte erstmals beobachtet werden, dass PP-MP in den Größenfraktionen >630, 630-200 und 200-63 µm durch *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* in tiefere Substratschichten transportiert wird. Der Transport von PE-MP in verschiedenen Größenfraktionen durch die Wurmart *Lumbricus terrestris* konnten zuvor bereits nachgewiesen werden (Huerta Lwanga et al., 2016b, 2016a; Prendergast-Miller et al., 2019; Rillig et al., 2017).

Rillig et al. (2017) haben den Transport von MP durch *Lumbricus terrestris* auf zwei Arten beobachtet. Zum einen durch das Anhaften des MP an der Haut der Regenwürmer und zum anderen durch die Aufnahme und das anschließende

Ausscheiden durch Regenwürmer. Ersteres wurde dabei von den Forschern bei allen untersuchten MP-Größenfraktionen (710-850, 1.180-1.400, 1.700-2.000 und 2.360-2.800 µm) beobachtet, letzteres nur bei den beiden kleineren MP-Größenfraktionen 710-850 und 1.180-1.400 µm.

Die Aufnahme von PE-Mikrofasern durch *Lumbricus terrestris* wurde von Prendergast-Miller et al. (2019) nachgewiesen. Bei Untersuchungen konnten Huerta Lwanga (2016b, 2016a) nicht nur die Aufnahme von PE- sowie LD-PE-MP (<50-150 µm) durch *Lumbricus terrestris* beobachten, sondern auch eine erhöhte Konzentration von MP <50 µm im Wurmkot feststellen. Dies deutet auf einen selektiven Verzehr oder eine Zerkleinerung durch die Regenwürmer hin (Huerta Lwanga et al., 2016a).

Um eine mögliche Zerkleinerung von MP durch *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* zu untersuchen, wurde versucht aufgenommenes MP durch eine Auflösung der Würmer in Säure zu extrahieren. PP-MP löste sich in den Testversuchen vollständig auf, daher wurde auf Untersuchungen dieses Kunststoffes verzichtet. In den Rückständen der Auflösungen des PET-Ansatzes konnten keine MP-Partikel gefunden werden. Dies liegt womöglich an der deutlich verringerten Konzentration und somit Menge an vorhandenem MP (0,2%) gegenüber den Versuchsansätzen mit PVC (1%). Denn in den Rückständen aus den Versuchen mit PVC wurden MP-Partikel gefunden und mittels ATR-FTIR als PVC identifiziert. Somit konnte erstmals die Aufnahme von PVC-MP in den Größenfraktionen 630-200 und 200-63 µm durch *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* nachgewiesen werden.

Da sich PP-MP in den Testversuchen in der Mikrowelle jedoch vollständig auflöste und sowohl PET- als auch PVC-MP bei verschiedenen Temperaturen verschiedene Auflösungsgrade aufwiesen, bei denen jeweils MP-Masse reduziert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass MP durch diese Behandlungsmethode weiter zerkleinert wird.

Somit konnte mit der gewählten Untersuchungsmethode nicht festgestellt werden, ob Regenwürmer MP zerkleinern. Bei zukünftigen Untersuchungen sollte von den Würmern ausgeschiedenes MP untersucht werden, wie es etwa Huerta Lwanga et al. (2016a) bereits gemacht haben.

Die Zerkleinerung von PE-MP durch die Wurmart *Eisenia andrei* wurde in einem 21 Tage dauernden Versuch durch Kwak und An (2021) nachgewiesen. Dabei wurde ebenfalls der ausgeschiedene Wurmkot untersucht. Außerdem haben Huerta Lwanga et al. (2018) nachgewiesen, dass Bakterien im Darm der Wurmart *Lumbricus terrestris* LDPE-MP abbauen können.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Masterarbeit wurden die Auswirkungen von verschiedenen MP-Größen als auch MP-Konzentrationen auf Regenwürmer untersucht. Dabei konnten neue interessante Erkenntnisse bezüglich der Auswirkungen von MP auf Regenwürmer gewonnen, sowie einige spannende zukünftige Untersuchungsfelder identifiziert werden.

Erstmals wurde der Transport von PP-MP in den Größenfraktionen >630, 630-200 und 200-63 µm durch die Wurmarten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* dokumentiert. Andere Studien haben bereits den Transport von PE-MP in verschiedenen Größenfraktionen durch die Wurmart *Lumbricus terrestris* nachgewiesen.

Ebenso konnte erstmalig die Aufnahme von PVC-MP in den Größenfraktionen 630-200 und 200-63 µm durch *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* beschrieben werden. Zuvor konnten andere Studien bereits die Aufnahme von PE-MP <1.400 µm durch *Lumbricus terrestris* nachgewiesen.

Ob *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* PET-, PVC- und PP-MP weiter zerkleinern, konnte mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden nicht festgestellt werden. Dass *Eisenia andrei* PE-MP zerkleinern kann, wurde bereits in der Literatur nachgewiesen. Ebenso dass Bakterien aus dem Darm von *Lumbricus terrestris* LDPE zerkleinern können. Dennoch bieten sich weitere Untersuchungen an, um zu klären, ob dies auch bei anderen MP-Arten beziehungsweisen bei anderen Wurmarten zutrifft. Bei diesen Untersuchungen ist es empfehlenswert, MP-Partikel aus dem Wurmkot anstatt aus Würmern selbst zu extrahieren.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von anderen Studien, die die Auswirkungen von MP auf die Reproduktion von Regenwürmern untersucht haben, konnten auch bei dieser Arbeit keine signifikanten Auswirkungen auf diese festgestellt werden. Womöglich müssten bei zukünftigen Versuchen erheblich längere Untersuchungszeiträume betrachtet werden.

Ebenfalls längere Versuchszeiträume könnten bei zukünftigen Untersuchungen der Auswirkungen von MP auf die Mortalität der Regenwürmer zielführend sein. Im Zuge dieser Arbeit konnten hierbei keine Auswirkungen festgestellt werden. Eine von drei Publikationen, die bereits Auswirkungen auf die Mortalität festgestellt hat, untersuchte *Lumbricus terrestris* für 60 Tage. Die beiden anderen Studien untersuchten *Eisenia fetida* für 14 beziehungsweise 28 Tage, dafür jedoch die Auswirkungen von PS-MP. In Zukunft wären bei Untersuchungen zu den Auswirkungen auf die Mortalität zum einen also ebenfalls längere Versuchszeiträume zu empfehlen und zum anderen die Untersuchung von PS-MP wünschenswert, um den Einfluss der MP-Art zu prüfen.

Während in der vorliegenden Arbeit keine Auswirkungen auf Mortalität und Reproduktion der Wurmarten *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* festgestellt werden konnten, gab es sehr wohl signifikante Auswirkungen von MP auf das Wachstum der Würmer, entweder durch die MP-Größe, die MP-Konzentration oder die Interaktion dieser beiden Faktoren.

Bei PVC war das Wachstum der Würmer bei der Größenfraktion 200-63 µm signifikant verringert. Bei PP war das Wachstum in der Konzentration 0,1 % ebenfalls bei der Größe 200-63 µm signifikant reduziert. Daraus ergibt sich die Annahme, dass MP erst ab einer Größe <200 µm negative Auswirkungen auf Regenwürmer hat. Bei der Größe <63 µm haben sich keine Auswirkungen gezeigt, wobei sowohl bei PVC als auch PP

deutlich geringere Konzentrationen zum Einsatz kamen. Diesbezüglich sollten weitere Untersuchungen in der Zukunft durchgeführt werden.

Ebenfalls weiter erforscht werden, sollten die Auswirkungen von verschiedenen MP-Konzentrationen auf Regenwürmer. Hier zeigten sich im Zuge der Arbeit unterschiedliche Ergebnisse. Bei PVC gab es, wie bei einer anderen Studie mit PVC auch, keine Auswirkungen der Konzentration auf das Wachstum der Würmer. Bei PP zeigten sich signifikante Auswirkungen der Konzentration 0,1 % in der Größenfraktion 200-63 µm. Auch die unterschiedliche Art und Weise wie Würmer MP ausgesetzt wurden, könnte eine Rolle gespielt haben. Bei PP wurde das MP in das Futter gemengt, bei PVC wurde es dem Substrat beigemengt. Um diese Umstände genauer zu erforschen, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Bei weiteren Untersuchungen sind mit Pollengitter versiegelte Behälter als Versuchsreaktoren zu empfehlen. Behälter, die mit einer mit hohem Gewicht beschwerten Plexiglasplatte versiegelt werden können, sind ebenfalls geeignet. Bei der Herstellung des MP empfiehlt es sich, ausreichend Trockeneis (Verhältnis 1:2) zu verwenden, um ein Schmelzen der Kunststoffe zu verhindern. Bei der Auswahl der Würmer sollte darauf geachtet werden, dass Gewicht und Alter aller Tiere ähnlich sind, um die Daten besser vergleichen zu können.

Die Auswirkungen von MP auf terrestrische Systeme sind nach wie vor zu wenig erforscht. Ebenso wie die Auswirkungen von verschiedenen MP-Arten auf unterschiedliche Regenwurmarten. Weitere Untersuchungen in diesem Themenbereich sind ausdrücklich zu empfehlen, um die Auswirkungen von steigenden Mengen an MP in Ackerböden und anderen terrestrischen System in Zukunft evidenzbasiert bewerten zu können.

Literaturverzeichnis

Aira, M., 2002. How earthworm density affects microbial biomas and activity in pig manure. Eur. J. Soil Biol. 38, 7–10. https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01116-5

Ali, U., Sajid, N., Khalid, A., Riaz, L., Rabbani, M.M., Syed, J.H., Malik, R.N., 2015. A review on vermicomposting of organic wastes. Environ. Prog. Sustain. Energy 34, 1050–1062. https://doi.org/10.1002/ep.12100

Al-Salem, S.M., Lettieri, P., Baeyens, J., 2009. Recycling and recovery routes of plastic solid waste (PSW): A review. Waste Manag. 29, 2625–2643. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.06.004

Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 1977–1984. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304

Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 1985–1998. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205

Bouché, M.B., 1977. Strategies lombriciennes. Ecol. Bull. 25, 122–1322.

Butt, K., Lowe, C., 2010. Controlled Cultivation of Endogeic and Anecic Earthworms, in: Biology of Earthworms. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 107–121. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14636-7_7

Button, M., Jenkin, G.R.T., Bowman, K.J., Harrington, C.F., Brewer, T.S., Jones, G.D.D., Watts, M.J., 2010. DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: Assessing resistance to arsenic toxicity by use of the Comet assay. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 696, 95–100. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.12.009

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

Carr, S.A., Liu, J., Tesoro, A.G., 2016. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. Water Res. 91, 174–182. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.002

Castillo, J.M., Romero, E., Nogales, R., 2013. Dynamics of microbial communities related to biochemical parameters during vermicomposting and maturation of agroindustrial lignocellulose wastes. Bioresour. Technol. 146, 345–354. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.093

Christian, E., Zicsi, A., 1999. Ein synoptischer Bestimmungsschlüssel der Regenwürmer Österreichs (Oligochaeta: Lumbricidae). Bodenkultur 50, 121–131.

Clark, J.H., Hardy, J.J.E., 2004. Towards Sustainable Chemical Manufacturing: Polylactic Acid – A Sustainable Polymer?, in: Sustainable Development in Practice. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 250–282. https://doi.org/10.1002/0470014202.ch7

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. Mar. Pollut. Bull. 62, 2588–2597. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025

Colton, J.B., Burns, B.R., Knapp, F.D., 1974. Plastic Particles in Surface Waters of the Northwestern Atlantic: The abundance, distribution, source, and significance of various types of plastics are discussed. Science 185, 491–497. https://doi.org/10.1126/science.185.4150.491

Cosín, D.J.D., Novo, M., Fernández, R., 2010. Reproduction of Earthworms: Sexual Selection and Parthenogenesis, in: Biology of Earthworms. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 69–86. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14636-7_5

Diaz, L.F., 2007. Chapter 1 Introduction, in: Waste Management Series. Elsevier, pp. 1–5. https://doi.org/10.1016/S1478-7482(07)80004-2

Dimas, A., 2020. Composting and vermicomposting of biodigradable and non-biodigradable plastics by Eisenia Fetida, Eisenia Andrei and Eisenia Hortensis. Universität für Bodenkultur, Wien.

Dominguez, J., Edwards, C., 2010a. Biology and Ecology of Earthworm Species Used for Vermicomposting, in: Edwards, C., Arancon, N., Sherman, R. (Eds.), Vermiculture Technology. CRC Press, pp. 27–40. https://doi.org/10.1201/b10453-4

Dominguez, J., Edwards, C., 2010b. Relationships between Composting and Vermicomposting, in: Edwards, C., Arancon, N., Sherman, R. (Eds.), Vermiculture Technology. CRC Press, pp. 11–25. https://doi.org/10.1201/b10453-3

Dominguez, J., Edwards, C.A., Subler, S., 1997. A comparison of vermicomposting and composting. BioCycle 38, 57–59.

Domínguez, J., Velando, A., Aira, M., Monroy, F., 2003. Uniparental reproduction of Eisenia fetida and E. andrei (Oligochaeta: Lumbricidae): evidence of self-insemination. Pedobiologia 47, 530–534. https://doi.org/10.1078/0031-4056-00224

Duis, K., Coors, A., 2016. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. Environ. Sci. Eur. 28, 2. https://doi.org/10.1186/s12302-015-0069-y

Edwards, C.A., 2004. , in: Earthworm Ecology, Second Edition. CRC PRESS, Baton Rouge, LA.

Edwards, C.A., Arancon, N.Q., 2004. The use of earthworms in the breakdown of organic wastes to produce vermicomposts and animal feed protein, in: Earthworm Ecology, Second Edition. pp. 345–379. https://doi.org/10.1201/9781420039719

EFSA, 2016. (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) Statement on the presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. EFSA J. 14, 1–30. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4501

Evans, G.M., Furlong, J.C., 2010. Biotechnology and Waste, in: Environmental Biotechnology: Theory and Application, Second Edition. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 175–212. https://doi.org/10.1002/9780470975152.ch8

GESAMP, 2015. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment.

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

Guerrero-Pérez, O.M., Patience, G.S., 2020. Experimental methods in chemical engineering: Fourier transform infrared spectroscopy—FTIR. Can. J. Chem. Eng. 98, 25–33. https://doi.org/10.1002/cjce.23664

Gupta, R., Garg, V.K., 2009. Vermiremediation and nutrient recovery of non-recyclable paper waste employing Eisenia fetida. J. Hazard. Mater. 162, 430–439. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.055

Helmberger, M.S., Tiemann, L.K., Grieshop, M.J., 2020. Towards an ecology of soil microplastics. Funct. Ecol. 34, 550–560. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13495

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. Environ. Sci. Technol. 46, 3060–3075. https://doi.org/10.1021/es2031505

Hodson, M.E., Duffus-Hodson, C.A., Clark, A., Prendergast-Miller, M.T., Thorpe, K.L., 2017. Plastic Bag Derived-Microplastics as a Vector for Metal Exposure in Terrestrial Invertebrates. Environ. Sci. Technol. 51, 4714–4721. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00635

Hopewell, J., Dvorak, R., Kosior, E., 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 2115–2126. https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0311

Horton, A.A., Walton, A., Spurgeon, D.J., Lahive, E., Svendsen, C., 2017. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. Sci. Total Environ. 586, 127–141. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.190

Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salánki, T., van der Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A.A., Geissen, V., 2016a. 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

Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salánki, T., van der Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A.A., Geissen, V., 2016b. Incorporation of microplastics from litter into burrows of Lumbricus terrestris. Environ. Pollut. 220, 523–531. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.096

Huerta Lwanga, E., Mendoza Vega, J., Ku Quej, V., Chi, J. de los A., Sanchez del Cid, L., Chi, C., Escalona Segura, G., Gertsen, H., Salánki, T., van der Ploeg, M., Koelmans, A.A., Geissen, V., 2017. Field evidence for transfer of plastic debris along a terrestrial food chain. Sci. Rep. 7, 14071. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14588-2

Huerta Lwanga, E., Thapa, B., Yang, X., Gertsen, H., Salánki, T., Geissen, V., Garbeva, P., 2018. Decay of low-density polyethylene by bacteria extracted

from earthworm's guts: A potential for soil restoration. Sci. Total Environ. 624, 753–757. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.144

Ivar do Sul, J.A., Costa, M.F., 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. Environ. Pollut. 185, 352–364. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.036

Jain, K., Singh, J., Chauhan, L.K.S., Murthy, R.C., Gupta, S.K., 2004. Modulation of flyash-induced genotoxicity in Vicia faba by vermicomposting. Ecotoxicol. Environ. Saf. 59, 89–94. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.01.009

Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science 347, 768–771. https://doi.org/10.1126/science.1260352

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

Judy, J.D., Williams, M., Gregg, A., Oliver, D., Kumar, A., Kookana, R., Kirby, J.K., 2019. Microplastics in municipal mixed-waste organic outputs induce minimal short to long-term toxicity in key terrestrial biota. Environ. Pollut. 252, 522–531. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.027

Khwairakpam, M., Bhargava, R., 2009. Vermitechnology for sewage sludge recycling. J. Hazard. Mater. 161, 948–954. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.088

Kwak, J.I., An, Y.-J., 2021. Microplastic digestion generates fragmented nanoplastics in soils and damages earthworm spermatogenesis and coelomocyte viability. J. Hazard. Mater. 402, 124034. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124034

Lebreton, L., Andrady, A., 2019. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. Palgrave Commun. 5, 1–11. https://doi.org/10.1057/s41599-018-0212-7

Lee, L.H., Wu, T.Y., Shak, K.P.Y., Lim, S.L., Ng, K.Y., Nguyen, M.N., Teoh, W.H., 2018. Sustainable approach to biotransform industrial sludge into organic fertilizer via vermicomposting: a mini-review: Sustainable approach to biotransform industrial sludge into organic fertilizer via vermicomposting. J. Chem. Technol. Biotechnol. 93, 925–935. https://doi.org/10.1002/jctb.5490

Lehtiniemi, M., Hartikainen, S., Näkki, P., Engström-Öst, J., Koistinen, A., Setälä, O., 2018. Size matters more than shape: Ingestion of primary and secondary microplastics by small predators. Food Webs 17, e00097. https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00097

Lohri, C.R., Diener, S., Zabaleta, I., Mertenat, A., Zurbrügg, C., 2017. Treatment technologies for urban solid biowaste to create value products: a review with focus on low- and middle-income settings. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 16, 81–130. https://doi.org/10.1007/s11157-017-9422-5

Maboeta, M.S., van Rensburg, L., 2003. Vermicomposting of industrially produced woodchips and sewage sludge utilizing Eisenia fetida. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 265–270. https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00101-X

Ndegwa, P.M., Thompson, S.A., 2001. Integrating composting and vermicomposting in the treatment and bioconversion of biosolids. Bioresour. Technol. 6.

Ng, E.-L., Huerta Lwanga, E., Eldridge, S.M., Johnston, P., Hu, H.-W., Geissen, V., Chen, D., 2018. An overview of microplastic and nanoplastic pollution in agroecosystems. Sci. Total Environ. 627, 1377–1388. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.341

Nizzetto, L., Futter, M., Langaas, S., 2016. Are Agricultural Soils Dumps for Microplastics of Urban Origin? Environ. Sci. Technol. 50, 10777–10779. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04140

OECD, 2016. Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing, Paris.

OECD, 1984. Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing, Paris.

Piehl, S., Leibner, A., Löder, M.G.J., Dris, R., Bogner, C., Laforsch, C., 2018. Identification and quantification of macro- and microplastics on an agricultural farmland. Sci. Rep. 8, 17950. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36172-y

PlasticsEurope, 2020. Plastics - the Facts 2020, An analysis of European plastics production, demand and waste data [WWW Document]. URL https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/4312-plastics-facts-2020 (accessed 4.19.21).

Prendergast-Miller, M.T., Katsiamides, A., Abbass, M., Sturzenbaum, S.R., Thorpe, K.L., Hodson, M.E., 2019. Polyester-derived microfibre impacts on the soil-dwelling earthworm Lumbricus terrestris. Environ. Pollut. 251, 453–459. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.037

Qi, R., Jones, D.L., Li, Z., Liu, Q., Yan, C., 2020. Behavior of microplastics and plastic film residues in the soil environment: A critical review. Sci. Total Environ. 703, 134722. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134722

Rillig, M.C., 2012. Microplastic in Terrestrial Ecosystems and the Soil? Environ. Sci. Technol. 46, 6453–6454. https://doi.org/10.1021/es302011r

Rillig, M.C., Ziersch, L., Hempel, S., 2017. Microplastic transport in soil by earthworms. Sci. Rep. 7, 1362. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01594-7

Rodriguez-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

Shahmansouri, M.R., Pourmoghadas, H., Parvaresh, A.R., Alidadi, H., 2005. Heavy Metals Bioaccumulation by Iranian and Australian Earthworms (Eisenia fetida) in the Sewage Sludge Vermicomposting. J. Environ. Health Sci. Eng. 2, 28–32.

Singh, R.P., Singh, P., Araujo, A.S.F., Hakimi Ibrahim, M., Sulaiman, O., 2011. Management of urban solid waste: Vermicomposting a sustainable option. Resour. Conserv. Recycl. 55, 719–729. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.02.005

Sintim, H.Y., Bary, A.I., Hayes, D.G., English, M.E., Schaeffer, S.M., Miles, C.A., Zelenyuk, A., Suski, K., Flury, M., 2019. Release of micro- and nanoparticles from biodegradable plastic during in situ composting. Sci. Total Environ. 675, 686–693. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.179

Statista, 2022. Weltweite und europäische Kunststoffproduktion in den Jahren von 1950 bis 2020 [WWW Document]. Statista. URL https://de.statista.com/statistik/daten/studie/167099/umfrage/weltproduktion-von-kunststoff-seit-1950/ (accessed 2.28.22).

Suthar, S., 2009. Potential of Allolobophora parva (Oligochaeta) in vermicomposting. Bioresour. Technol. 100, 6422–6427. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.004

Suzuki, Y., Matsubara, T., Hoshino, M., 2003. Breakdown of mineral grains by earthworms and beetle larvae. Geoderma 112, 131–142. https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00300-2

Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J., vom Saal, F.S., 2009. Our plastic age. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 1973–1976. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0054

van Sebille, E., Wilcox, C., Lebreton, L., Maximenko, N., Hardesty, B.D., van Franeker, J.A., Eriksen, M., Siegel, D., Galgani, F., Law, K.L., 2015. A global inventory of small floating plastic debris. Environ. Res. Lett. 10, 124006. https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/12/124006

Weithmann, N., Möller, J.N., Löder, M.G.J., Piehl, S., Laforsch, C., Freitag, R., 2018. Organic fertilizer as a vehicle for the entry of microplastic into the environment. Sci. Adv. 4, eaap8060. https://doi.org/10.1126/sciadv.aap8060

World Economic Forum, Ellen MacArthur Foundation, McKinsey & Company, 2016. The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics [WWW Document]. URL https://www.ellenmacarthurfoundation.org/publications/the-new-plastics-economy-rethinking-the-future-of-plastics (accessed 4.21.21).

Zhang, K., Hamidian, A.H., Tubić, A., Zhang, Y., Fang, J.K.H., Wu, C., Lam, P.K.S., 2021. Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. Environ. Pollut. 274, 116554. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116554

Ziajahromi, S., Neale, P.A., Leusch, F.D.L., 2016. Wastewater treatment plant effluent as a source of microplastics: review of the fate, chemical interactions and potential risks to aquatic organisms. Water Sci. Technol. 74, 2253–2269. https://doi.org/10.2166/wst.2016.414

Anhang

Anhang 1: Kalibrationsgeraden NO_3-N und NH_4-N……..61
Anhang 2: Wurmprotokolle……...62
Anhang 3: Sigmaplot Auszüge……...65

Anhang 1: Kalibrationsgeraden NO_3-N und NH_4-N

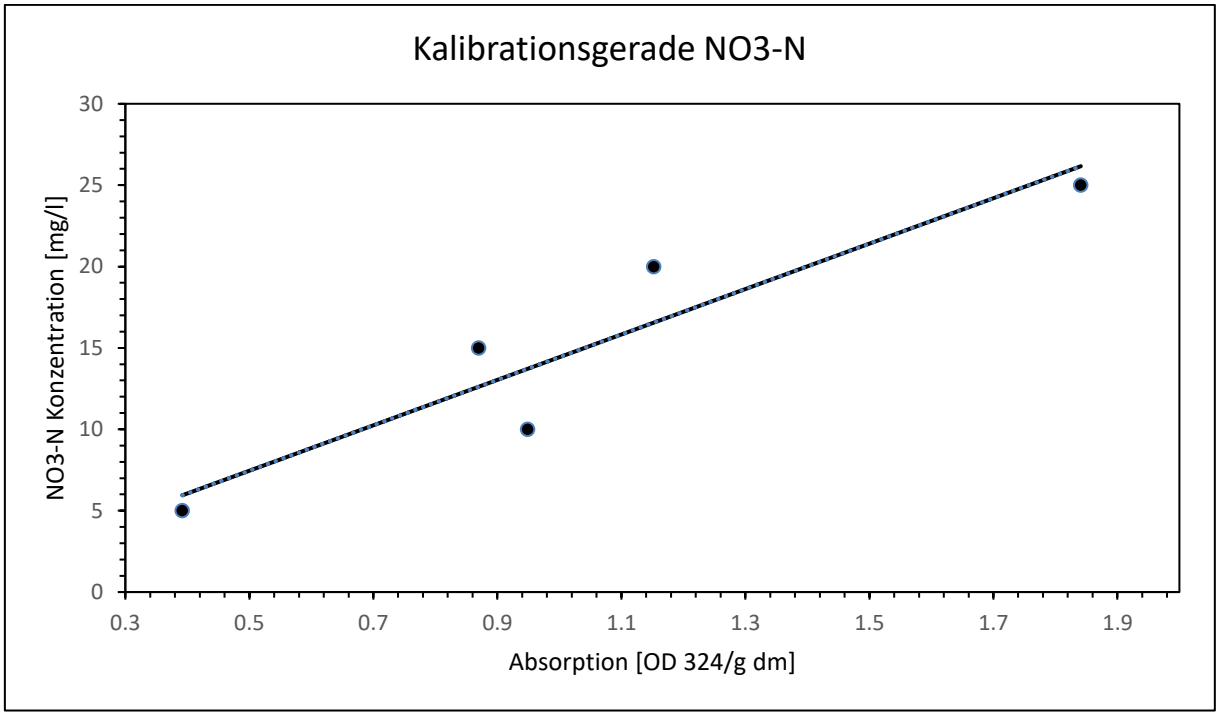

Abbildung 47: Kalibrationsgerade NO_3-N

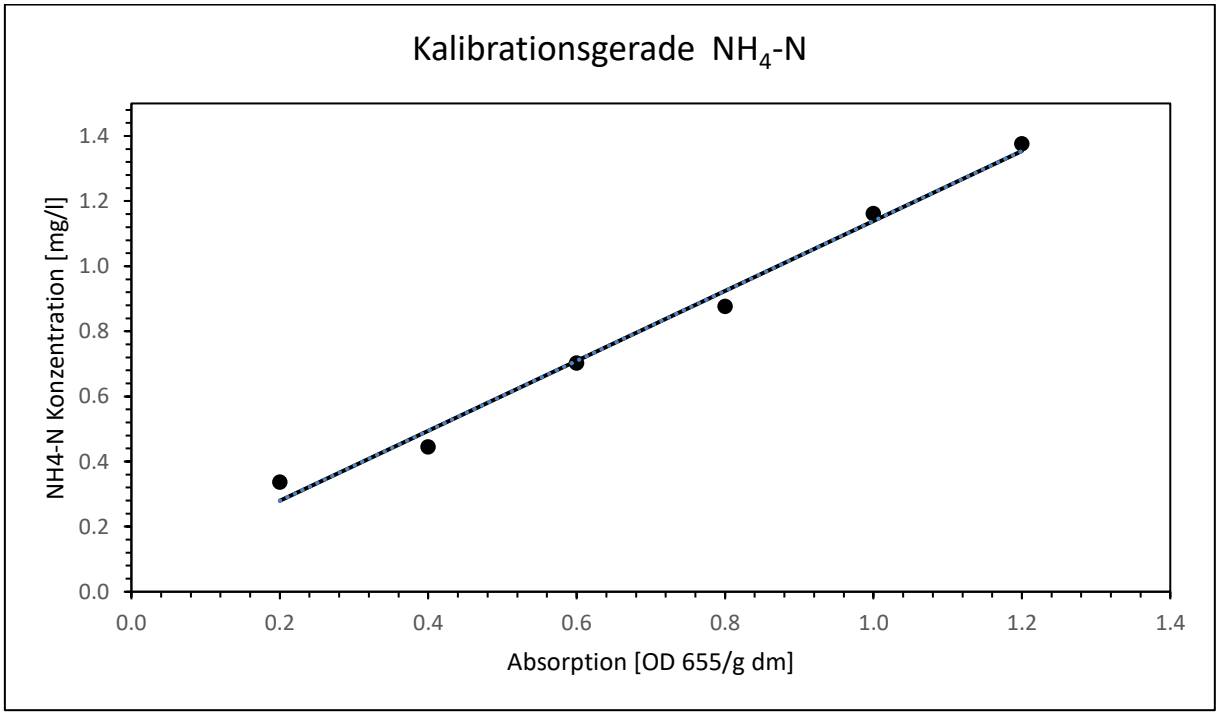

Abbildung 48: Kalibrationsgerade NH4-N

Anhang 2: Wurmprotokolle

Tabelle 8: Wurmprotokoll Polyethylenterephthalat

PET		Anfang Wurm-			Ende Wurm-			Veränderung Wurm-							Substrat		
MP-Größenfraktion [µm]	MP-Konzentration [% TM]	anzahl [Stk]	gewicht [g]	einzelgewicht [mg]	anzahl [Stk]	gewicht [g]	einzelgewicht [mg]	anzahl [Stk]	gewicht [g]	einzelgewicht [g]	Zuwachs [%]	Kokons [Stk]	junge Würmer [Stk]	Wassergehalt [% FM]	Glühverlust [% TM]	Anmerkungen
>630	0,2	20	4,9	245	14	2,8	200	-6	-2,1	-45	-18%	0	0	34,3	8,3	
		20	4,1	205	24	5,8	242	4	1,7	37	18%	0	0	34,1	8,5	
		20	4,1	205	12	3,5	292	-8	-0,6	87	42%	4	1	35,0	6,7	
	0,02	20	4,2	210	13	3,1	238	-7	-1,1	28	14%	4	2	34,6	-	Erst nach 35 Tagen untersucht (aufgrund von Covid-19
		20	4,4	220	18	7,4	411	-2	3	191	87%	15	9	33,3	-	
		20	4,8	240	29	11,9	410	9	7,1	170	71%	10	3	34,0	-	
	0,002	20	4,3	215	24	7,9	329	4	3,6	114	53%	1	0	33,3	9,4	
		20	3,9	195	29	9,1	314	9	5,2	119	61%	2	0	34,3	7,7	
		20	3,8	190	16	4,9	306	-4	1,1	116	61%	6	1	34,3	10	
630-200	0,2	20	4,8	240	20	2,8	140	0	-2	-100	-42%	1	0	35,2	8,4	Wurm eingeschnürt?
		20	3,1	155	16	2,5	156	-4	-0,6	1	1%	1	0	34,3	9	
		20	3,8	190	18	4,1	228	-2	0,3	38	20%	1	0	36,8	9,4	
	0,02	20	3,4	170	19	5,3	279	-1	1,9	109	64%	1	0	34,9	-	
		20	4,3	215	22	4,6	209	2	0,3	-6	-3%	1	0	34,5	-	
		20	4,2	210	13	3,6	277	-7	-0,6	67	32%	3	0	35,0	-	
	0,002	20	4,9	245	20	3,5	175	0	-1,4	-70	-29%	0	0	33,8	8,5	
		20	4,7	235	19	3,6	189	-1	-1,1	-46	-19%	2	0	34,3	9,2	
		20	4,8	240	14	2,7	193	-6	-2,1	-47	-20%	1	0	33,6	8,6	Kokon verloren
200-63	0,2	20	4,1	205	17	4,7	276	-3	0,6	71	35%	0	0	35,5	8,3	Würmer können in den anderen Behälterteil
		20	4,3	215	18	4,5	250	-2	0,2	35	16%	0	0	35,3	8,7	
		20	5	250	25	6,9	276	5	1,9	26	10%	0	0	35,7	7,9	Substrat wirkt feucht
	0,02	20	5,5	275	13	4,3	331	-7	-1,2	56	20%	0	0	35,4	-	
		20	4,8	240	15	4,8	320	-5	0	80	33%	0	0	34,4	-	
		20	5,1	255	26	7,5	288	6	2,4	33	13%	0	0	34,5	-	
	0,002	20	3,1	155	16	4,6	288	-4	1,5	133	85%	0	0	35,1	8,2	
		20	4,1	205	22	5,8	264	2	1,7	59	29%	0	0	34,2	7,9	
		20	5,1	255	13	4,1	315	-7	-1	60	24%	0	0	35,8	7,9	
<63	0,2	20	4,4	220	17	4,1	241	-3	-0,3	21	10%	0	1	34,8	8,1	
		20	3,7	185	23	4,6	200	3	0,9	15	8%	1	0	35,0	8,2	
		20	4,2	210	15	4,3	287	-5	0,1	77	37%	0	0	33,7	9,5	
	0,02	20	4	200	24	4,8	200	4	0,8	0	0%	0	0	33,6	-	
		20	3,3	165	14	4	286	-6	0,7	121	73%	3	0	34,4	-	
		20	3,4	170	26	4,8	185	6	1,4	15	9%	0	0	34,1	-	
	0,002	20	5,6	280	22	5,4	245	2	-0,2	-35	-12%	2	0	33,4	6,9	
		20	5,4	270	19	4,5	237	-1	-0,9	-33	-12%	0	0	34,8	8,5	
		20	4,7	235	18	5	278	-2	0,3	43	18%	2	0	34,7	8,1	
Kontrolle	0,0	20	4,4	220	9	2,5	278	-11	-1,9	58	26%	2	3	33,9	8,6	
		20	5,3	265	31	6,1	197	11	0,8	-68	-26%	2	0	34,2	8,9	
		20	5,7	285	22	6,5	295	2	0,8	10	4%	0	0	34,8	7,7	
		20	4,7	235	20	4,8	240	0	0,1	5	2%	0	0	34,6	9,2	
Mittelwert		20	4,41	221	19	4,94	259	-0,88	0,53	38,6	20%			34,5	8,44	

Tabelle 9: Wurmprotokoll Polyvinylchlorid

PVC		Anfang Wurm-			Ende Wurm-			Veränderung Wurm-						Substrat		
MP-Größenfraktion [µm]	MP-Konzentration [% TM]	anzahl [Stk]	gewicht [g]	einzelgewicht [mg]	anzahl [Stk]	gewicht [g]	einzelgewicht [mg]	anzahl [Stk]	gewicht [g]	einzelgewicht [g]	Zuwachs [%]	Kokons [Stk]	junge Würmer [Stk]	Wassergehalt [% FM]	Glühverlust [% TM]	Anmerkungen
>630	1	20	3,7	185	21	6	286	1	2,3	101	54%	0	0	35,3	9,7	MP auf Substrat
		20	2,9	145	19	5,3	279	-1	2,4	134	92%	0	0	35,1	10,2	sichtbar bei F1C1
		20	3,2	160	20	5,5	275	0	2,3	115	72%	0	0	34,3	9,6	ein Wurm durchtrennt
	0,5	20	3,2	160	10	3,3	330	-10	0,1	170	106%	0	0	34,0	-	
		20	3,3	165	23	6,2	270	3	2,9	105	63%	0	0	34,3	-	
		20	3,4	170	16	4,4	275	-4	1	105	62%	0	0	34,6	-	
	0,1	20	3,1	155	21	5,6	267	1	2,5	112	72%	0	0	34,7	9,5	ein Wurm durchtrennt
		20	3,0	150	20	5,4	270	0	2,4	120	80%	1	0	34,5	9,8	
		20	3,0	150	20	5,1	255	0	2,1	105	70%	0	0	35,1	9,7	
630-200	1	20	3,3	165	13	4,2	323	-7	0,9	158	96%	0	0	33,4	7,7	
		20	3,1	155	33	7,2	218	13	4,1	63	41%	0	0	35,2	8,5	
		20	3,1	155	20	5,5	275	0	2,4	120	77%	0	0	33,6	7,2	
	0,5	20	2,7	135	18	4,8	267	-2	2,1	132	98%	0	0	32,4	-	
		20	3,0	150	14	3,9	279	-6	0,9	129	86%	0	0	34,4	-	
		20	2,7	135	20	5	250	0	2,3	115	85%	0	0	34,6	-	
	0,1	20	2,9	145	16	4,5	281	-4	1,6	136	94%	0	0	33,9	7	
		20	2,7	135	17	4,3	253	-3	1,6	118	87%	0	0	32,9	7,5	
		20	2,8	140	21	5,4	257	1	2,6	117	84%	0	0	33,5	7,9	
200-63	1	20	2,8	140	20	3,6	180	0	0,8	40	29%	0	0	31,9	10	
		20	2,1	105	20	3,4	170	0	1,3	65	62%	0	0	31,9	10,4	
		20	2,3	115	19	3,3	174	-1	1	59	51%	0	0	32,7	9,3	
	0,5	20	2,4	120	16	3,2	200	-4	0,8	80	67%	0	0	30,8	-	1x kein Futter & Wasser
		20	2,7	135	22	4,1	186	2	1,4	51	38%	0	0	29,1	-	1x kein Futter & Wasser
		20	2,3	115	20	3,7	185	0	1,4	70	61%	0	0	32,4	-	
	0,1	20	2,5	125	21	4,4	210	1	1,9	85	68%	0	0	28,7	8,5	1x kein Futter & Wasser
		20	3,0	150	21	4,3	205	1	1,3	55	37%	0	0	32,8	9,1	
		20	2,7	135	18	3,8	211	-2	1,1	76	56%	0	0	33,2	8,3	
<63	0,2	20	2,4	120	20	5	250	0	2,6	130	108%	0	0	32,8	9,5	
		20	2,8	140	20	4,6	230	0	1,8	90	64%	0	0	33,8	10,1	
		20	2,5	125	20	4,7	235	0	2,2	110	88%	0	0	33,7	10,2	
	0,02	20	2,6	130	20	4,8	240	0	2,2	110	85%	0	0	35,1	-	
		20	2,5	125	20	4,2	210	0	1,7	85	68%	0	0	31,7	-	
		20	2,1	105	20	3,6	180	0	1,5	75	71%	0	0	31,9	-	
	0,002	20	2,2	110	20	5	250	0	2,8	140	127%	0	0	30,9	10,3	
		20	2,0	100	20	4,2	210	0	2,2	110	110%	0	0	34,0	10,6	
		20	2,5	125	20	5,2	260	0	2,7	135	108%	0	0	33,7	10,4	
Kontrolle	0,0	20	3,0	150	20	6,2	310	0	3,2	160	107%	0	0	35,9	9,7	
		20	2,8	140	19	4,7	247	-1	1,9	107	77%	0	0	32,7	9,7	
		20	2,5	125	20	3,8	190	0	1,3	65	52%	0	0	29,1	9,7	
		20	2,3	115	20	5,1	255	0	2,8	140	122%	0	0	31,9	8,6	
Mittelwert		20	2,75	138	19	4,66	242	-0,55	1,91	105	77%			33,2	9,24	

Tabelle 10: Wurmprotokoll Polypropylen

PP		Anfang Wurm-			Ende Wurm-			Veränderung Wurm-							Substrat		
MP-Größenfraktion [µm]	MP-Konzentration [% TM]	anzahl [Stk]	gewicht [g]	einzelgewicht [mg]	anzahl [Stk]	gewicht [g]	einzelgewicht [mg]	anzahl [Stk]	gewicht [g]	einzelgewicht [g]	Zuwachs [%]	Kokons [Stk]	junge Würmer [Stk]	Wassergehalt [% FM]	Glühverlust [% TM]	Anmerkungen
>630	1	20	4,8	240	20	6,6	330	0	1,8	90	38%	0	0	33,6	9,2	MP auf Oberfläche
		20	4,8	240	20	5,9	295	0	1,1	55	23%	0	0	34,6	9,7	
		20	4,5	225	20	5,6	280	0	1,1	55	24%	0	0	34,1	9,4	
	0,5	20	5,2	260	20	6,3	315	0	1,1	55	21%	0	0	34,8	-	MP an Oberfläche
		20	4,8	240	20	5,9	295	0	1,1	55	23%	0	0	33,9	-	
		20	5,1	255	20	6,2	310	0	1,1	55	22%	0	0	33,8	-	MP-Transport nach unten
	0,1	20	4,6	230	20	5,8	290	0	1,2	60	26%	0	0	34,1	7,6	MP-Transport nach unten
		20	5,4	270	20	6,3	315	0	0,9	45	17%	0	0	33,8	8,7	Salat übrig
		20	4,8	240	20	6,1	305	0	1,3	65	27%	0	0	33,9	8,8	Salat übrig
630-200	1	20	4,1	205	20	5,5	275	0	1,4	70	34%	0	0	33,8	8,8	MP-Transport nach unten
		20	5,3	265	20	7,1	355	0	1,8	90	34%	0	0	34,1	9,8	Salat übrig
		20	4,9	245	20	6,2	310	0	1,3	65	27%	0	0	33,4	7,7	Salat übrig
	0,5	20	4,9	245	20	5,8	290	0	0,9	45	18%	0	0	34,3	-	MP-Transport nach unten
		20	4,7	235	20	5,5	275	0	0,8	40	17%	0	0	34,6	-	
		20	4,7	235	20	6,2	310	0	1,5	75	32%	0	0	33,7	-	
	0,1	20	4,5	225	20	5,6	280	0	1,1	55	24%	0	0	32,6	8,7	Endsegment abgerissen
		20	4,4	220	20	6,1	305	0	1,7	85	39%	0	0	32,6	7,7	
		20	4,8	240	20	6,4	320	0	1,6	80	33%	0	0	31,8	8,3	
200-63	1	20	4,2	210	20	6,2	310	0	2	100	48%	0	0	34,9	9,5	viele Fruchtfliegen
		20	4,5	225	20	6	300	0	1,5	75	33%	0	0	34,8	9,1	MP-Transport nach unten
		20	4,8	240	20	6,2	310	0	1,4	70	29%	0	0	34,4	8,7	
	0,5	20	4,8	240	20	6,1	305	0	1,3	65	27%	0	0	34,9	-	
		20	5	250	20	6,1	305	0	1,1	55	22%	0	0	35,7	-	
		20	4,7	235	20	5,9	295	0	1,2	60	26%	0	0	34,7	-	
	0,1	20	5,1	255	20	5,8	290	0	0,7	35	14%	0	0	32,7	9,1	
		20	4,6	230	20	5,3	265	0	0,7	35	15%	0	0	32,1	9,2	
		20	4,8	240	20	5,2	260	0	0,4	20	8%	0	0	32,7	8,7	3 zerrissene Würmer
<63	0,2	20	4,4	220	20	5,1	255	0	0,7	35	16%	1	0	33,9	10,5	
		20	4,3	215	20	6,5	325	0	2,2	110	51%	0	0	37,3	9,1	Endsegment abgerissen
		20	3,5	175	20	4,9	245	0	1,4	70	40%	0	0	34,6	12,1	
	0,02	20	4,8	240	20	5,8	290	0	1	50	21%	0	0	30,7	-	
		20	4,4	220	20	5,9	295	0	1,5	75	34%	0	0	34,1	-	
		20	4,3	215	20	5,6	280	0	1,3	65	30%	0	0	31,8	-	
	0,002	20	5,4	270	20	6,4	320	0	1	50	19%	0	0	30,3	8,4	
		20	4,4	220	20	5,5	275	0	1,1	55	25%	0	0	31,8	9,9	
		20	4,4	220	20	5,4	270	0	1	50	23%	0	0	32,3	8,5	
Kontrolle	0,0	20	4,3	215	20	5,7	285	0	1,4	70	33%	0	0	34,2	9	
		20	4,2	210	20	5,7	285	0	1,5	75	36%	0	0	33,0	8,4	
		20	5	250	20	6,2	310	0	1,2	60	24%	0	0	34,1	9,2	
		20	3,6	180	20	5,1	255	0	1,5	75	42%	0	0	32,9	8,4	
Mittelwert		20	4,65	232	20	5,89	295	0	1,25	62	27%			33,6	9,01	

Anhang 3: Sigmaplot Auszüge

Tabelle 11: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse von Polyvinylchlorid mit Sigmaplot

Two Way Analysis of Variance

Data source: PVC

General Linear Model

Dependent Variable: Einzelgewicht

Normality Test (Shapiro-Wilk): Failed (P < 0,050)

Equal Variance Test (Brown-Forsythe): Passed (P = 0,601)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Fraktionsgröße	3	0,0164	0,00547	4,654	0,007
Konzentration	3	0,00228	0,000759	0,645	0,591
Fraktionsgröß x Konzentration	9	0,00687	0,000763	0,648	0,749
Residual	39	0,0459	0,00118		
Total	54	0,0691	0,00128		

The difference in the mean values among the different levels of Fraktionsgröße is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Konzentration [g]. There is a statistically significant difference (P = 0,007). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of Konzentration [g] is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in Fraktionsgröße. There is not a statistically significant difference (P = 0,591).

The effect of different levels of Fraktionsgröße does not depend on what level of Konzentration [g] is present. There is not a statistically significant interaction between Fraktionsgröße and Konzentration [g]. (P = 0,749)

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Fraktionsgröße : 0,757
Power of performed test with alpha = 0,0500: for Konzentration [g] : 0,0500
Power of performed test with alpha = 0,0500: for Fraktionsgröß x Konzentration : 0,0500

Least square means for Fraktionsgröße :

Group	Mean	SEM
>630 µm	0,118	0,00959
630-200µm	0,120	0,00959
200-63µm	0,0779	0,00959
0,000	0,118	0,00857

Least square means for Konzentration [g] :

Group	Mean	SEM
1,000	0,101	0,00959
0,500	0,109	0,00959
0,1000	0,106	0,00959
0,000	0,118	0,00857

Least square means for Fraktionsgröß x Konzentration :

Group	Mean	SEM
>630 µm x 1,000	0,117	0,0198
>630 µm x 0,500	0,127	0,0198
>630 µm x 0,100	0,112	0,0198
>630 µm x 0,000	0,118	0,0171

630-200µm x 1,000	0,114	0,0198
630-200µm x 0,500	0,125	0,0198
630-200µm x 0,100	0,124	0,0198
630-200µm x 0,000	0,118	0,0171
200-63µm x 1,000	0,0546	0,0198
200-63µm x 0,500	0,0671	0,0198
200-63µm x 0,100	0,0718	0,0198
200-63µm x 0,000	0,118	0,0171
0,000 x 1,000	0,118	0,0171
0,000 x 0,500	0,118	0,0171
0,000 x 0,100	0,118	0,0171
0,000 x 0,000	0,118	0,0171

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Bonferroni t-test):

Comparisons for factor: **Fraktionsgröße**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
630-200µm vs. 200-63µm	0,0423	3,119	0,020	Yes
630-200µm vs. 0,000	0,00208	0,162	1,000	No
630-200µm vs. >630 µm	0,00183	0,135	1,000	Do Not Test
>630 µm vs. 200-63µm	0,0405	2,984	0,029	Yes
>630 µm vs. 0,000	0,000255	0,0199	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 200-63µm	0,0402	3,125	0,020	Yes

Comparisons for factor: **Konzentration [g]**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
0,000 vs. 1,000	0,0174	1,349	1,000	No
0,000 vs. 0,100	0,0116	0,903	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 0,500	0,00889	0,691	1,000	Do Not Test
0,500 vs. 1,000	0,00846	0,624	1,000	Do Not Test
0,500 vs. 0,100	0,00273	0,201	1,000	Do Not Test
0,100 vs. 1,000	0,00573	0,423	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Konzentration [g] within >630 µm**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
0,500 vs. 0,100	0,0143	0,511	1,000	No
0,500 vs. 1,000	0,00997	0,356	1,000	Do Not Test
0,500 vs. 0,000	0,00843	0,322	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 0,100	0,00587	0,224	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 1,000	0,00154	0,0587	1,000	Do Not Test
1,000 vs. 0,100	0,00433	0,155	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Konzentration [g] within 630-200µm**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
0,500 vs. 1,000	0,0113	0,404	1,000	No
0,500 vs. 0,000	0,00699	0,267	1,000	Do Not Test
0,500 vs. 0,100	0,00130	0,0465	1,000	Do Not Test
0,100 vs. 1,000	0,0100	0,358	1,000	Do Not Test
0,100 vs. 0,000	0,00569	0,217	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 1,000	0,00434	0,166	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Konzentration [g] within 200-63µm**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
0,000 vs. 1,000	0,0635	2,425	0,120	No
0,000 vs. 0,500	0,0510	1,946	0,353	Do Not Test

0,000 vs. 0,100	0,0463	1,767	0,510	Do Not Test
0,100 vs. 1,000	0,0172	0,616	1,000	Do Not Test
0,100 vs. 0,500	0,00468	0,167	1,000	Do Not Test
0,500 vs. 1,000	0,0126	0,448	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Konzentration [g] within 0**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
0,100 vs. 0,500	1,388E-017	5,722E-016	1,000	No
0,100 vs. 1,000	1,388E-017	5,722E-016	1,000	Do Not Test
0,100 vs. 0,000	0,000	0,000	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 0,500	1,388E-017	5,722E-016	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 1,000	1,388E-017	5,722E-016	1,000	Do Not Test
1,000 vs. 0,500	0,000	0,000	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Fraktionsgröße within 1**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
0,000 vs. 200-63µm	0,0635	2,425	0,120	No
0,000 vs. 630-200µm	0,00434	0,166	1,000	Do Not Test
0,000 vs. >630 µm	0,00154	0,0587	1,000	Do Not Test
>630 µm vs. 200-63µm	0,0620	2,214	0,197	Do Not Test
>630 µm vs. 630-200µm	0,00280	0,100	1,000	Do Not Test
630-200µm vs. 200-63µm	0,0592	2,114	0,246	Do Not Test

Comparisons for factor: **Fraktionsgröße within 0,5**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
>630 µm vs. 200-63µm	0,0594	2,121	0,242	No
>630 µm vs. 0,000	0,00843	0,322	1,000	Do Not Test
>630 µm vs. 630-200µm	0,00144	0,0515	1,000	Do Not Test
630-200µm vs. 200-63µm	0,0580	2,070	0,271	Do Not Test
630-200µm vs. 0,000	0,00699	0,267	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 200-63µm	0,0510	1,946	0,353	Do Not Test

Comparisons for factor: **Fraktionsgröße within 0,1**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
630-200µm vs. 200-63µm	0,0520	1,856	0,426	No
630-200µm vs. >630 µm	0,0116	0,413	1,000	Do Not Test
630-200µm vs. 0,000	0,00569	0,217	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 200-63µm	0,0463	1,767	0,510	Do Not Test
0,000 vs. >630 µm	0,00587	0,224	1,000	Do Not Test
>630 µm vs. 200-63µm	0,0404	1,443	0,941	Do Not Test

Comparisons for factor: **Fraktionsgröße within 0**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
>630 µm vs. 200-63µm	2,776E-017	1,144E-015	1,000	No
>630 µm vs. 630-200µm	2,776E-017	1,144E-015	1,000	Do Not Test
>630 µm vs. 0,000	1,388E-017	5,722E-016	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 200-63µm	1,388E-017	5,722E-016	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 630-200µm	1,388E-017	5,722E-016	1,000	Do Not Test
630-200µm vs. 200-63µm	0,000	0,000	1,000	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result

of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

Tabelle 12: Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse von Polyvinylchlorid mit Sigmaplot

One Way Analysis of Variance

Data source: PVC

Dependent Variable: Einzelgewicht

Normality Test (Shapiro-Wilk): Passed (P = 0,880)

Equal Variance Test (Brown-Forsythe): Passed (P = 0,595)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	3	0	0,110	0,0200	0,0115
0,1000	3	0	0,0900	0,0180	0,0104
0,01000	3	0	0,128	0,0161	0,00928
0,000	4	0	0,118	0,0415	0,0208

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	0,00241	0,000804	1,014	0,431
Residual	9	0,00714	0,000793		
Total	12	0,00955			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,431).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,052

The power of the performed test (0,052) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists.

Tabelle 13: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse von Polypropylen mit Sigmaplot

Two Way Analysis of Variance

Data source: PP

General Linear Model

Dependent Variable: Einzelgewicht

Normality Test (Shapiro-Wilk): Failed (P < 0,050)

Equal Variance Test (Brown-Forsythe): Failed (P < 0,050)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Fraktionsgröße	3	0,000867	0,000289	2,572	0,068
Konzentration	3	0,00238	0,000794	7,063	<0,001
Fraktionsgröß x Konzentration	9	0,00385	0,000427	3,802	0,002
Residual	39	0,00438	0,000112		
Total	54	0,0111	0,000205		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of Fraktionsgröße depends on what level of Konzentration [g] is present. There is a statistically significant interaction between Fraktionsgröße and Konzentration [g]. (P = 0,002)

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Fraktionsgröße : 0,381
Power of performed test with alpha = 0,0500: for Konzentration [g] : 0,940
Power of performed test with alpha = 0,0500: for Fraktionsgröß x Konzentration : 0,911

Least square means for Fraktionsgröße :

Group	Mean	SEM
>630 µm	0,0621	0,00296
630-200µm	0,0679	0,00296
200-63µm	0,0604	0,00296
0,000	0,0700	0,00269

Least square means for Konzentration [g] :

Group	Mean	SEM
1,000	0,0733	0,00296
0,500	0,0596	0,00296
0,1000	0,0575	0,00290
0,000	0,0700	0,00276

Least square means for Fraktionsgröß x Konzentration :

Group	Mean	SEM
>630 µm x 1,000	0,0667	0,00612
>630 µm x 0,500	0,0550	0,00612
>630 µm x 0,100	0,0567	0,00612
>630 µm x 0,000	0,0700	0,00530
630-200µm x 1,000	0,0750	0,00612
630-200µm x 0,500	0,0533	0,00612
630-200µm x 0,100	0,0733	0,00612
630-200µm x 0,000	0,0700	0,00530
200-63µm x 1,000	0,0817	0,00612
200-63µm x 0,500	0,0600	0,00612
200-63µm x 0,100	0,0300	0,00612

200-63µm x 0,000	0,0700	0,00530
0,000 x 1,000	0,0700	0,00530
0,000 x 0,500	0,0700	0,00530
0,000 x 0,100	0,0700	0,00474
0,000 x 0,000	0,0700	0,00612

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Bonferroni t-test):

Comparisons for factor: **Fraktionsgröße**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
0,000 vs. 200-63µm	0,00958	2,393	0,130	No
0,000 vs. >630 µm	0,00792	1,977	0,331	Do Not Test
0,000 vs. 630-200µm	0,00208	0,520	1,000	Do Not Test
630-200µm vs. 200-63µm	0,00750	1,790	0,488	Do Not Test
630-200µm vs. >630 µm	0,00583	1,392	1,000	Do Not Test
>630 µm vs. 200-63µm	0,00167	0,398	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Konzentration [g]**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
1,000 vs. 0,100	0,0158	3,817	0,003	Yes
1,000 vs. 0,500	0,0138	3,281	0,013	Yes
1,000 vs. 0,000	0,00333	0,823	1,000	No
0,000 vs. 0,100	0,0125	3,121	0,020	Yes
0,000 vs. 0,500	0,0104	2,573	0,084	No
0,500 vs. 0,100	0,00208	0,502	1,000	No

Comparisons for factor: **Konzentration [g] within >630 µm**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
0,000 vs. 0,500	0,0150	1,853	0,429	No
0,000 vs. 0,100	0,0133	1,647	0,646	Do Not Test
0,000 vs. 1,000	0,00333	0,412	1,000	Do Not Test
1,000 vs. 0,500	0,0117	1,348	1,000	Do Not Test
1,000 vs. 0,100	0,01000	1,155	1,000	Do Not Test
0,100 vs. 0,500	0,00167	0,193	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Konzentration [g] within 630-200µm**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
1,000 vs. 0,500	0,0217	2,503	0,100	No
1,000 vs. 0,000	0,00500	0,618	1,000	Do Not Test
1,000 vs. 0,100	0,00167	0,193	1,000	Do Not Test
0,100 vs. 0,500	0,0200	2,310	0,157	Do Not Test
0,100 vs. 0,000	0,00333	0,412	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 0,500	0,0167	2,058	0,278	Do Not Test

Comparisons for factor: **Konzentration [g] within 200-63µm**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**P**	**P<0,050**
1,000 vs. 0,100	0,0517	5,969	<0,001	Yes
1,000 vs. 0,500	0,0217	2,503	0,100	No
1,000 vs. 0,000	0,0117	1,441	0,946	Do Not Test
0,000 vs. 0,100	0,0400	4,940	<0,001	Yes
0,000 vs. 0,500	0,01000	1,235	1,000	Do Not Test
0,500 vs. 0,100	0,0300	3,466	0,008	Yes

Comparisons for factor: **Konzentration [g] within 0**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
1,000 vs. 0,000	2,776E-017	3,428E-015	1,000	No
1,000 vs. 0,100	1,388E-017	1,951E-015	1,000	Do Not Test
1,000 vs. 0,500	0,000	0,000	1,000	Do Not Test
0,500 vs. 0,000	2,776E-017	3,428E-015	1,000	Do Not Test
0,500 vs. 0,100	1,388E-017	1,951E-015	1,000	Do Not Test
0,100 vs. 0,000	1,388E-017	1,792E-015	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Fraktionsgröße within 1**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
200-63µm vs. >630 µm	0,0150	1,733	0,546	No
200-63µm vs. 0,000	0,0117	1,441	0,946	Do Not Test
200-63µm vs. 630-200µm	0,00667	0,770	1,000	Do Not Test
630-200µm vs. >630 µm	0,00833	0,963	1,000	Do Not Test
630-200µm vs. 0,000	0,00500	0,618	1,000	Do Not Test
0,000 vs. >630 µm	0,00333	0,412	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Fraktionsgröße within 0,5**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
0,000 vs. 630-200µm	0,0167	2,058	0,278	No
0,000 vs. >630 µm	0,0150	1,853	0,429	Do Not Test
0,000 vs. 200-63µm	0,01000	1,235	1,000	Do Not Test
200-63µm vs. 630-200µm	0,00667	0,770	1,000	Do Not Test
200-63µm vs. >630 µm	0,00500	0,578	1,000	Do Not Test
>630 µm vs. 630-200µm	0,00167	0,193	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Fraktionsgröße within 0,1**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
630-200µm vs. 200-63µm	0,0433	5,006	<0,001	Yes
630-200µm vs. >630 µm	0,0167	1,925	0,369	No
630-200µm vs. 0,000	0,00333	0,431	1,000	Do Not Test
0,000 vs. 200-63µm	0,0400	5,166	<0,001	Yes
0,000 vs. >630 µm	0,0133	1,722	0,558	Do Not Test
>630 µm vs. 200-63µm	0,0267	3,081	0,023	Yes

Comparisons for factor: **Fraktionsgröße within 0**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
630-200µm vs. 0,000	4,163E-017	5,142E-015	1,000	No
630-200µm vs. >630 µm	1,388E-017	1,851E-015	1,000	Do Not Test
630-200µm vs. 200-63µm	0,000	0,000	1,000	Do Not Test
200-63µm vs. 0,000	4,163E-017	5,142E-015	1,000	Do Not Test
200-63µm vs. >630 µm	1,388E-017	1,851E-015	1,000	Do Not Test
>630 µm vs. 0,000	2,776E-017	3,428E-015	1,000	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

Tabelle 14: Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse von Polypropylen mit Sigmaplot

One Way Analysis of Variance

Data source: Copy of Copy of PP ALL in 25.5.

Dependent Variable: Einzelgewicht

Normality Test (Shapiro-Wilk): Passed (P = 0,079)

Equal Variance Test (Brown-Forsythe): Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Copy of Copy of PP ALL in 25.5.

Group	N	Missing	Median	25%	75%
0,500	3	0	0,0700	0,0350	0,110
0,0500	3	0	0,0650	0,0500	0,0750
0,00500	3	0	0,0500	0,0500	0,0550
0,000	4	0	0,0725	0,0625	0,0750

H = 3,525 with 3 degrees of freedom. (P = 0,317)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,317)