



Vorkommen und Auswirkungen von Mikroplastik in einheimischen Flussmuscheln (*Unio sp.*)



wasser





Vorkommen und Auswirkungen von Mikroplastik in einheimischen Flussmuscheln (*Unio sp.*)

Impressum

Vorkommen und Auswirkungen von Mikroplastik in einheimischen Flussmuscheln (*Unio sp.*)

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)

Bürgermeister-Ulrich-Straße 160

86179 Augsburg

Tel.: 0821 9071-0

E-Mail: poststelle@lfu.bayern.de

Internet: www.lfu.bayern.de/

Konzept/Text:

LfU, Jessica Fischer, Dr. Janina Domogalla-Urbansky, Hermann Ferling, Karin Scholz-Göppel, Dr. Julia Schwaiger

Redaktion:

LfU, Jessica Fischer, Dr. Julia Schwaiger

Bildnachweis:

LfU: Abb. 1, Abb. 2, Abb. 4, Abb. 12 – Abb. 24, Abb. 35 – Abb. 42, Anhang.

Bayerische Vermessungsverwaltung 2019, EuroGeographics, BayernAtlas: Abb. 3.

PD Dr. Natalia Ivleva, Institut für Wasserchemie & Chemische Balneologie (IWC), Technische Universität München (TUM), Elisabeth-Winterhalter-Weg 6, 81377 München: Abb. 5 – Abb. 11, Abb. 25 – Abb. 34.

Stand:

April 2021

Diese Publikation wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbenden oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Publikation nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Publikation zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die publizistische Verwertung der Veröffentlichung – auch von Teilen – wird jedoch ausdrücklich begrüßt. Bitte nehmen Sie Kontakt mit dem Herausgeber auf, der Sie – wenn möglich – mit digitalen Daten der Inhalte und bei der Beschaffung der Wiedergaberechte unterstützt.

Diese Publikation wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Tel. 0 89 12 22 20 oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Inhaltsverzeichnis

1	Hintergrund des Forschungsvorhabens	6
1.1	(Mikro)Plastik und dessen Eintrag in die aquatische Umwelt	6
1.2	Auswirkungen von Mikroplastik auf aquatische Organismen	7
1.3	Vorkommen und Auswirkungen von Mikroplastik in Muscheln	8
2	Untersuchungen zur Aufnahme und Wirkung von Mikroplastik in Flussmuscheln	11
2.1	Freilandexposition an der Kläranlage Weißenburg	11
2.1.1	Versuchsaufbau und Probennahme	12
2.1.2	Mikroplastik-Analyse mittels Raman-Mikrospektroskopie	15
2.2	Exposition in PVC-Mikropartikeln unter Laborbedingungen	18
2.2.1	Versuchsaufbau und Probennahme	19
2.2.2	PVC-Nachweis mittels Raman-Mikrospektroskopie	24
2.2.3	Auswirkungen von PVC-Mikropartikeln auf die Muschelgesundheit	24
2.2.3.1	Pathologische Anatomie und Histopathologie	24
2.2.3.2	Klinische Chemie und Biomarker	25
2.2.4	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Freilandexposition an der Kläranlage Weißenburg	28
3.1.1	Mikroplastik-Analyse mittels Raman-Mikrospektroskopie	28
3.2	Exposition in PVC-Mikropartikeln unter Laborbedingungen	31
3.2.1	PVC-Analyse mittels Raman-Mikrospektroskopie	31
3.2.2	Auswirkungen der PVC-Mikropartikel auf die Muschelgesundheit	34
3.2.2.1	Pathologische Anatomie und Histopathologie	34
3.2.2.2	Klinische Chemie und Biomarker	36
4	Diskussion	41
4.1	Verfahrensunsicherheiten und Grenzen der Interpretation	41
4.1.1	Kontamination	41
4.1.2	Einfluss des chemischen Aufschlusses und der Analysemethode	41
4.2	Aufnahme und Wirkung von Mikroplastik in Flussmuscheln	43
4.2.1	Freilandexposition an der Kläranlage Weißenburg	43

4.2.2	Exposition mit PVC-Mikropartikeln unter Laborbedingungen	44
4.2.2.1	Mikroplastik-Aufnahme und Depuration	45
4.2.2.2	Pathologische Anatomie und Histopathologie	46
4.2.2.3	Klinische Chemie und Biomarker	47
5	Zusammenfassung	50
6	Literaturverzeichnis	52
7	Abkürzungsverzeichnis	62
8	Anhang	64

Vorwort

Kunststoffe stellen aufgrund ihrer vielfältigen Anwendungsbereiche unverzichtbare Bestandteile unseres Alltags dar. Sie werden in sehr großen Mengen produziert und können auf verschiedenen Wegen in die Umwelt gelangen. Die Verschmutzung der Weltmeere durch Kunststoffmüll ist seit langem bekannt. In den letzten Jahren erfährt nun auch das Thema „Mikroplastik“ in Binnengewässern zunehmende Bedeutung.

Das Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) startete bereits 2014 eine Mikroplastikinitiative und beauftragte das Bayerische Landesamt für Umwelt (LfU) mit der Durchführung des Fachvorhabens „Eintragspfade, Vorkommen und Verteilung von Mikroplastikpartikeln in bayerischen Gewässern sowie mögliche Auswirkungen auf aquatische Organismen“.

In einem ersten Schritt erfolgte in Kooperation mit der Universität Bayreuth eine methodische Optimierung und Standardisierung der Probenahme- und Nachweisverfahren und damit einhergehend eine Ermittlung der Mikroplastik-Belastung verschiedener Gewässerkompartimente ausgewählter bayerischer Flüsse und Seen. Die Ergebnisse wurden größtenteils bereits veröffentlicht (Heß et al. 2018; Schwaiger 2019).

Ein weiteres Ziel des Fachvorhabens bestand darin, einheimische Süßwassermuscheln (*Unio sp.*) auf das Vorkommen und mögliche Auswirkungen von Mikroplastik zu untersuchen. Grundlage der Studie waren zwei Expositionsversuche. Der erste Versuch erfolgte im Freiland an einem kommunalen Kläranlagenstandort und diente dazu zu überprüfen, inwieweit im gereinigten Abwasser, sowie im Fließgewässer oberhalb und unterhalb des Kläranlagenablaufs exponierte Muscheln Mikroplastik aufnehmen. In einem zweiten Expositionsversuch, der unter standardisierten Laborbedingungen erfolgte, wurden die Aufnahme, Anreicherung und Abgabe von PVC-Mikropartikeln durch Muscheln analysiert. Der Nachweis von Mikroplastik-Partikeln im Gewebe der Muscheln anhand von Raman-Spektroskopie wurde an der Technischen Universität München (AG PD Dr. Natalia P. Ileva, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie) durchgeführt. Neben dem Nachweis von Mikroplastik erfolgten durch das LfU umfangreiche Untersuchungen zur Ermittlung möglicher Auswirkungen von PVC-Mikropartikeln auf Muscheln. In vorliegendem Bericht werden die im Rahmen der beiden Versuche erhobenen Ergebnisse zusammengefasst.

1 Hintergrund des Forschungsvorhabens

1.1 (Mikro)Plastik und dessen Eintrag in die aquatische Umwelt

Kunststoffe sind ein unverzichtbarer Bestandteil unseres täglichen Lebens. Weltweit wurden allein im Jahr 2018 circa 359 Millionen Tonnen Plastik hergestellt. Davon wurden 51,2 Millionen Tonnen in Europa eingesetzt, wobei allein auf Deutschland ein Viertel des europäischen Verbrauchs fiel. Die Haupteinsatzgebiete dieser Kunststoffe sind Verpackungen (39,9 %) und die Bauindustrie (19,8 %). Mit Anteilen von je unter 10 % finden sie außerdem Verwendung in der Automobilindustrie, in Elektro- und Elektronikprodukten, im Agrarbereich, in Haushalts- und Freizeitprodukten und vielen weiteren Bereichen (PlasticsEurope, 2019). Die Gründe für diese hohen Verbrauchsmengen an Kunststoffen liegen sowohl in den geringen Produktions- und Anschaffungskosten, als auch in deren vielseitiger Einsetzbarkeit aufgrund der Materialeigenschaften wie z. B. guter Formbarkeit, Bruchfestigkeit und Elastizität, sowie einer vergleichsweise hohen chemischen und thermischen Beständigkeit. Durch die Zugabe von Additiven bei der Herstellung werden die Kunststoffeigenschaften noch weiter an bestimmte Verwendungszwecke angepasst (Maier & Schiller, 2016). Allerdings sind all diese Eigenschaften auch dafür verantwortlich, dass Kunststoffe eine hohe Umweltpersistenz aufweisen.

Zu den Kunststoffen mit den europaweit höchsten Bedarfsmengen zählen Polyethylen (PE mit 29,7 % davon 17,5 % PE-LD/PE-LLD und 12,2 % PE-HD/PE-MD), Polypropylen (PP; 19,3 %) und Polyvinylchlorid (PVC; 10,0 %). Der Anteil von Polyurethan (PUR), Polyethylenterephthalat (PET) und Polystyrol (PS) am Gesamtbedarf liegt jeweils zwischen 5 % und 10 % (PlasticsEurope, 2019). Entsprechend ihrer Herstellungs- und Verbrauchsmengen finden sich die Kunststoffsorten in der Regel auch in der Umwelt wieder (Dris et al., 2018; Wagner et al., 2014).

Für die Bewertung der Umweltrelevanz ist aber nicht nur die Kunststoffsorte, sondern auch die Größe der Plastikteile entscheidend. Daher wurde eine Einteilung in verschiedene Größenklassen empfohlen, die mittlerweile auch mehrheitlich akzeptiert wird. Nach dieser Einteilung werden Plastikteile größer als 5 mm als Makroplastik bezeichnet, wobei es Vorschläge gibt solche Teile noch einmal in Mesoplastik (5–25 mm) und Makroplastik (> 25 mm) zu unterteilen (Kershaw et al., 2019). Partikel kleiner 5 mm werden als Mikroplastik bezeichnet (Hidalgo-Ruz et al., 2012), seltener wird auch eine Obergrenze von 1 mm angegeben (Rauscher et al., 2014). Eine allgemeine Abgrenzung nach unten gibt es bisher nicht (Frias & Nash, 2019; Hartmann et al., 2019). Die in verschiedenen Studien vorgeschlagenen Untergrenzen variieren zwischen 100 nm (Duis & Coors, 2016), 1 µm (Hidalgo-Ruz et al., 2012; Ivleva et al., 2017) und 20 µm (Galgani et al., 2013).

Je nach Herkunft wird Mikroplastik noch einmal in zwei weitere Kategorien unterschieden. Als „primäres Mikroplastik“ werden Partikel bezeichnet, die zielgerichtet industriell hergestellt werden. Dazu gehören beispielsweise Microbeads und abrasive Partikel für Kosmetika, Reinigungs- und Strahlmittel sowie Granulate und Pellets als Grundstoffe der Kunststoffindustrie (Bertling, Hamann, & Hiebel, 2018; Fendall & Sewell, 2009). In Gewässer kann primäres Mikroplastik zum Beispiel über den Abwasserpfad oder als verlorenes Frachtgut eingetragen werden. Mengemäßig macht es einen eher geringen Anteil der Umweltbelastung mit Mikroplastik aus (Miklos et al., 2016).

„Sekundäres Mikroplastik“ stellt nach heutigem Kenntnisstand den Hauptanteil des in der Umwelt vorkommenden Mikroplastiks dar (Barnes et al., 2009; Bertling, Bertling & Hamann, 2018). Es entsteht, wenn größere Plastikteile durch mechanische, physikochemische oder biologische Prozesse fragmentieren. Der Großteil des sekundären Mikroplastiks stammt aus unsachgemäß entsorgtem Plastikmüll, der in der Umwelt zerfällt (Duis & Coors, 2016). Darüber hinaus kann sekundäres Mikroplastik auch während der Nutzung von Produkten entstehen. Beispiele dafür sind Reifenabrieb aus dem Straßenverkehr (Capolupo et al., 2020), Fragmente landwirtschaftlich genutzter Kunststoffe wie zum Beispiel Folien, und Düngemittelmantelungen (Piehl et al., 2018) und Textilfasern (Haap et al., 2019).

Die Verschmutzung der Weltmeere mit Mikroplastik ist seit langem bekannt (Carpenter et al., 1972) und vergleichsweise gut dokumentiert (Bergmann et al., 2015). Trotz eines kausalen Zusammenhangs der Belastung von marinen Ökosystemen und Binnengewässern (Rech et al., 2014) erfolgte eine gezielte Untersuchung von Flüssen und Seen erst in den vergangenen zehn Jahren (Faure et al., 2012; Imhof et al., 2013), sodass bisher nur wenige belastbare Daten zu relevanten Eintragungspfaden in solche Gewässer vorliegen (Dris et al., 2018).

1.2 Auswirkungen von Mikroplastik auf aquatische Organismen

Genauso wie das Vorkommen von Mikroplastik in Binnengewässern sind auch dessen Aufnahme und vor allem dessen Wirkung auf die darin lebenden Organismen bisher nicht ausreichend erforscht (Anbumani & Kakkar, 2018; Xu et al., 2020). Allerdings wurde sowohl für marine als auch für Süßwasserorganismen beschrieben, dass Mikroplastik nach der Aufnahme beziehungsweise Ingestion schädigende Wirkungen entfalten kann. Neben direkten, mechanischen Auswirkungen, wie dem Verschluss oder einer Verletzung des Gastrointestinaltrakts (Browne et al., 2008; Lei et al., 2018; Moos et al., 2012; Pedà et al., 2016), können indirekte Folgen auftreten, die nicht von den Polymeren selbst oder den physischen Eigenschaften der Partikel ausgehen.

So kann (Mikro-)Plastik beispielsweise als Vektor für die zugegebenen Additive fungieren, welche freigesetzt werden und toxische sowie hormonähnliche Wirkungen entfalten können (Lithner, 2011; Sonnenschein & Soto, 1998; Talsness et al., 2009). Zudem weisen einzelne Studien darauf hin, dass an der Oberfläche von Kunststoffpartikeln adsorbierte organische Verbindungen, wie zum Beispiel POPs (persistent organic pollutants), nach der Ingestion zu einer erhöhten Schadstoffbelastung der aquatischen Lebewesen führen können (Besseling et al., 2013; Rochman et al., 2013; Sørensen et al., 2019; Teuten et al., 2009). Möglicherweise nimmt dieser Belastungspfad mit dem fortschreitenden Zerfall von Plastikteilen sogar zu, denn umso kleiner Partikel sind, umso größer wird deren Oberfläche im Verhältnis zum Volumen (Bakir et al., 2014; Guo & Wang, 2019; Koelmans et al., 2013; Velzeboer et al., 2014). Kleinere Partikel verbleiben außerdem meist länger im Gastrointestinaltrakt und translokieren leichter in Gewebe, da die dafür nötigen Mechanismen (Pinocytose, Phagozytose) von der Partikelgröße abhängig sind (Xu et al., 2020). Durch die mittlerweile nachgewiesene Weitergabe und Anreicherung von Mikroplastik innerhalb von Nahrungsketten (Farrell & Nelson, 2013; Murray & Cowie, 2011; Setälä et al., 2014) können sämtliche Auswirkungen nicht nur die Organismen betreffen, die die Partikel aufnehmen, sondern auch deren Prädatoren.

Bei der Evaluierung der in der wissenschaftlichen Literatur und in populärwissenschaftlichen Artikeln beschriebenen Risiken von Mikroplastik für Mensch und Tier wird deutlich, dass diese gegenwärtig sehr kontrovers diskutiert werden (Kramm et al., 2018; Ogonowski et al., 2018; Völker et al., 2019). Dies liegt unter anderem daran, dass die Wirkungsforschung zu Mikroplastik noch sehr jung ist und es oft an Grundlagen fehlt, um Studien mit den korrekten Vorannahmen durchführen und Ergebnisse richtig einordnen zu können. So stellt sich bei vielen Studienergebnissen beispielsweise die Frage, ob sich Mikroplastik-induzierte Effekte von denen unterscheiden, die durch natürlich im Gewässer vorhandene, anorganische (Sandkörner, Lehm, etc.) und organische (Zellulose, Chitin, etc.) Partikel hervorgerufen werden. Auch diese Partikel können prinzipiell den Gastrointestinaltrakt oder die Kiemen verletzen und Schadstoffe adsorbieren (Koelmans et al., 2017; Schür et al., 2020). In einem aktuellen Übersichtsartikel wird zudem hinterfragt, ob manche der beschriebenen Auswirkungen nicht eher das Resultat eines reduzierten Nahrungsangebotes darstellen, als eine toxisch bedingte Reaktion auf Kunststoffpartikel (Ogonowski et al., 2018). So erfolgt in vielen experimentellen Studien die Mikroplastik-Exposition oral, indem Futter verabreicht wird, das in Teilen durch nährstoffarmes Mikroplastik substituiert wurde. Die meisten ökotoxikologischen Studien wurden darüber hinaus nicht mit umweltrelevanten, sondern deutlich höheren Mikroplastik-Konzentrationen durchgeführt. Diese Vorgehensweise wird zum Teil dadurch begründet, dass die Konzentrationen in der Umwelt anhand der aktuellen

Sampling- und Analysemethoden nicht exakt bestimmt werden können. Für die meisten Gewässer liegen keine validen, quantitativen Daten vor (Waldschläger, 2019), die mit den derzeitigen state-of-the-art Methoden erhoben wurden (Cabernard et al., 2018; Stock et al., 2019). Die in vielen Studien eingesetzten Konzentrationen sind so hoch, dass sie die aktuell meist in der Umwelt vorhandenen Konzentrationen deutlich überschreiten (Lenz et al., 2016). Derartige Studien sind zwar geeignet um erste Erkenntnisse zu möglichen Auswirkungen von Mikroplastik auf Gewässerorganismen zu erlangen, ihre Aussagekraft hinsichtlich der realen Belastungssituation in der Umwelt ist allerdings eher gering (Adam et al., 2019). Zudem werden meist fabrikneue Mikroplastikpartikel verwendet, die natürlichen Prozessen, wie Biofouling und Degradation, welche beispielsweise die Oberfläche verändern, nicht ausgesetzt waren, sodass auch hier nur eine geringe Umweltrelevanz gegeben ist. In den Laborstudien, in denen eine Exposition an gealterten Partikeln erfolgte, wurde auf künstliche Alterungsprozesse und Coatings zurückgegriffen (Fu et al., 2019; Vroom et al., 2017).

Ein grundsätzliches Problem, das bei der Abschätzung und Diskussion des ökologischen Risikos von Mikroplastik oft außer Acht gelassen wird ist, dass unter diesem Begriff partikuläre Materialien mit hochdiversen Eigenschaften vereint sind. Abgesehen von den Eigenschaften der diversen Kunststoffe selbst, die wie schon beschrieben noch verschiedensten Modifikationen unterworfen sein können (Additive, Desorption, etc.), besitzen die Partikel eine unterschiedliche Größe (wenige Mikrometer bis 5 Millimeter), Form (Microbeads, Bruchstücke und Fragmente, Fasern und Folienreste) sowie Oberflächenbeschaffenheit (Hidalgo-Ruz et al., 2012). Diese extreme Vielzahl von möglichen Eigenschaften unterscheidet Mikroplastik von den meisten anderen Umweltschadstoffen und macht generelle Aussagen zu Risiken und Wirkung sehr schwierig bis fehlerhaft (Koelmans et al., 2017).

1.3 Vorkommen und Auswirkungen von Mikroplastik in Muscheln

Muscheln werden im Vollzug der Oberflächengewässerverordnung (OGewV, 2016) zur Überwachung von Umweltqualitätsnormen prioritärer Schadstoffe eingesetzt. Sie nehmen große Mengen an Wasser zur Nahrungsaufnahme und Respiration filtrieren, aber eine eher geringe Exkretionsrate und metabolische Kapazität zur Degradation von Schwermetallen oder toxischen organischen Stoffen aufweisen. Eine dadurch mögliche Schadstoffakkumulation in Kombination mit der (mehr oder weniger) sessilen Lebensweise von Muscheln ermöglicht die zeitliche Integration von Belastungen an einem Standort. Auch sind Trendanalysen durch wiederholte Beprobungen an einem Standort möglich, da Muscheln in der Regel stabile lokale Populationen ausbilden. Die Tiere können außerdem unabhängig vom tatsächlichen Vorkommen im Rahmen eines aktiven Monitorings, beispielsweise in Netzkäfigen, an bestimmten Messstellen exponiert und so gezielt zur Schadstoffüberwachung in einem Gewässer genutzt werden (Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003; Signa et al., 2015). Muscheln können so Informationen zur Bioverfügbarkeit von Schadstoffen liefern und gleichzeitig eine Erfassung schadstoffbedingter Wirkungen ermöglichen indem beispielsweise histopathologische Veränderungen gekoppelt mit klinisch-chemischen und physiologischen Reaktionen untersucht werden (Dailianis, 2011).

Da die bisher untersuchten Salzwassermuscheln Mikroplastik aufnehmen und dieses anschließend über einen gewissen Zeitraum im Gastrointestinaltrakt (und womöglich auch in anderen Geweben) verbleibt, wurden in den letzten Jahren verschiedene Arten als Mikroplastik-Indikatoren herangezogen (Li et al., 2019; Wesch et al., 2016). Bereits in den 1970er Jahren wurden im Rahmen von Laborversuchen umfangreiche Ergebnisse sowohl zur Aufnahme als auch zur Wiederabgabe (Depuration) von Mikroplastik-Partikeln durch filtrierende Salzwassermuscheln erarbeitet (Ward et al., 2019). In diesen frühen Expositionsexperimenten lag der Fokus allerdings nicht auf Mikroplastik, sondern auf den Mechanismen der Nahrungsaufnahme, der Verdauung und der Partikelselektion. Mikroplastik wurde dabei nur genutzt, da verschiedene Partikel-Sorten mit definierten Eigenschaften (Größe, Coating, Polymer, etc.) im Handel erhältlich waren. Aufgrund des völlig divergenten Fokus finden die Ergebnisse

dieser frühen Studien in der derzeitigen Mikroplastik-Forschung allerdings kaum Beachtung. So werden bereits bekannte physiologische Eigenschaften der eingesetzten Muschelspezies außer Acht gelassen und beispielsweise Partikelgrößen verwendet, die die Muscheln kaum oder gar nicht aufnehmen. Viele der in den letzten Jahren durchgeführten Experimente redundant oder sogar fehlerhaft wodurch die Aufnahme von Mikroplastik oft deutlich über- oder unterschätzt wird (Ward et al., 2019).

Erst seit Mikroplastik als Umweltkontaminante in den Fokus der Forschung gerückt ist, werden mögliche Auswirkungen von Mikroplastik auf Muscheln systematisch untersucht. Viele Faktoren – von der Diversität der Mikroplastik-Eigenschaften über die Nutzung unterschiedlichster, meist nicht umweltrelevanter Konzentrationen und Expositionsdauern sowie verschiedener Nachweismethodik – erschweren die Interpretation der Ergebnisse von Studien an Muscheln. Eine direkte Vergleichbarkeit ist daher für einen Großteil der Studien nicht gegeben, wobei insgesamt aber meist negative Wirkungen beobachtet wurden. So führte eine Exposition in PS-Partikeln mit einem Durchmesser von 6 µm und 10 µm bei Konzentrationen von 0,25 µg/l, 2,5 µg/l und 25 µg/l sowie in PS-Partikeln mit einem Durchmesser von 2 µm und 6 µm und einer Konzentration von 23 µg/l bei Perlaustern (*Pinctada margaritifera*) und Pazifischen Austern (*Crassostrea gigas*) zu einer Reduktion der Futteraufnahme beziehungsweise der Assimilation, wodurch deren Energiehaushalt und letztendlich auch deren Wachstum und Lokomotion beeinträchtigt wurden (Gardon et al., 2018; Sussarellu et al., 2016). Bei Grünen Miesmuscheln (*Perna viridis*) wurde in Anwesenheit von PVC-Mikropartikeln in einer Größe von 1 bis 50 µm und Konzentrationen von 0 mg/l, 21.6 mg/l, 216 mg/l, 2160 mg/l eine Abnahme der Byssus-Produktion, der Futteraufnahme, sowie der Respirationsrate nachgewiesen. Nach dreimonatiger Exposition war mit steigender Partikelkonzentration außerdem eine erhöhte Mortalitätsrate messbar, die darauf zurückgeführt wurde, dass die Muscheln aufgrund erhöhter Partikelzahlen die Schale lange geschlossen hielten (Rist et al., 2016). Im Gegensatz dazu wurde bei Europäischen Austern (*Ostrea edulis*) nach Polylactide-Exposition (PLA, Partikelgröße unbekannt, 80 µg/l) eine geringfügige Steigerung der Respirationsrate festgestellt (Green, 2016). In Rotfleischigen Archenmuscheln (*Tegillarca granosa*) und Gemeinen Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) lösten PS-Mikropartikel in einer Größe von 0,5 µm und 30 µm bei 1 mg/l beziehungsweise in einer Größe von 2 µm und 6 µm bei 32 µg/l unter anderem Veränderungen der Hämozytenanzahl, der Phagozytose-Aktivität und der Lysozymmenge und -aktivität aus. Darüber hinaus erhöhte sich die Menge der intrazellulären Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species), sodass eine messbare Immunotoxizität der PS-Partikel nachgewiesen werden konnte (Paul-Pont et al., 2016; Tang et al., 2020). Weiterhin wurden in verschiedenen Studien entzündliche Veränderungen beobachtet (Paul-Pont et al. 2016; Moos et al. 2012; Sıkdokur et al. 2020). Mikroplastik wirkt sich auch auf die Reproduktion verschiedener Muscheln aus. So waren die Gametogenese von Perlaustern (Gardon et al., 2018) sowie die Ontogenese, die Anzahl und Qualität der Gameten und der Befruchtungserfolg von Pazifischen Austern (Sussarellu et al., 2016) in Anwesenheit von PS-Partikeln (von 6 µm und 10 µm bei 0,25 µg/l, 2,5 µg/l und 25 µg/l; 2 µm und 6 µm bei 23 µg/l) signifikant vermindert. Im Gegensatz dazu konnten manche Studien aber auch keine Veränderung der untersuchten Parameter nach Mikroplastik-Exposition feststellen. Gemeine Miesmuscheln wiesen nach Exposition mit PS-Partikeln (2 µm und 4–16 µm bei 510 mg/l) beispielsweise weder eine signifikante Reduktion des oxidativen Status der Hämolymphe und der Phagozytoseaktivität noch der Filteraktivität auf (Browne et al., 2008). Allerdings wurden drei Tage nach der Exposition Mikropartikel beider Größen in der Hämolymphe und den Hämozyten nachgewiesen. In einer weiteren Studie, die den Einfluss von PS-Partikeln (70 nm–20 µm, Konzentration unbekannt) auf larvale Pazifische Austern untersuchte, wurde ebenfalls kein Einfluss auf die Futteraufnahme und das Wachstum festgestellt (Cole & Galloway, 2015).

Diese Übersicht zeigt, dass der Fokus der meisten verfügbaren Studien und Übersichtsartikel, die sich dem Thema Mikroplastik in Muscheln widmen (Dioses-Salinas et al., 2019; Kögel et al., 2019) ausschließlich auf marinen, für den menschlichen Verzehr kultivierten Muschelspezies liegt. Trotz dieser

vergleichsweise hohen Anzahl an Studien zeichnet sich allerdings selbst für diese Arten kein einheitliches Bild zur Wirkung von Mikroplastik ab. Entsprechende Studien an Süßwassermuscheln sind noch deutlich seltener, sodass die Datenlage zur Mikroplastik-Aufnahme und -Wirkung in Süßwassermuscheln bisher sehr gering ist (Su et al., 2018).

2 Untersuchungen zur Aufnahme und Wirkung von Mikroplastik in Flussmuscheln

Die Untersuchungen zur Aufnahme, Akkumulation und Depuration sowie zu Auswirkungen von Mikroplastik erfolgten an einheimischen Flussmuscheln. Durchgeführt wurde zum einen eine Freilandstudie, zum anderen ein Laborversuch, bei dem Muscheln unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen Mikroplastikpartikeln ausgesetzt wurden. Als Versuchstiere wurden die Malermuschel (*Unio pictorum*) und die Große Flussmuschel (*Unio tumidus*; Abb. 1) ausgewählt.

Bezogen wurden die Muscheln von der Firma Fördefisch (Handewitt). Nach der Lieferung erfolgte eine 14-tägige Hälterung in der Quarantänestation des LfU, Dienststelle Wielenbach. Im Anschluss wurden Individuen mit einer Länge von 7–11 cm auf Artniveau bestimmt und nach Art getrennt. In den Versuchen wurde dann im leichten Überschuss besetzt, um eventuelle Ausfälle zu kompensieren.

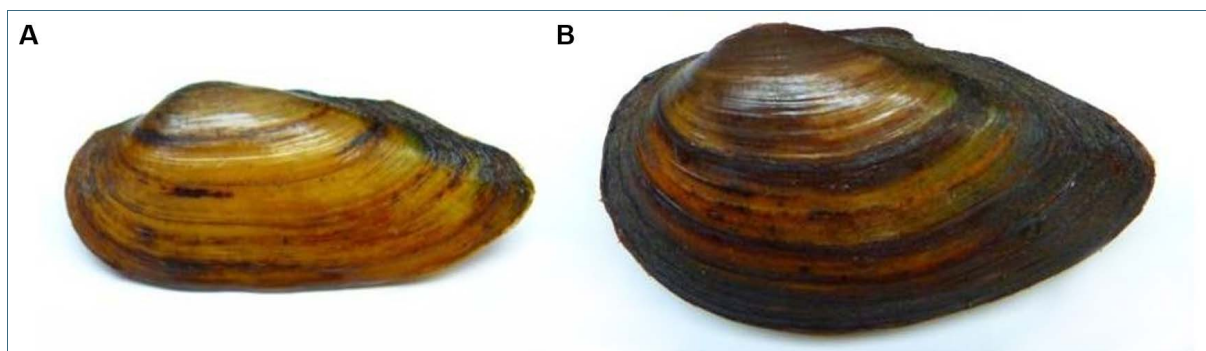


Abb. 1: A) Malermuschel (*Unio pictorum*), B) Große Flussmuschel (*Unio tumidus*)

2.1 Freilandexposition an der Kläranlage Weißenburg

Im Rahmen eines Expositionsversuches im Freiland wurde die Mikroplastik-Aufnahme von Malermuscheln über sechs Monate hinweg an unterschiedlich belasteten Standorten im Bereich einer Kläranlage (im gereinigten Abwasser sowie oberhalb und unterhalb der Abwassereinleitung ins Gewässer) untersucht. Bei der Abwasserbehandlung entfernen mechanisch-biologische Kläranlagen zwar in der Regel über 90 % des Mikroplastiks aus dem Abwasser (Mintenig et al., 2014), ein Teil kann jedoch in die Gewässer gelangen und dort potenziell von Gewässerorganismen aufgenommen werden (Bretas Alvim et al., 2020). Im Gewässer unterhalb einer Kläranlage kommt es dabei vermutlich zu keiner gleichbleibenden Mikroplastik-Exposition, sondern zu variierenden Belastungssituationen sowohl hinsichtlich der Konzentrationen von Mikroplastik als auch bezüglich der vertretenen Polymersorten.

Als Versuchsstandort wurde die Kläranlage Weißenburg ausgewählt (Tab. 1). Entscheidend für diese Wahl war die verhältnismäßig geringe Verdünnung des gereinigten Abwassers durch die als Vorfluter dienende Schwäbische Rezat. In einem Vorversuch im Jahr 2014 wurden die Daten zu den jeweiligen Wassermengen über einen Monat hinweg erhoben, wobei das Mischungsverhältnis zwischen Fließgewässer und Kläranlagenabfluss im Durchschnitt bei 5,5 zu 1 lag (Minimum 2,5 zu 1; Maximum 10 zu 1, Abb. 2). Es wird deshalb von einem relativ großen Einfluss des Abwassers auf die Parameter des Vorfluters unterhalb der Einleitstelle und somit auch auf die dort exponierten Muscheln ausgegangen.

Tab. 1: Einleitbedingungen Kläranlage der Stadt Weißenburg (verändert nach Krause et al. 2015).

Messgröße	Messwert
Ausbaugröße, Einwohnerwert (EW)	35.000 Einwohner
Mittlerer täglicher Trockenwetterabfluss (QT,d,aM)	7.000 m ³ /Tag
Maximaler stündlicher Trockenwetterabfluss (QT,h,max)	180 l/sek = 648 m ³ /h
Mischwasserabfluss zur Kläranlage (QM)	326 l/sek = 1.174 m ³ /h

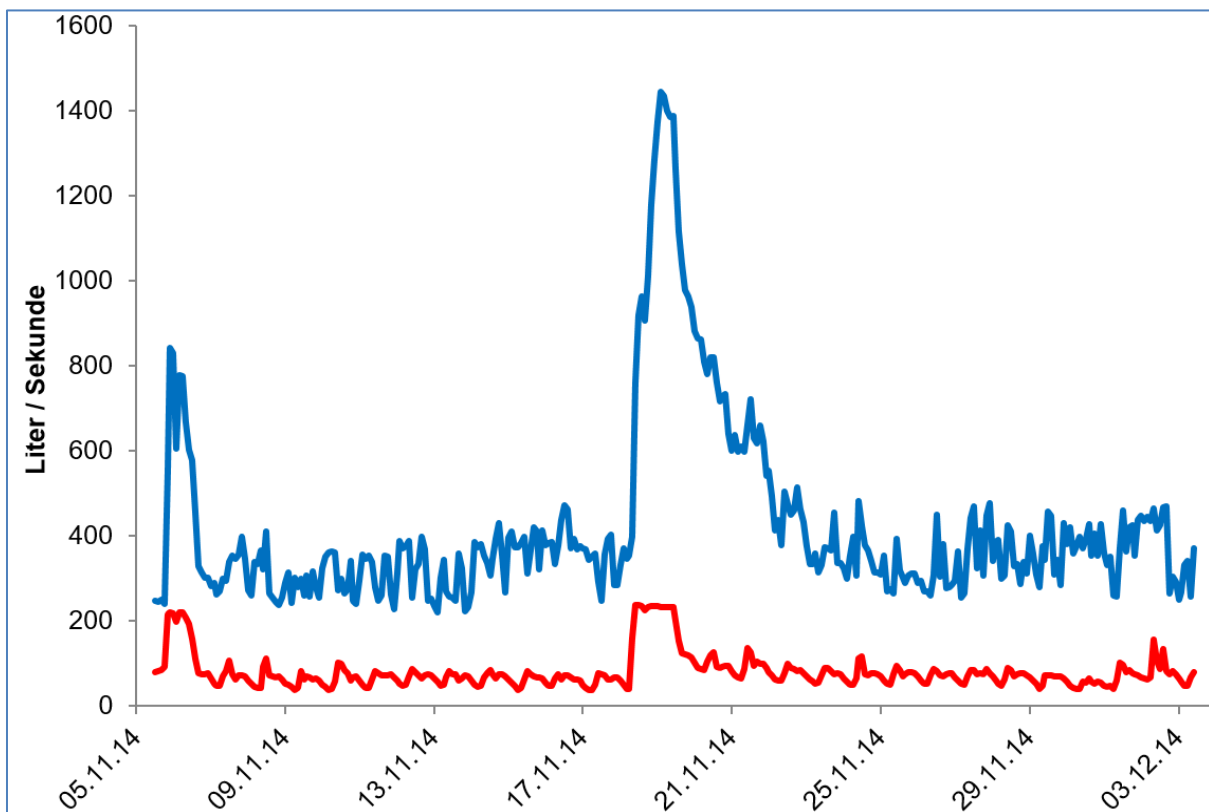


Abb. 2: Abflüsse der Kläranlage (rot) sowie des Fließgewässers unterhalb der Kläranlage (blau) im Verlauf eines Monats (11–12/2014)

2.1.1 Versuchsaufbau und Probennahme

Alle Versuchsmuscheln wurden derselben Charge entnommen, um bei einer eventuellen Vorbelastung mit Mikroplastik ein möglichst gleiches Niveau in allen Muscheln voraussetzen zu können. Vor Versuchsbeginn wurden die Muscheln in vier Gruppen eingeteilt. Diese wurden wie folgt exponiert:

- Gruppe A: in der Schwäbischen Rezat oberhalb der Kläranlageneinleitung
- Gruppe B: direkt im gereinigten Abwasser am Kläranlagenablauf auf dem Gelände der Kläranlage Weißenburg
- Gruppe C: in der Schwäbischen Rezat unterhalb der Kläranlageneinleitung
- Gruppe D: Kontrolltiere in einem mit Bachwasser gespeisten, institutseigenen Teich am LfU, Dienststelle Wielenbach.



Abb. 3: Expositionsstellen (A–C) an der Kläranlage Weißenburg und der Schwäbischen Rezat mit Lage der Abwassereinleitung (e).
 A) oberhalb der Einleitung in die Schwäbischen Rezat, B) an der Kläranlage im gereinigten Abwasser,
 C) unterhalb der Einleitung Kläranlage in der Schwäbischen Rezat.

Für die Exposition an den Standorten A und C wurden Schwimmvorrichtungen (Länge: 610 mm, Breite: 410 mm, Höhe: 365 mm; Abb. 4) mit darin eingesetzten Muschelkäfigen verwendet, die direkt in der Schwäbischen Rezat installiert wurden. Für den nötigen Auftrieb sorgten luftgefüllte Schwimmer (Material: blaues PE-LD). Abgesehen von diesen bestanden alle Teile der Schwimmvorrichtungen und Muschelkäfige aus Edelstahl. Die Eintauchtiefe der Käfige konnte durch die Schwimmvorrichtung bestimmt und eingestellt werden. Zur Vermeidung des Trockenfallens der Muscheln wurden sie in natürlichen Vertiefungen der Gewässersohle positioniert. Die Seiten der Muschelkäfige bestanden aus grobem Lochblech (Lochdurchmesser: 20 mm), die eingesetzten Bodenwannen (Länge: 590 mm, Breite: 390 mm, Höhe: 100 mm) wurden aus ungelochtem Blech gefertigt und mit Quarzsand als Sediment gefüllt. Auf die Käfige wurden Hauben aus Lochblech (Lochdurchmesser: 5 mm) gesetzt, um die Strömung im Käfig und den damit einhergehenden Austrag von Substrat zu verringern. Auch die Kontrollmuscheln (D) waren während der gesamten Versuchsdauer in Muschelkäfigen untergebracht. Die Schwimmvorrichtung befand sich allerdings in einem institutseigenen Teich am LfU, Dienststelle Wiesenbach. An allen Standorten wurde ein Datenlogger (EBI 85 A, Ebro) befestigt, der die Wassertemperatur aufzeichnete.

Die Exposition auf dem Gelände der Kläranlage (Gruppe B) erfolgte via Bypass in einer Langstromrinne (glasfaserverstärkter Kunststoff, Länge: 3,00 m, Breite: 0,60 m, Höhe: 0,52 m, Abb. 4), in die ebenfalls Muschelkäfige aus Lochblech mit Quarzsand eingesetzt wurden. Durch die Rinne wurde gereinigtes Abwasser aus dem Kläranlagenablauf gepumpt (67 l/min, Unilift AP12, Grundfos). Die Rinne war mit einem Deckel verschlossen, um vor starker Sonneneinstrahlung und Verunreinigung über die Umgebungsluft zu schützen (Abb. 4). Eine ausreichende Sauerstoffversorgung wurde durch Belüfter (Hiblow HP 100, Takatsuki) sichergestellt. Um eine Vergleichbarkeit mit den Bedingungen zu erreichen unter denen die Kontrolltiere exponiert wurden und eine Beeinträchtigung der Muscheln oder gegebenenfalls auftretende Mortalitäten zu erfassen, wurden verschiedene chemisch-physikalische Wasserparameter aufgezeichnet. Zur Bestimmung von Sauerstoffkonzentration, pH-Wert, Wassertemperatur und Trübung dienten Sonden (IQ Sensor Net System 2020, WTW), die im Ablaufbereich der Langstromrinnen angebracht waren. Die Parameter Ammonium, Nitrat und Nitrit wurden photometrisch gemessen.

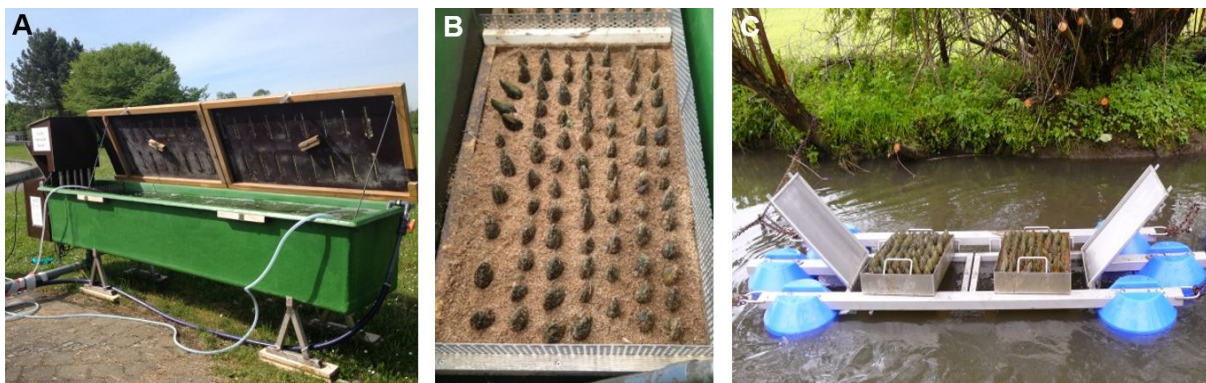


Abb. 4: A) Muscheln in Langstromrinnen mit B) Sedimentkästen zur Bypass-Exposition in gereinigtem Abwasser der Kläranlage Weißenburg und C) in direkt in der Schwäbischen Rezat installierten Schwimmkäfigen.

Der Besatz mit Muscheln erfolgte am 28.04.2015. In die Schale jeder Muschel wurde zur individuellen Wiedererkennung eine Markierung graviert (vergleichbar mit Abb. 21). Die Expositionseinrichtungen wurden wöchentlich kontrolliert, um deren Zustand sowie den der Muscheln zu überprüfen.

2.1.2 Mikroplastik-Analyse mittels Raman-Mikrospektroskopie

Unter Raman-Spektroskopie versteht man die spektroskopische Untersuchung der inelastischen Streuung elektromagnetischer Strahlung an Stoffen. Diese so genannte Raman-Streuung kann genutzt werden, um Materialeigenschaften zu untersuchen und um Materialien anhand ihrer „Fingerabdruck“-Spektren sicher zu identifizieren (ausführlich in McCreery, 2002; Schrader, 2008; Vandenabeele, 2013). Kombiniert mit einem Lichtmikroskop (Raman-Mikrospektroskopie) kann Mikroplastik eindeutig nachgewiesen und die Polymersorte sowie die Form und Größe der gefundenen Partikel bestimmt werden (Anger et al., 2018).

Diese Methode hat einige Vorteile. Es können Partikel bis minimal circa 1 µm untersucht werden. Hinzu kommt, dass nur eine relativ geringe Probenvorbereitung notwendig ist. Allerdings sind die Messzeiten sehr hoch, da einzelne Partikel vor der Analyse optisch mit dem Mikroskop identifiziert und Messpunkte festgelegt werden müssen. Ein weiterer Nachteil ist, dass das Raman-Signal durch Fluoreszenz überlagert werden kann, welche unter anderem von organischen Verbindungen ausgeht (Ivleva & Nießner, 2015). Durch die Optimierung verschiedener Parameter, wie beispielsweise Photo-bleichen, Laserwellenlänge und -leistung, Messzeit oder Anpassung des Aufschlusses kann dieser Nachteil jedoch umgangen werden (Imhof et al., 2012).

Um dies zu erreichen, wurde am LfU ein chemisches Aufschlussverfahren entwickelt (in Anlehnung an Claessens et al., 2013; Roch & Brinker, 2017; van Cauwenberghe, Claessens et al., 2015; van Cauwenberghe & Janssen, 2014), welches eine nahezu vollständige Entfernung störender organischer Verbindungen und zugleich den Erhalt der meisten Polymere gewährleistet (Rager, 2015). Von den in einem Vorversuch getesteten Polymeren PS, PE, PP, PVC, PET, PA und PUR wurden nur PA und PUR durch den Verdau zersetzt, sodass sie bei anschließenden Messungen nicht mehr wiedergefunden werden konnten. PS-Partikel hatten in mikroskopischer Ansicht nach dem Versuch eine veränderte Form, waren aber vorhanden und messbar. Alle anderen Polymere wurden vom Säureverdau nicht sichtbar angegriffen und die anschließenden Messungen nicht beeinträchtigt (Wiesheu, 2017).

Für den spektroskopischen Nachweis von Mikroplastik wurden zwei Malermuscheln je Standort (A–D) nach einem und nach sechs Monaten entnommen und einzeln in Aluminiumtüten verpackt. Um sie un-mittelbar zu töten und zu konservieren, wurden sie vor Ort bei –80 °C tiefgefroren. Im Labor wurden die Muscheln soweit angetaut, dass ein Aufhebeln der Schale und die Entnahme des Weichkörpers möglich waren. Der anschließende chemische Aufschluss der einzelnen Weichkörper erfolgte in Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler und Anschluss an Waschflaschen (Abb. 5). Dazu wurden die Weichkörper zuerst über Nacht bei Raumtemperatur in Salpetersäure (65 % HNO₃) vorbehandelt und anschließend über Gewebeheizern für zwei Stunden auf 100 °C temperiert.



Abb. 5:
Aufbau für den Säureaufschluss:
a) 3-fach Gewebeheizer,
b) Rundkolben,
c) Rückflusskühler,
d) Übergangsstück,
e) Gasabführung,
f) Waschflasche mit Natronlauge,
g) Waschflasche mit Wasser,
h) Kühlwasserzulauf,
i) Kühlwasserablauf

Nach Verdünnung (1/10 v/v) der HNO₃ mit 80 °C warmem, destilliertem Wasser wurde die erhaltene Lösung mittels Vakuumpumpe über einen Polycarbonat-Filter (0,4 µm Porengröße, effektive Filterfläche 12 cm², Merck KGaA, Abb. 6) filtriert. Durch Spülung mit Isopropanol wurden vorhandene Rückstände, wie Palmitinsäuren, welche störende Signale in den Raman-Spektren hervorrufen können, von der Filteroberfläche entfernt (Abb. 7). Bis zur Raman-Analyse wurden die Filter in Glaspetrischalen in einem mit Silikagel gefüllten Exsikkator getrocknet.

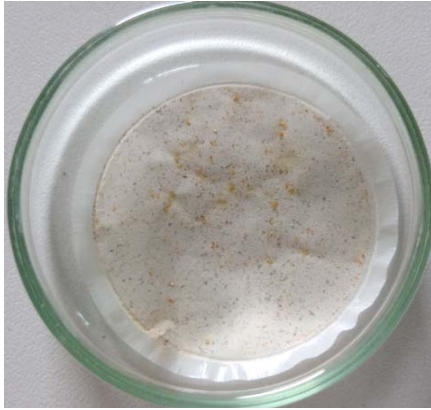


Abb. 6:
Probenfilter in
Transport-Pet-
rischale vor
Behandlung
mit Isopropanol



Abb. 7:
Probenfilter in
Transport-Pet-
rischale nach
Behandlung mit
Isopropanol

Um auch während dieser Prozeduren eine Kontamination mit Kunststoffen zu vermeiden, wurden verschiedene Maßnahmen durchgeführt. Es wurden nach Möglichkeit Alternativmaterialien statt Kunststoffen verwendet. Außerdem wurden alle verwendeten Chemikalien und Flüssigkeiten durch Polycarbonat-Filter (0,4 µm Porengröße) filtriert und anschließend in mit Glasschliffstopfen verschlossenen Glasflaschen oder Metallbehältern gelagert. War dies nicht möglich, wurden Kunststoffsorten verwendet, die entweder kaum in der Umwelt vorkommen, oder mit den genutzten Messmethoden nicht erfasst werden können (zum Beispiel Polytetrafluorethylen, PTFE). Auch wurden alle Behälter und Gerätschaften gründlich mit filtriertem Wasser und Ethanol gespült und Laborkleidung aus Baumwolle in kräftiger blauer Farbe getragen. Diese Maßnahme sollte sicherstellen, dass eingebrachte Baumwollfasern durch die Salpetersäure entweder zersetzt werden, oder deren spätere Identifikation erleichtert wird. Wenn möglich, wurde darüber hinaus an einer Sicherheitswerkbank gearbeitet, die ein partikelfreies Arbeiten ermöglichte. In der Zeit, in der Proben nicht bearbeitet wurden, waren sie stets mit Aluminium-Folie oder Glasdeckeln abgedeckt. Zusätzlich wurden parallel zur Probenaufbereitung Blindproben mitgeführt. Beim Öffnen und Zerkleinern einer Muschel und nach dem Aufschluss während der Filtration befanden sich angefeuchtete Filter offen unter dem gleichen Abzug, unter dem die Probenaufbereitung durchgeführt wurde. Diese Filter dienten dazu, eine mögliche Mikroplastikkontamination der Luft aufzuzeigen und die Anzahl der in den Muscheln gefundenen Mikroplastikpartikel entsprechend zu korrigieren. Bei einer zweiten Art der Blindprobe wurden alle Schritte des Aufschlusses mit dem Unterschied durchgeführt, dass anstatt des Muschelgewebes 40 ml Reinstwasser (Typ 1, Milli-Q Filteranlage, Merck) eingesetzt wurden. Mit diesen Blindproben wurde eine mögliche Kontamination durch Chemikalien und Laborgeräte und -utensilien untersucht. Auch das Reinstwasser selbst wurde vorher ebenfalls auf Mikroplastikkontamination untersucht.

Die Raman-Mikrospektroskopie erfolgte durch Dr. N. P. Ivleva und Dr. A. C. Wiesheu am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (IWC, Vorstand Prof. R. Nießner) der Technischen Universität München. Es wurde ein LabRAM HR (Horiba Jobin Yvon GmbH; Objektive: 10x mit NA = 0,25; 50x mit NA_{LWD} = 0,50; 75x mit NA = 0.75, Olympus; Abb. 8) für die Analyse verwendet. Die Probe wurde mit einem Helium-Neon Laser (632,8 nm, 40 mW, circa 12 mW an der Probe) oder einem Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Laser unter Frequenzverdopplung (532,2 nm, 150 mW, circa 16 mW an der Probe) angeregt. Die Laserintensität wurde durch einen optischen Dichtefilter auf 25 % beziehungsweise 10 % der Ausgangsleistung reduziert. Zum Einsatz kamen ein Gitter mit 600 Linien/mm und eine Lochblendenöffnung von 100 µm. Das System wurde auf die nullte Ordnung des

Gitters und anschließend auf das Signal bei $520,7 \text{ cm}^{-1}$ eines Silizium-Wafers kalibriert. Gemessen wurde auf der spektralen Breite zwischen $50\text{--}3.750 \text{ cm}^{-1}$. Zur Identifikation der Spektren wurde die Referenzdatenbank SpecID (Thermo Fisher Scientific) genutzt.

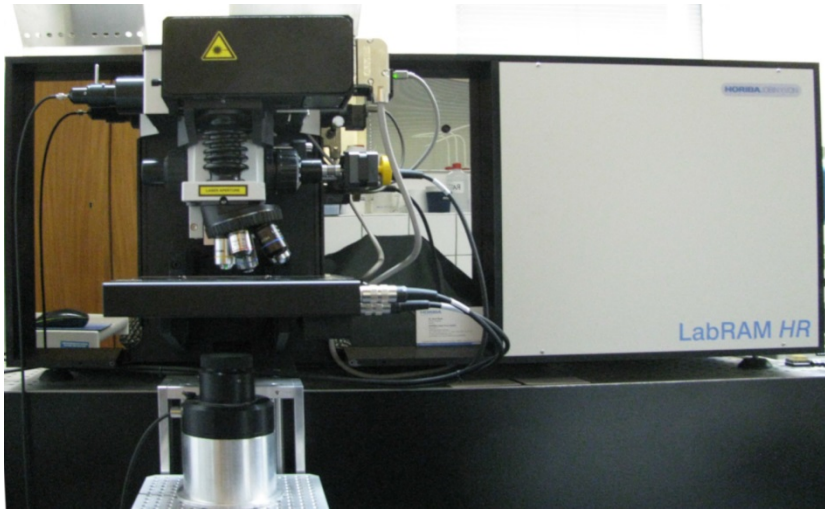


Abb. 8:
Raman-Mikroskop LabRAM HR

Um eine eindeutige Identifizierung und Wiederfindung der Mikroplastikpartikel zu gewährleisten, wurden die Filter auf mit Markierungen versehenen Glasträgern befestigt. Vor jeder Messung wurde der Tisch des Mikroskops auf diese Markierungen kalibriert. Für die Messung der räumlichen Ausdehnung der Partikel wurde die Software Labspec 6 (Horiba Jobin Yvon GmbH) eingesetzt. Aufgrund der langen Messzeiten wurden repräsentative Messschemata für die Auswertung der Filter entwickelt. Diese orientierten sich an den Partikelgrößen, die mit den genutzten Objektiven erkenn- und messbar waren:

- Für Partikel mit einer maximalen Ausdehnung kleiner $50 \mu\text{m}$ wurde eine Messschablone mit fünf Überbereichen (zusammen $21,06 \text{ mm}^2 \cong 1,8 \%$ der effektiven Filterfläche; Abb. 9) entworfen. Diese verteilten sich auf konzentrischen, äquidistant voneinander entfernten Kreisen über die Filterfläche, wodurch eine repräsentative Wiedergabe der Partikelverteilung auf dem Filter gewährleistet werden sollte. Die Überbereiche setzten sich aus je sechs Unterbereichen zusammen, in welchen die eigentliche optische Identifikation von Partikeln, sowie deren Raman-mikrospektroskopische Analyse durchgeführt wurden.
- Die Analyse von Partikeln größer $50 \mu\text{m}$ erfolgte in einem 45° -Sektor des Filters ($\cong 12,5 \%$ der effektiven Filterfläche, Abb. 10).

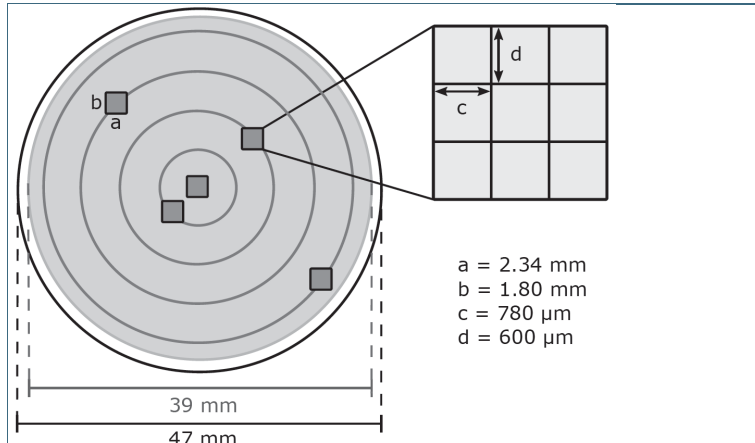


Abb. 9: Messschema für Partikel < 50 µm. Fünf Überbereiche (dunkelgrau), zusammengesetzt aus sechs Unterbereichen (hellgrau), ergeben zusammen 1,8 % der effektiven Filterfläche (= Fläche, die Filtrat ausgesetzt war, mittelgrau). Der Filterrand (weiß) wird gerätebedingt nicht von Filtrat durchdrungen und nicht in Berechnungen mit einbezogen.

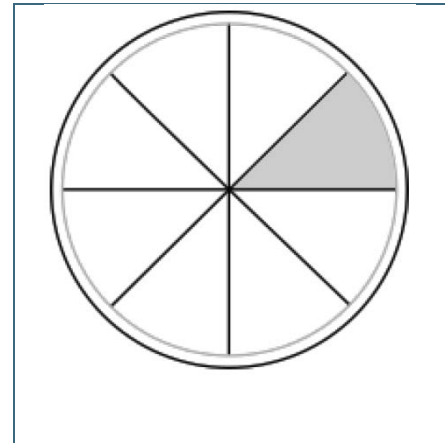


Abb. 10: Messschema für Partikel > 50 µm. Der Sektor von 45° ergibt 12,5 % der effektiven Filterfläche.

Zu den Zeitpunkten der Probenahmen (nach ein- beziehungsweise sechsmonatiger Exposition) wurden jeweils zwei Muscheln pro Standort (A–D) entnommen. Die beiden Muscheln von den Standorten B (Kläranlage) und D (Kontrolle) wurden jeweils nach dem Aufschluss auf einem Filter gepoolt (Abb. 11). Auf diesen Filtern wurde die doppelte effektive Fläche (3,6 % beziehungsweise 25 %) analysiert. Die an den Standorten A und C oberhalb und unterhalb der Kläranlageneinleitung in die Schwäbische Rezat exponierten Muscheln wurden nach dem Verdau jeweils einzeln auf Filter aufgebracht, da in einem Vorversuch festgestellt wurde, dass diese Muscheln eine hohe partikuläre Belastung durch Sediment aufwiesen. Diese Partikel können sich auf dem Filter überlagern, sodass eine zuverlässige Analyse nicht möglich ist. Bei Aufbringung von nur einer Muschel pro Filter war die Belastung mit Tonmineralen zwar immer noch hoch, eine Analyse war aber möglich.



Abb. 11: Filter der einzelnen Probestellen. Von links nach rechts: A, B, C, D. Auf die Filter A und C wurde je eine chemisch verdaute Muschel aufgebracht, auf die Filter B und D jeweils zwei Muscheln.

2.2 Exposition in PVC-Mikropartikeln unter Laborbedingungen

In ihrer natürlichen Umgebung und bei einer experimentellen Exposition im Freiland sind Organismen einer Vielzahl von biologischen, physikalischen und chemischen Faktoren ausgesetzt, die Einfluss auf sie haben können. Unter standardisierten Bedingungen im Labor können diese Faktoren kontrolliert und standardisiert werden, sodass der Einfluss eines ausgewählten Faktors untersucht und ein eindeutiger Zusammenhang von möglichen Veränderungen mit diesem hergestellt werden kann.

In vorliegendem Versuch wurde der Einfluss von PVC-Mikropartikeln auf Große Flussmuscheln (*U. tumidus*) untersucht. PVC wurde eingesetzt, weil es einer der am häufigsten produzierten Kunststoffe weltweit ist (Fischer et al., 2000; PlasticsEurope, 2019). Abgesehen von dieser hohen Abundanz führen die Anwendungsbereiche von PVC dazu, dass es relativ häufig in die Umwelt gelangt. Im Bauwesen wird es unter anderem bei der Herstellung von Abwasserrohren, Fensterrahmenprofilen, Bodenbelägen sowie Kabelummantelungen und -isolierungen verarbeitet. Außerdem findet PVC häufig Verwendung im Garten- und Agrarbereich, wie beispielsweise in Schläuchen, Dachplatten, Isolier-, Teich- und Abdeckfolien oder Gartenmöbeln und -geräten. Von der Verpackungsindustrie werden verschiedene Behältnisse wie Flaschen, Blister aber auch Folien zum Verschweißen von Einmalprodukten aus PVC hergestellt. Auch Alltagsgegenstände wie Kreditkarten, Handyhüllen, Gummistiefel und PVC-Folien werden daraus gefertigt, welche wiederum zu Regenbekleidung, Planschbecken, Luftmatratzen und anderen aufblasbaren Objekten verarbeitet werden. Solche Gegenstände können, genau wie Verpackungen, durch „Littering“ in die Umwelt gelangen (PlasticsEurope, 2019). Die Vielzahl von Anwendungsbereichen wird durch die Zugabe von Additiven (UV- und Thermostabilisatoren, Säurefänger, Weichmacher, Schlagzähmodifizier, Füll-, Farb- und Verstärkungsstoffe, Flammschutzmittel, Antistatika, chemische Treibmittel, Fungizide) erreicht, welche unter anderem die Witterungs-, Kälte- und Hitzebeständigkeit und Bruchfestigkeit von PVC verbessern (Schiller, 2015). Ohne Zugabe solcher Additive ist PVC farblos, kaum stabil gegenüber Hitze und Licht und somit einer der instabilsten kommerziell erhältlichen Polymerkunststoffe. Allerdings sind die meisten Additive im Kunststoff nicht chemisch gebunden, was dazu führt, dass sie wieder entweichen und eine Vielzahl von negativen Wirkungen in der Umwelt entfalten können, was PVC zu einem der für Wasserorganismen gefährlichsten Kunststoffe macht (Capolupo et al., 2020).

Ziel der vorliegenden Studie war eine Untersuchung von Aufnahme und gegebenenfalls Depuration von PVC-Mikropartikeln durch Große Flussmuscheln. Außerdem sollte eruiert werden, ob PVC-Mikropartikel schädliche Auswirkungen auf Muscheln haben.

2.2.1 Versuchsaufbau und Probennahme

Der Versuch fand vom 11.06.2015 bis 06.08.2015 in der ökotoxikologischen Versuchsanlage des LfU, Dienststelle Wielenbach, statt. Diese Anlage ist so konstruiert, dass eine Kontamination der Versuchstiere mit PVC über die Wasserphase nahezu ausgeschlossen werden kann. Sämtliche Regelungseinrichtungen, Pumpen und Aufbereitungsanlagen und die meisten Rohrleitungen sind aus PVC-freien Materialien hergestellt.

Die Exposition der Muscheln erfolgte im Durchfluss (Durchflussrate 100 l/h) in 560 Liter fassenden Aquarien, die zu je einem Teil mit durch Umkehrosmose gefiltertem Reinstwasser (Typ 1, Milli-Q Filteranlage, Merck) sowie mit Quellwasser gespeist wurden (1/1 v/v). Letzteres wurde vor Eintritt in die Versuchsanlage (Abb. 12, Abb. 13) über eine Lochblech-Kaskade geleitet, um Kohlendioxid auszutreiben und gleichzeitig Sauerstoff anzureichern. Während des gesamten Versuchs erfolgte eine kontinuierliche Überprüfung und Regelung der chemisch-physikalischen Parameter (Wasserparameter Temperatur, Sauerstoff, Leitfähigkeit sowie pH-Wert mittels IQ Sensor Net System 2020, WTW; Tab. 2). Eine über den Aquarien angebrachte Lichtanlage simulierte einen 12-Stunden-Tag mit einer je 30-minütigen Dämmerungsphase morgens und abends.

Messgröße	Messwert
Temperatur	12–13 °C
Sauerstoffkonzentration	9,8 mg/l
Elektrische Leitfähigkeit	188 µS/cm
pH-Wert	7,0–7,1

Tab. 2:
Chemisch-physikalische Eigenschaften des in den Aquarien genutzten Wassers. Gemessen vor dem Zulauf in die Aquarien.

Die genutzten Mikroplastikpartikel bestanden aus PVC, das keine Weichmacher enthielt (sogenanntes uPVC, unplasticized Polyvinylchloride, Goodfellow GmbH). Mittels zunächst hergestellter PVC-Stamm suspensionen wurden die PVC-Mikropartikel in vier Konzentrationen (50 ng/l, 500 ng/l, 5 µg/l, 50 µg/l) gleichmäßig über einen Zeitraum von 28 Tagen über eine Präzisionspumpe den Aquarien zugegeben. Zur gleichmäßigen Verteilung der Partikel in den Suspensionen wurden PTFE-beschichtete Magnetrührer eingesetzt. Zusätzlich zu diesen vier Ansätzen enthielt der Versuch eine Kontrollgruppe, bei der in gleicher Weise aufbereitetes Wasser wie bei den Stammsuspensionen ohne PVC-Mikropartikel zugegeben wurde.

Jeder Ansatz (inklusive Kontrolle) wurde in drei Replikaten durchgeführt, sodass 15 Aquarien im Versuch verwendet wurden (Abb. 13, Abb. 14). In diese wurden zwei mit Muscheln bestückte, Quarzsand-befüllte Edelstahlkäfige eingesetzt (wie in 2.1.1). Die Muscheln jedes Aquariums wurden drei Mal täglich mit 0,5 g Algenfutter (Muschel-VITAL, Aqua-Tropica) gefüttert, das in 120 ml Wasser gelöst zugegeben wurde. Sowohl nach ein- als auch nach vierwöchiger Exposition wurden aus jedem Aquarium Muscheln für die unterschiedlichen Fragestellungen entnommen. Im Anschluss an die Expositionsphase wurden die verbleibenden Muscheln für weitere 28 Tage in gereinigten Aquarien mit PVC-freiem Wasser gehalten, um eine mögliche Abgabe der Partikel zu ermitteln (Depurationsphase).



1.Förderpumpe → Quellwasser	3a+b: Heizungskomponenten	8.Förderpumpe → Testwasser
2.Entwärtungsanlage mit Komponenten: a+b: Austauscherbehälter mit Ionenaustauscherharz c: Steuerung d: Salzvorratsbehälter	4.Umkehrosmose 5.Durchflußregelung Quellwasser 6.Testwasservorratsbehälter 2000L 7a+b.Rührwerk mit Steuerung	9.Überwachungsmesssonden Testwasser

Abb. 12:
Zur ökotoxikologischen Versuchsanlage gehöriger Technikraum in dem die Wasserparameter überwacht und enthärtetes Quell- und Reinstwasser definiert gemischt werden



Abb. 13:
Aquarien in der
ökotoxikologi-
schen Versuchs-
anlage

1. Kompressor für Belüftung
2. Edelstahlzulauf aus dem Gesamtsystem
3. Magnetinduktive Durchflussmessung
4. Rührsystem
5. (a)PVC-Stammlösung mit (b) Magnetrührer
6. Dosierpumpe (Kreiseltauemelkolbenpumpe)
7. Mischbehälter aus Edelstahl
8. Zulauf Testwasser
9. Absaugung
10. Aquarienabdeckung aus Aluminium mit integrierter Beleuchtung
11. Edelstahlhabitat mit Quarzsand
12. Luftausströmer aus Keramik
13. Digital-optische Messsonde zur Sauerstoff- und Temperaturüberwachung
14. Testwasserablauf
15. Glasaquarium



Abb. 14:
Aquarium mit technischem
Aufbau und Edelstahleinsatz
mit Großen Flussmuscheln
(*Unio tumidus*) zur Expositi-
on mit PVC-Mikropartikeln

Da in der Umwelt Plastikpartikel in verschiedensten Formen und Größen vorkommen, welche unterschiedliche Auswirkungen auf Organismen haben können (Chen et al., 2020; Choi et al., 2019), wurden PVC-Mikropartikel verschiedener Größe und Form im Laborversuch eingesetzt. Dies wurden durch Vermahlung des Ausgangsmaterials mittels unterschiedlicher Methoden erreicht. Ein Teil des Pulvers wurde per Ultrazentrifugalmühle (ZM 200, Retsch GmbH) zerkleinert, indem es mit Trockeneis vermisch und drei Minuten bei 18.000 Umdrehungen/min mit einem 12-Zahnrotor und einem 0,12 mm

Distanzsieb vermahlen wurde. Dabei wurde ein Zyklon für zusätzliche Kühlung und einen besseren Probenaustrag angeschlossen. Circa 65 % des PVCs wurden so zu Partikeln zerkleinert, die eine Größe von kleiner 100 µm und eine runde Form hatten (Abb. 15).

Ein weiterer Teil des Ausgangspulvers wurde unter kontinuierlicher Versprödung bei –196 °C vermahlen (CryoMill, Retsch GmbH). Dazu wurde die Probe in einen 50 ml Mahlbecher (rostfreier Stahl) mit einer Mahlkugel (25 mm Durchmesser, rostfreier Stahl) 20 Minuten lang (5 min Pre-Cooling, dann 10 Zyklen für je 2 min bei 30 Hz, dann 30 sek bei 5 Hz) vermahlen. Die Partikel wurden anschließend mittels Laserbeugung (Retsch GmbH) vermessen. Sie hatten eine durchschnittliche eine Größe von 17 µm und eine spröde Oberfläche mit Spitzen und Kanten (Abb. 16).

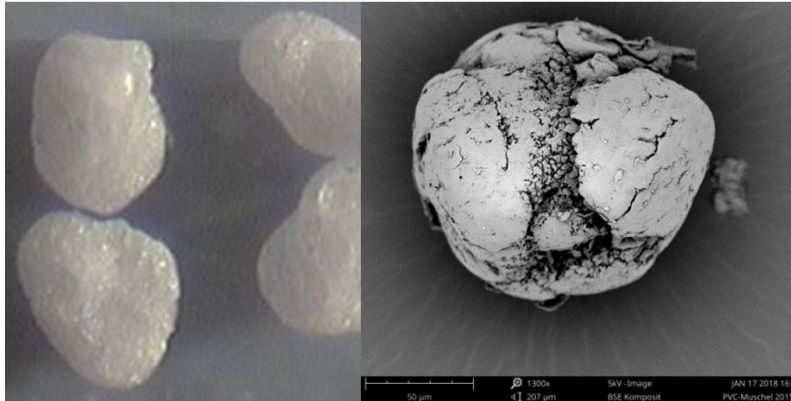


Abb. 15:
Lichtmikroskopische (links) und rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme (rechts) von PVC-Mikropartikeln nach der Vermahlung mit der Ultrazentrifugalmühle.

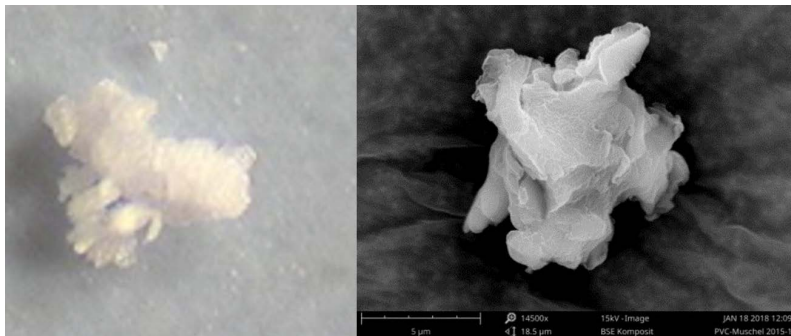


Abb. 16:
Lichtmikroskopische (links) und rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme (rechts) von PVC-Mikropartikeln nach Cryo-Vermahlung.

Die beiden PVC-Pulver wurden anschließend gewichtsanteilig im Verhältnis 1/1 (w/w) vermengt. Um die genauen Größenverteilungen und Konzentrationen der im Versuch letztendlich verwendeten PVC-Mikropartikel zu ermitteln, wurden Proben der vier verschiedenen Ansätze mittels Single Particle Optical Sizing vermessen (SPOS durchgeführt von BS-Partikel GmbH, mit Partikelzähler Syringe, Markus Klotz GmbH). Dabei fließt die Probe durch einen schmalen Bereich, der mit einem Laser gleichmäßig ausgeleuchtet wird. Partikel, die sich durch diesen Bereich bewegen blockieren einen Teil des Laserlichts. Die entstehende Intensitätsreduktion wird quantitativ von einem Detektor gemessen und die Größe beziehungsweise die zweidimensionale Fläche eines Partikels durch Vergleich mit einer Kalibrierkurve berechnet. Da dieses Verfahren nicht zwischen PVC und sonstigen im Wasser vorkommenden Partikeln unterscheiden kann, wurde auch die Partikelanzahl in der Kontrolle gemessen und von den PVC-Ansätzen subtrahiert (Abb. 17, Abb. 18).

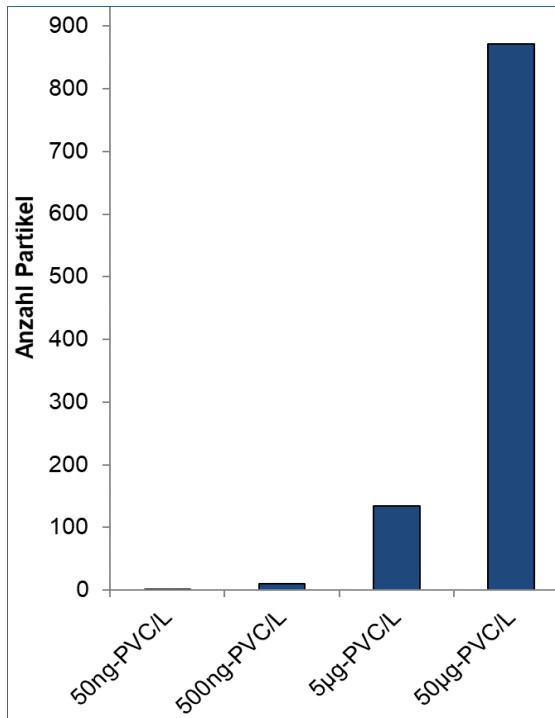


Abb. 17: Mikropartikelanzahl, die in den Ansätzen je Liter Aquarienwasser gemessen wurde (abzüglich der Partikelzahl der Kontrolle). Mittelwert über zwei Messungen.

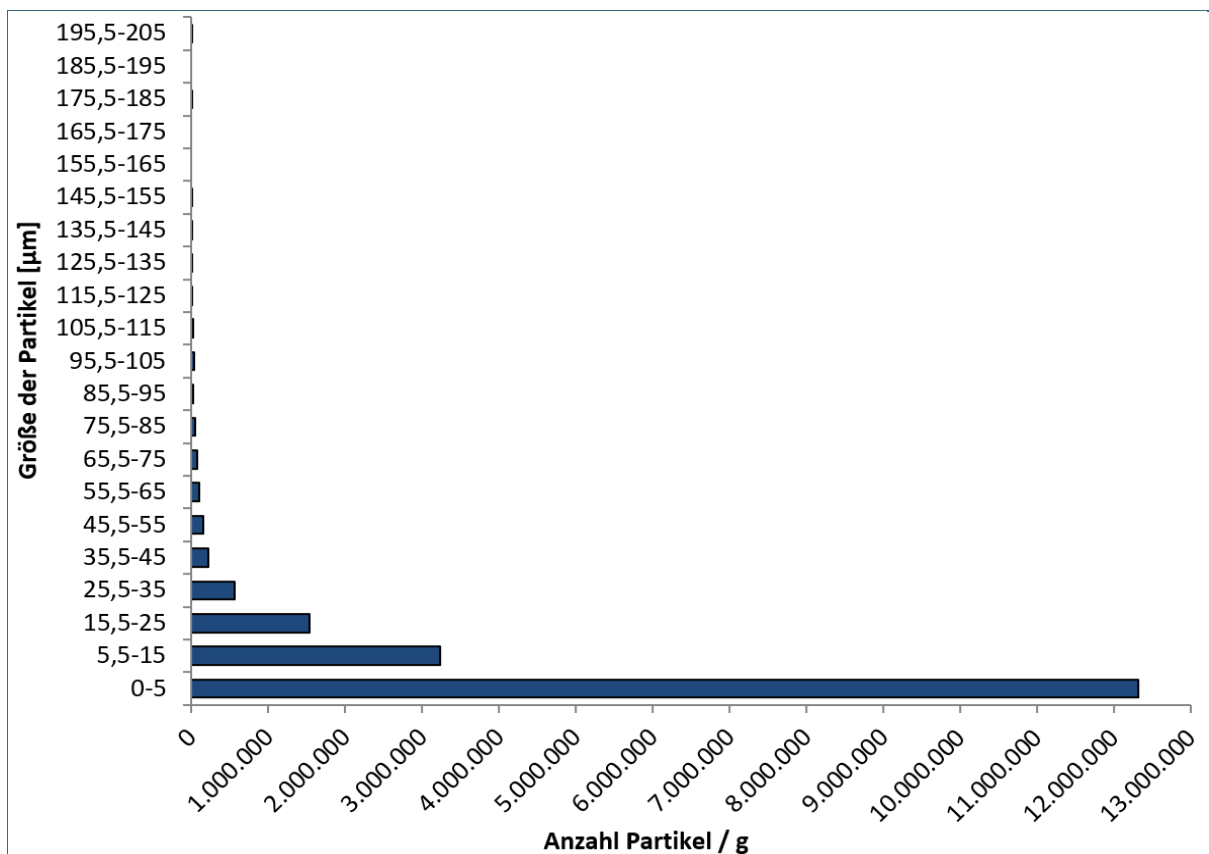


Abb. 18: Größenverteilung und Anzahl der Partikel pro Gramm der im Versuch eingesetzten PVC-Mikropartikel

2.2.2 PVC-Nachweis mittels Raman-Mikrospektroskopie

Der Nachweis von PVC-Mikropartikeln erfolgte wiederum mittels Raman-Mikrospektroskopie. Es wurden drei Muscheln, die über 28 Tage der höchsten PVC-Konzentration (50 µg/l) ausgesetzt waren, sowie drei Individuen, die im Anschluss an die Exposition für 28 Tage in PVC-freiem Quellwasser gehalten wurden, untersucht. Die Muscheln wurden analog zum Freilandversuch verdaut und anschließend einzeln auf einen Filter aufgebracht (siehe 2.1.2). Dabei wurden wieder die entsprechenden Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen durchgeführt.

Aufgrund dessen, dass die PVC-Mikropartikel größer 50 µm nicht perfekt an den Filtern hafteten, erfolgte neben der Messung auf den Filtern eine weitere Messung in der Petrischale, die zum Transport des jeweiligen Filters verwendet wurde. Wie bei der Messung auf den Filtern, wurde auch hierbei ein Sektor von 45° analysiert, allerdings am Boden der Petrischalen. Auch bei der weiteren Vorbereitung und der Messung selbst wurde analog zur Freilandstudie vorgegangen. Da in diesem Versuch ausschließlich ein Nachweis von PVC relevant war, für das eine Doppelbande im Spektrum bei circa 650 cm⁻¹/ 700 cm⁻¹ charakteristisch ist, wurde nur zwischen 50–2.200 cm⁻¹ spektraler Breite gemessen.

2.2.3 Auswirkungen von PVC-Mikropartikeln auf die Muschelgesundheit

2.2.3.1 Pathologische Anatomie und Histopathologie

Zur Erfassung krankhafter Veränderungen von Organen und Geweben wurden histopathologische Untersuchungen durchgeführt. Es wurden je 12 Muscheln (vier pro Replik) pro Konzentration nach sieben und nach 28 Tagen Mikroplastik-Exposition sowie nach der 28-tägigen Depurations-Phase entnommen. Zunächst wurden die biometrischen Daten aller Muscheln erhoben (Länge, Breite, Höhe, Gewichte der fixierten Weichkörper und der Schale). Nach Öffnung der Muscheln mit Holzkeilen (Abb. 19) erfolgte eine Beurteilung von Mantel, Kiemen und Fuß der Muscheln auf makroskopische Veränderungen sowie hinsichtlich eines möglichen Parasitenbefalls. Anschließend wurden die Muscheln inklusive der Keile in 4 % Formalin für mindestens 144 Stunden fixiert (McElwain & Bullard, 2014). Danach wurden die Weichkörper (Abb. 20) aus den Schalen (Abb. 21) entnommen.



Abb. 19: Aufgekeilte Große Flussmuschel (*Unio tumidus*)



Abb. 20: Weichkörper einer Großen Flussmuschel (*U. tumidus*)



Abb. 21: Schale einer Großen Flussmuschel (*U. tumidus*)

Nach Abtrennung der vier Kiemenblätter sowie des Mantels wurde der Weichkörper histotechnisch aufbereitet. Hierzu wurde je eine Hälfte der Muschelweichkörper horizontal und vertikal in 3 bis 4 mm dicke Scheiben zerteilt. Alle Proben wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 2 x 96 %, 2 x 99 %, 2 x Xylol bei 60 °C mittels Tissue-Tek VIP 6 Al Vakuuminfiltrations-Prozessor, Sakura) und in Paraffin eingebettet (EG1150, Leica). Mit Hilfe eines Mikrotoms (RM2265, Leica) wurden histologische Präparate mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt. Nach Streckung im Wasserbad wurden die Schnitte auf Objektträger überführt, getrocknet (37 °C für 24 h), entparaffiniert (2 x Xylol, 100 % Ethanol, 96 %, 80 %, 70 %, 60 %, Reinstwasser), mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und unter Deckgläsern versiegelt (Eukitt, Merck). Dabei wurden wieder Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen durchgeführt.

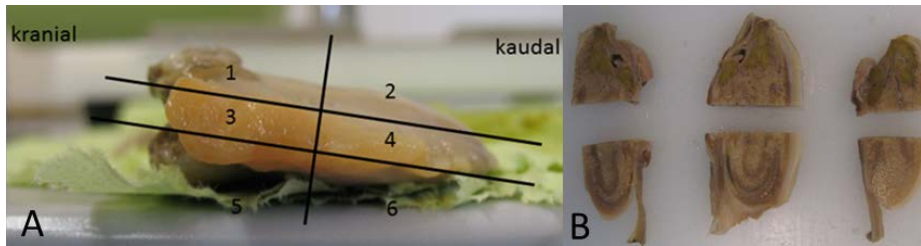


Abb. 22: A) Horizontalschnittebenen, B) Ergebnis der horizontalen Schnitttechnik

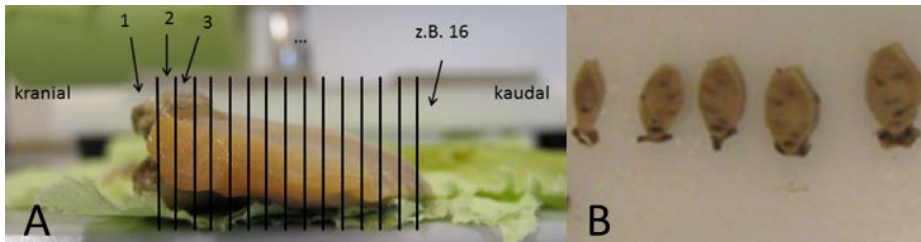


Abb. 23: A) Vertikalschnittebenen; B) Ergebnis der vertikalen Schnitttechnik

Die histopathologische Untersuchung konzentrierte sich auf die Mitteldarmdrüse als wesentlichem Resorptions-, Speicher- und Exkretionsorgan (Janssen, 1981), und erfolgte mikroskopisch (Olympus BX61). Dabei wurden die Gewebeschnitte auf pathologische Veränderungen wie zum Beispiel entzündliche Reaktionen, degenerative Veränderungen, Immunkomplexe (Bignell et al. 2011), intrazelluläre und extrazelluläre Einschlüsse oder Ansammlungen von Hämolymphe im Bereich des Weichkörpers und des Verdauungstraktes untersucht. Differentialdiagnostisch wurden auch Erkrankungen wie z. B. ein Parasitenbefall berücksichtigt. Außerdem wurde auf augenscheinlich kunststoffartiger Mikroplastik im Gewebe geachtet.

2.2.3.2 Klinische Chemie und Biomarker

Anhand klinisch-chemischer Parameter sowie Biomarker lassen sich physiologische und biochemische Reaktionen von Organismen auf verschiedene chemische und biologische Umweltfaktoren abbilden. Die Parameter bilden entweder unspezifische Wirkungen ab oder reagieren sehr spezifisch auf eine Einwirkung von Stoffen oder Stoffgruppen.

Zur Erfassung der klinisch-chemischen Parameter und Biomarker wurden je neun Muscheln (drei pro Replikat) pro Konzentration nach sieben und nach 28 Tagen PVC-Exposition sowie nach der anschließenden 28-tägigen Depurations-Phase entnommen. Da die meisten Parameter von Größe und Geschlecht der Muscheln abhängig sind (Fritts, Peterson, Wisniewski et al., 2015; Zilberberg et al., 2011), wurden nur Muscheln zwischen 7 und 9 cm Länge genutzt, um ein möglichst gleiches Ausgangsniveau aller gemessenen Parameter vorzufinden.

Die während der Expositions-Phase entnommenen Muscheln wurden zunächst geöffnet, indem der vordere und der hintere Schließmuskel durchtrennt wurden. Zur Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustandes erfolgte eine Untersuchung der Schale, der Perlmuttschicht und des Ernährungszustandes. Dann wurden biometrische Daten (Länge, Breite, Höhe) und die Gewichte von Schale und Weichkörper erfasst. Aus diesen Parametern wurde der Konditions-Index ($CI = \text{wet meat weight} / \text{shell weight} \times 100$; nach Davenport & Chen, 1987; Moos et al., 2012) bestimmt. Danach wurden Kiemenblätter, Mantel und Mitteldarmdrüse entnommen, deren Nassgewicht erfasst und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ asserviert. Von den nach der Depurationsphase entnommenen Muscheln, wurden die biometrischen Daten erfasst und daraufhin die komplette geschlossene Muschel vakuumiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ asserviert. Auf-

grund dessen, dass nur die Gesamtgewichte, nicht aber die Weichkörper- und Organgewichte bestimmt wurden, entfiel hier die Berechnung des CI und die Mantelgewichte konnten nach dieser Probenahme nicht erfasst und in die Auswertung einbezogen werden.

Zur Durchführung der Analysen wurden Mantel, Kiemen und Mitteldarmdrüse aus den gefrorenen Weichkörpern der Muscheln entnommen, aufgetaut und sofort aufgearbeitet. Dazu wurden sie mit kaltem Phosphat-Puffer (PBS, Verhältnis 1/10, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in Ultra-Turrax-Tubes (IKA-Werke GmbH & CO. KG) eine Minute bei 6.000 Umdrehungen/min homogenisiert und für einen vollständigen Zellaufschluss noch zweimal bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefroren und wieder aufgetaut (Freeze-Thaw). Anschließend wurde das Homogenat in Reaktionsgefäße (Eppendorf AG) überführt und 10 min bei 10.000 Umdrehungen/min und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das Supernatant wurde abgenommen und die Aktivität von AST (Aspartat-Aminotransferase), ALT (Alanin-Aminotransferase), ALP (Alkalischer Phosphatase), GGT (Gamma-Glutamyltransferase) sowie Glucose, Gesamtprotein, Triglyceride und Calcium mittels eines klinischen Analysegerätes (Hitachi M40 mit passenden S Test Reagent Cartridges, K.K. Hitachi Seisakusho) bestimmt (siehe Tab. 3). Wegen der hohen Aktivität wurde AST 1/20 (v/v) mit PBS verdünnt. Die Konzentrationen von HSP70 (heat shock protein 70) und GPx (Glutathionperoxidase) in den Kiemen wurden mittels kompetitiver ELISA (enzym-linked immunosorbent assay, Pempkowiak et al., 2001) in einem Multiplate Reader (Sunrise, Tecan Trading AG) photometrisch bestimmt. Die Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben ausgeführt (CUSABIO, 2018a, 2018b, Tab. 3).

Glykogen lässt sich nicht direkt aus dem Mantelgewebe bestimmen. Daher wurde es zuerst in Glucose umgewandelt und diese Menge dann von der im Mantel schon vorhandenen Glucose abgezogen. Hierzu wurde Mantelgewebe wie beschrieben aufgearbeitet und $50\text{ }\mu\text{L}$ Supernatant, $25\text{ }\mu\text{L}$ 1-molare Kaliumhydrogencarbonat-Lösung (KHCO_3) und $125\text{ }\mu\text{L}$ Amyloglucosidase (von *Aspergillus niger*, 30–60 U/mg, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) auf 1 ml Essigsäure-Acetat-Puffer in Reaktionsgefäße gegeben und 2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde 1 min bei 10.000 Umdrehungen/min zentrifugiert und eine photometrische Glucose-Messung durchgeführt (Hitachi M40, Tab. 3). Die ursprüngliche, bereits im Mantel vorhandene Glucose wurde bestimmt, indem die gleiche Prozedur parallel ohne Zugabe von Amyloglucosidase durchgeführt wurde.

Tab. 3: Klinisch-chemische Parameter und Biomarker, die in verschiedenen Muschelgeweben analysiert wurden. Angegeben werden außerdem die Herstellerfirmen bzw. Bestimmungsmethoden, mit denen die Parameter erhoben wurden.

Parameter	Kiemen	Mitteldarmdrüse	Mantel	Methode / Hersteller
HSP70	X			ELISA-Kit (CUSABIO)
ALT	X	X	X	Photometrie (Hitachi)
AST	X	X	X	Photometrie (Hitachi)
ALP	X	X		Photometrie (Hitachi)
GPx	X			ELISA-Kit (CUSABIO)
GGT	X	X		Photometrie (Hitachi)
Glykogen			X	Fällungsmethode Glucose, Hitachi
Calcium	x	X	X	Photometrie (Hitachi)
Protein		X	X	Photometrie (Hitachi)
Glucose		X	X	Photometrie (Hitachi)
Triglyceride		X		Photometrie (Hitachi)

2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit Hilfe der IBM SPSS Statistics Software (Version 26.0, IBM Corporation). Die Normalverteilung der Biomarker und der klinisch-chemischen Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test und die Homogenität der Varianzen mittels Levene-Test geprüft. Waren die Voraussetzungen erfüllt, wurde eine two-way ANOVA gefolgt von Post-Hoc Tests (Dunnnett-T-Test) zur Prüfung möglicher Unterschiede zwischen den Gruppen oder zwischen den einzelnen Zeitpunkten (außer im Falle der Mantelgewichte) der Probenahme herangezogen. Lag keine Normalverteilung und/oder Varianzhomogenität vor, wurden Kruskal-Wallis Tests gefolgt vom Post-Hoc Tests (Mann-Whitney U-Tests mit Bonferroni-Korrektur) durchgeführt. Die Unterschiede der Mantelgewichte zwischen den ersten beiden Probenahmezeitpunkten wurden mittels Mann-Whitney U-Tests analysiert. Die Mantelgewichte, die nach Depuration (letzte Probenahme) gemessen wurden, finden durch inkonsistente Probenbehandlung keinen Eingang in die Statistik und die Diskussion (siehe 2.2.3.2).

Die Ergebnisse der Messungen der Biomarker und Parameter der klinischen Chemie sind als Boxplots dargestellt. Die Bedeutung der einzelnen Elemente der Plots und deren Berechnungen sind in Abbildung 24 erklärt. Signifikante Unterschiede zwischen den PVC-exponierten Muscheln und den Kontrolltieren oder zwischen den Probenahmezeitpunkten innerhalb einer Gruppe sind über den Boxplots als Linie mit dazugehörigen Signifikanzniveaus in Form von Sternen (*) dargestellt. Dabei symbolisiert ein Stern einen p -Wert kleiner 0,05, zwei Sterne einen p -Wert kleiner 0,01 und drei Sterne einen p -Wert kleiner 0,001.

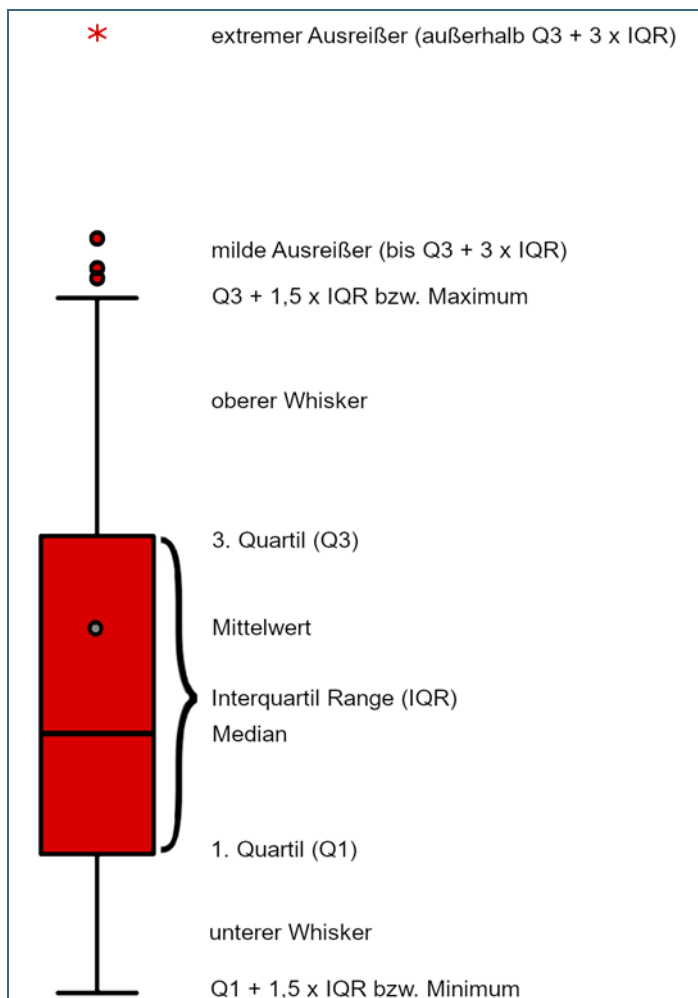


Abb. 24:
Beispiel-Boxplot mit Erklärung aller Elemente

3 Ergebnisse

3.1 Freilandexposition an der Kläranlage Weißenburg

3.1.1 Mikroplastik-Analyse mittels Raman-Mikrospektroskopie

Bei den Muscheln aus dem Freilandversuch wurden insgesamt 454 Partikel größer 50 µm und 2.597 Partikel kleiner 50 µm analysiert. Der Großteil konnte als natürlich vorkommende Partikel mineralischen Ursprungs identifiziert werden (Abb. 25, Abb. 26).

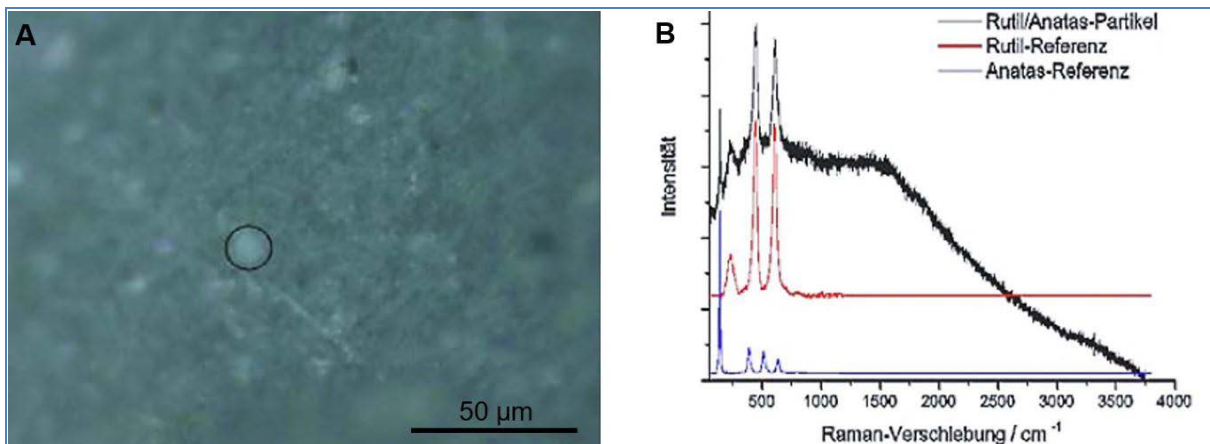


Abb. 25: TiO₂-Partikel (Rutil und Anatas) aus dem Freilandversuch; A) lichtmikroskopisches Bild; B) Spektren des Partikels (schwarz), der Rutil- (rot) und der Anatas-Referenz (blau)

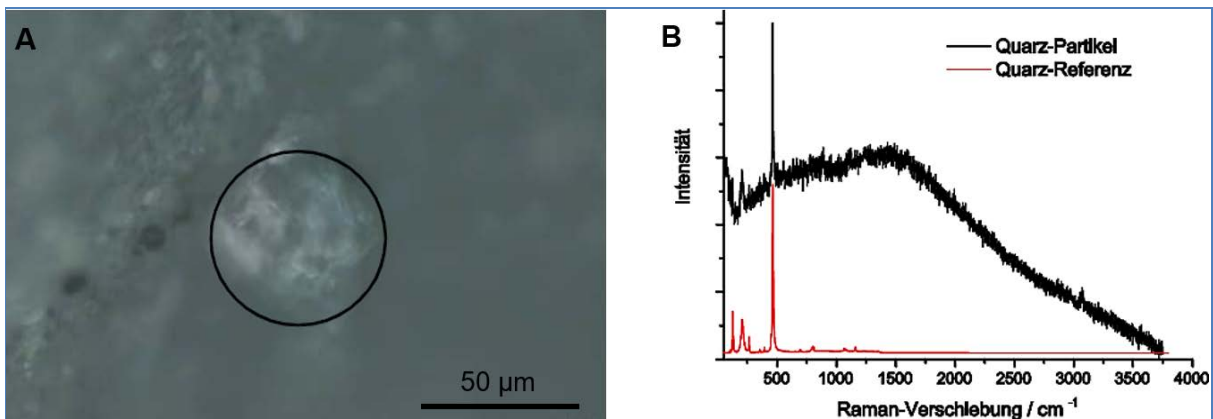


Abb. 26: Quarz-Partikel aus dem Freilandversuch; A) lichtmikroskopisches Bild; B) Spektrum des -Partikels (schwarz), der Quarz-Referenz (rot)

Unter den analysierten Mikropartikeln befanden sich zudem fünf synthetisch hergestellte Pigment-Partikel (Abb. 27, Abb. 28, Tab. 4), die in Muscheln aller Standorte nachgewiesen wurden. Mikroplastik-Partikel wurden hingegen nur in den direkt im gereinigten Abwasser der Kläranlage (Standort B) exponierten Muscheln detektiert. Von den insgesamt 11 Mikroplastik-Partikeln wurden nach einmonatiger Exposition zwei Partikel größer 50 µm ermittelt. Nach sechsmonatiger Exposition wurden neun Mikroplastik-Partikel nachgewiesen, von denen acht Partikel der Größenklasse kleiner 50 µm zuzuordnen waren und aus PVC bestanden (Abb. 29). Neben PVC waren auch Mikroplastik-Partikel der Polymersorten PP (Abb. 30) und PET (Abb. 31) vertreten (Tab. 4).

Hochgerechnet auf die gesamte Filterfläche wies jede an der Kläranlage (Standort B) exponierte Muschel nach einem Monat eine Mikroplastik-Belastung von durchschnittlich vier Partikeln größer 50 µm,

aber keine Partikel kleiner 50 µm auf. Über sechs Monate exponierte Muscheln enthielten hochgerechnet auf die gesamte Filterfläche im Schnitt zwei Partikel größer 50 µm sowie 111 Partikel kleiner 50 µm. In den Muscheln, die entweder oberhalb (Standort A) oder unterhalb (Standort C) der Kläranlageneinleitung in der Schwäbischen Rezat exponiert wurden, sowie in Kontrolltieren (Standort D), wurde kein Mikroplastik nachgewiesen.

Tab. 4: Polymer- und Pigment-Partikel, die nach chemischem Aufschluss in Weichkörpern von Malermuscheln (*Unio pictorum*) mittels Raman Mikrospektroskopie identifiziert wurden. Exponiert wurde A) im Gewässer oberhalb der Kläranlage, B) im Kläranlagenablauf, C) im Gewässer unterhalb des Kläranlagenablaufs, D) in einem Kontrollteich für jeweils einen beziehungsweise sechs Monate. Analys. = analysierte, Pig. = Pigment, PP = Polypropylen, PET = Polyethylenterephthalat, PVC = Polyvinylchlorid.

Zeit	Standort	Schalenlänge /-breite /-höhe [mm]	Gewicht Schale / Weichkörper [g]	Anzahl Muscheln / Filter	Partikel > 50 µm			Partikel < 50 µm		
					Analys. Filterfläche [%]	Anzahl analys. Partikel	Polymer-, Pig.-Typ, Aus- dehnung [µm]	Analys. Filterfläche [%]	Anzahl analys. Partikel	Polymer-, Pig- Typ, Aus-deh- nung [µm]
Nach 1 Monat	A	80,8/34,9/23,8	12,0/23,1	1	12,5	15	-	1,8	177	-
	A	76,8/33,9/25,6	15,7/21,2	1	12,5	7	Pig. gelb 14 (90x36)	1,8	178	-
	B	77,6/35,5/23,6	12,7/19,0	2	25	93	PET (183x12) PP (97x21) Pig. blau 15 (60x56) Pig. blau 15 (54x38)	3,6	360	-
	B	90,4/38,0/29,9	17,1/32,5							
	C	85,8/40,9/25,3	15,8/26,9	1	12,5	10	-	1,8	177	-
	C	90,2/40,1/29,1	21,2/33,8	1	12,5	6	-	1,8	180	-
	D	91,3/40,7/27,0	19,7/31,4	2	25	42	-	3,6	360	-
	D	86,1/36,8/25,0	15,0/27,4							
Nach 6 Monate	A	92,6/40,7/27,3	20,5/34,6	1	12,5	6	-	1,8	109	-
	A	90,1/39,2/26,3	19,0/28,7	1	12,5	0	-	1,8	4	-
	B	70,6/31,8/22,1	12,7/14,6	2	25	115	PP (80x40)	3,6	360	PP (44x16) PVC (13x10) PVC (19x15) PVC (15x14) PVC (8x6) PVC (13x9) PVC (25x19) PVC (22x13)
	B	82,8/36,9/26,1	14,9/26,0							
	C	82,0/38,4/24,7	12,7/25,1	1	12,5	19	-	1,8	152	Pig. blau 15 (30x25)
	C	85,9/37,6/24,0	15,7/23,9	1	12,5	10	-	1,8	180	-
	D	80,8/34,3/23,8	13,5/20,8	2	25	131	-	3,6	360	Pig. blau 15 (18x17)
	D	77,0/37,6/25	17,2/24,4							

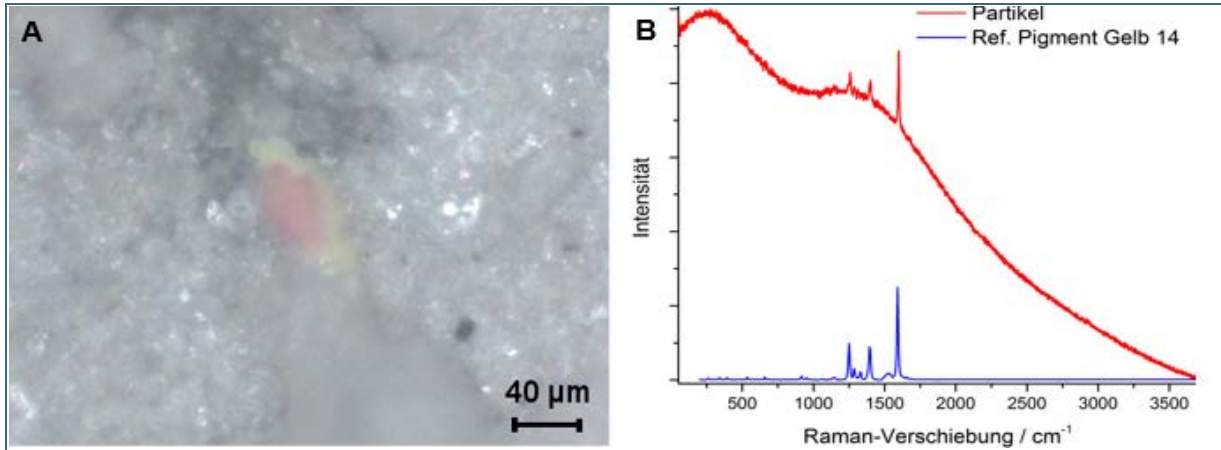


Abb. 27: Pigment Gelb 14-Partikel aus dem Freilandversuch; A) lichtmikroskopisches Bild; B) Spektren der Pigment Gelb 14-Referenz (blau) und des Partikels (rot)

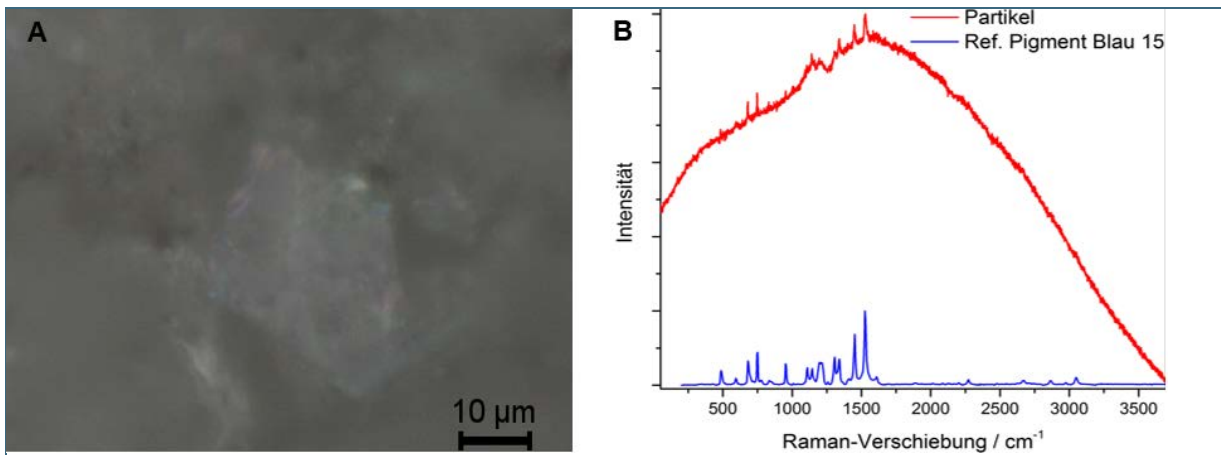


Abb. 28: Pigment blau 15-Partikel aus dem Freilandversuch; A) lichtmikroskopisches Bild; B) Spektren der Pigment blau 15-Referenz (blau) und des Partikels (rot)

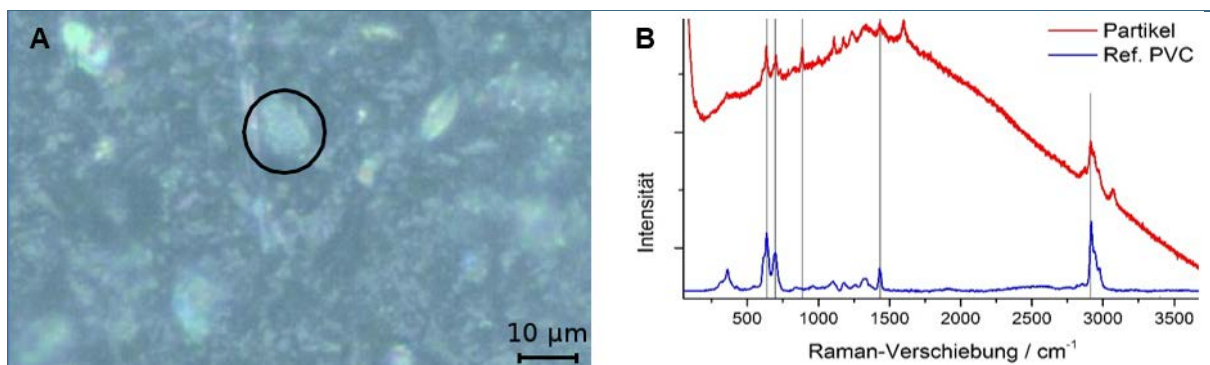


Abb. 29: PVC-Partikel aus dem Freilandversuch; A) lichtmikroskopisches Bild; B) Spektren der PVC-Referenz (blau) und des Partikels (rot)

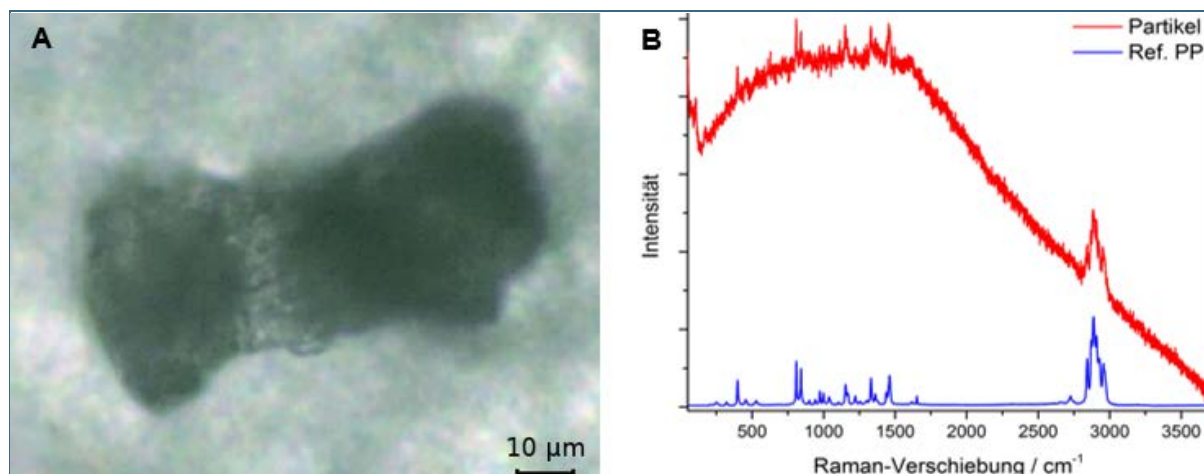


Abb. 30: PP-Partikel aus dem Freilandversuch; A) lichtmikroskopisches Bild; B) Spektren der PP-Referenz (blau) und des Partikels (rot)

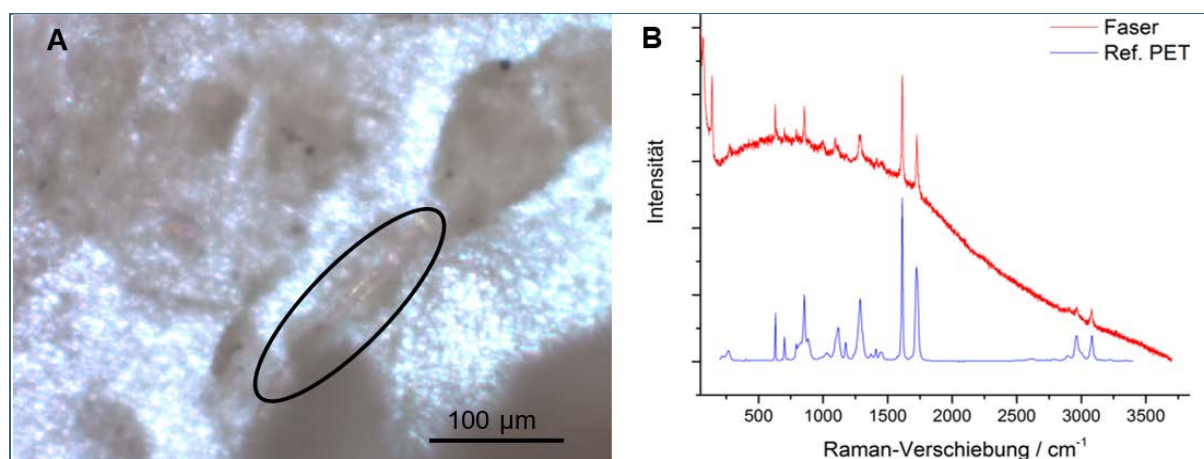


Abb. 31: PET-Faser aus dem Freilandversuch; A) lichtmikroskopisches Bild; B) Spektren der PET-Referenz (blau) und der Faser (rot)

3.2 Exposition in PVC-Mikropartikeln unter Laborbedingungen

3.2.1 PVC-Analyse mittels Raman-Mikrospektroskopie

Im Rahmen des Laborversuchs konzentrierte sich die Analyse auf die Muscheln, die der höchsten PVC-Konzentration ausgesetzt waren ($50 \mu\text{g PVC-Pulver/l}$, Abb. 32). Nach vierwöchiger Exposition betrug die Anzahl aller, auf den ausgewählten Filterflächen (siehe Abb. 9 und Abb. 10) der drei Filter analysierten Partikel 325, 410 bzw. 327 Partikel. Hiervon wurden 91 ± 54 PVC-Mikropartikel der Größenklasse kleiner $50 \mu\text{m}$, sowie 133 ± 45 PVC-Mikropartikel größer $50 \mu\text{m}$ identifiziert. Auf den drei Filtern, die nach weiteren vier Wochen Exposition in PVC-freiem Wasser (Depuration) angefertigt wurden, wurden insgesamt 222, 218 beziehungsweise 199 Partikel analysiert. Hiervon bestanden nur 2 ± 1 Partikel kleiner $50 \mu\text{m}$ sowie 3 ± 2 Partikel größer $50 \mu\text{m}$ aus PVC (Abb. 33). Bei der Interpretation der Partikelzahlen ist zu beachten, dass zum Nachweis von Mikropartikeln größer $50 \mu\text{m}$ 12,5 % der Filterfläche untersucht wurde, während Mikropartikel kleiner $50 \mu\text{m}$ auf 1,8 % der Filterfläche analysiert wurden.

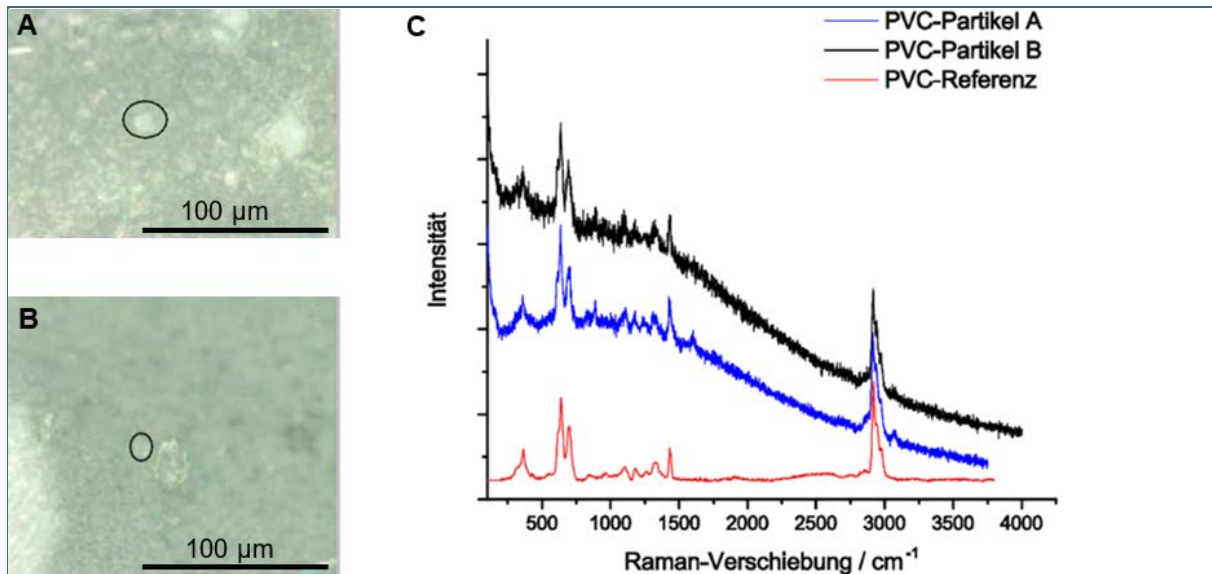


Abb. 32: A und B) lichtmikroskopische Bilder zweier PVC-Mikropartikel aus den Laborversuchen; C) Spektren der PVC-Referenz (rot) und der -Partikel (blau, schwarz).

Bei der Größenverteilung der während der Exposition von den Muscheln aufgenommenen Partikel ist mit Ausnahme der Fraktion kleiner 10 µm mit abnehmender Partikelgröße eine tendenzielle Zunahme der Partikelzahlen zu beobachten (Abb. 33). Dies stimmt mit der Größenverteilung und der Anzahl der im Versuch eingesetzten Partikel überein (Abb. 18). Auch nach der Depuration waren in den Muscheln sowohl Partikel kleiner 50 µm als auch größer 50 µm vorhanden, wobei auch hier tendenziell mehr kleine als große Partikel vorhanden waren (Abb. 33).

Auch bei der Interpretation der in Abbildung 33 dargestellten Partikelzahlen pro Größenklasse gilt es zu beachten, dass 12,5 % der Filterfläche auf Partikel größer 50 µm aber nur 1,8 % der Fläche auf Partikel kleiner 50 µm untersucht wurden. Dadurch können die in A und B dargestellten Daten nicht direkt mit C und D verglichen werden. Pro Filter wurden nach vier Wochen hochgerechnet 5.056 ± 3.000 PVC-Mikropartikel der Größenklasse kleiner 50 µm, sowie 1.064 ± 360 PVC-Mikropartikel größer 50 µm identifiziert. Nach acht Wochen wurden nur noch 111 ± 56 PVC-Partikel kleiner 50 µm sowie 24 ± 16 PVC-Partikel größer 50 µm detektiert.

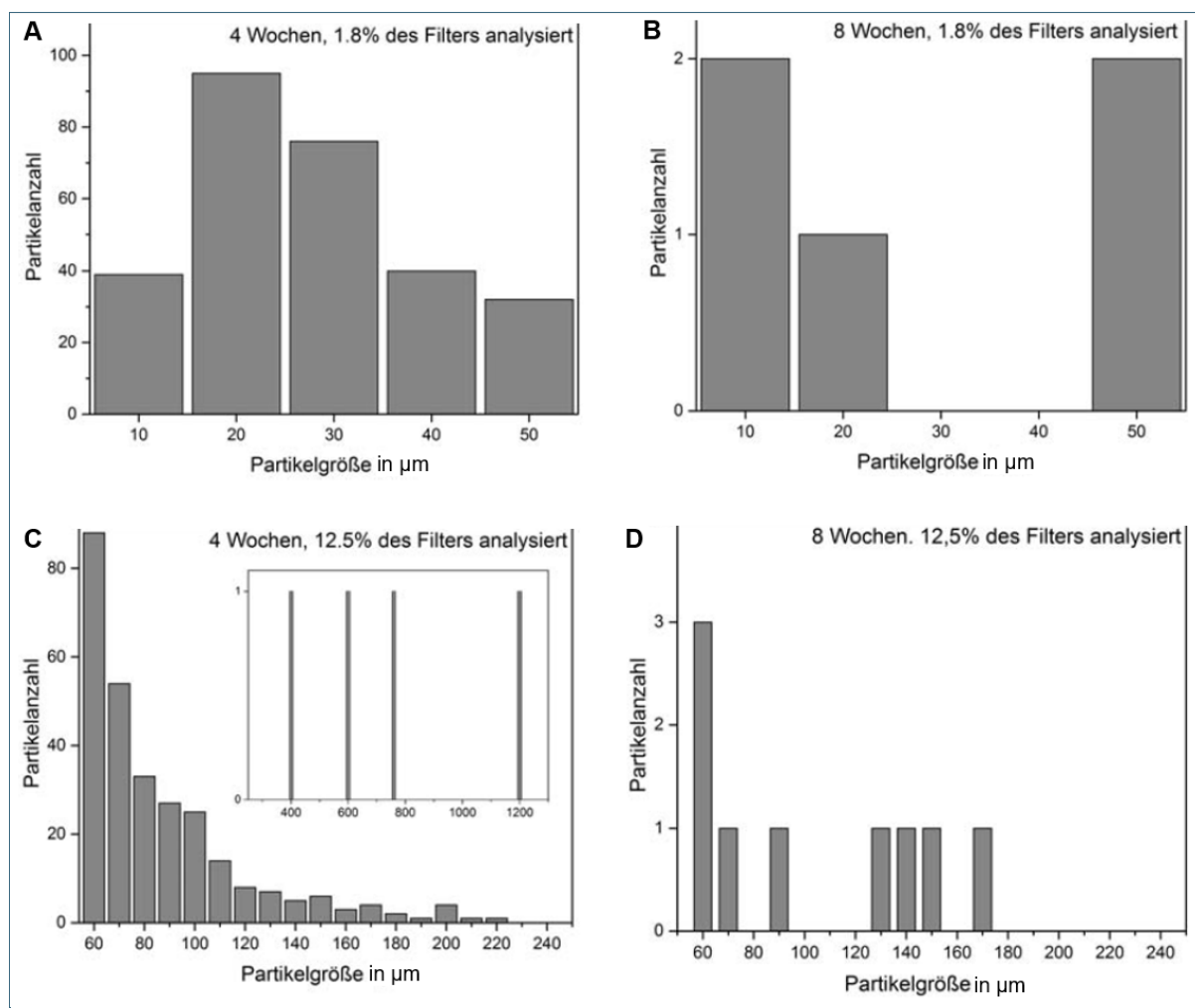


Abb. 33: Größenverteilung (Summe aus je 3 Filtern; n = 2 Muscheln pro Filter) der in den Muscheln nachgewiesenen PVC-Mikropartikel. A) Partikel < 50 µm nach 4 Wochen (Exposition), B) nach 8 Wochen (Depuration), C) Partikel > 50 µm nach 4 Wochen und D) nach 8 Wochen. Es wurden jeweils 12,5% der effektiven Filterfläche auf Partikel > 50 µm und 1,8% auf Partikel < 50 µm untersucht

Die der Laborluft ausgesetzten Blindfilter wiesen nach Analyse von 27 beziehungsweise 39 Partikeln pro Filter keine Mikroplastik-Partikel auf. Auch im verwendeten Reinstwasser wurden keine Verunreinigung mit PVC ermittelt. In der Blindprobe des Aufschlusses wurde bei einer Analyse von insgesamt 94 beziehungsweise 123 Partikeln pro Filter ein PE- Partikel (Abb. 34), jedoch kein PVC nachgewiesen.

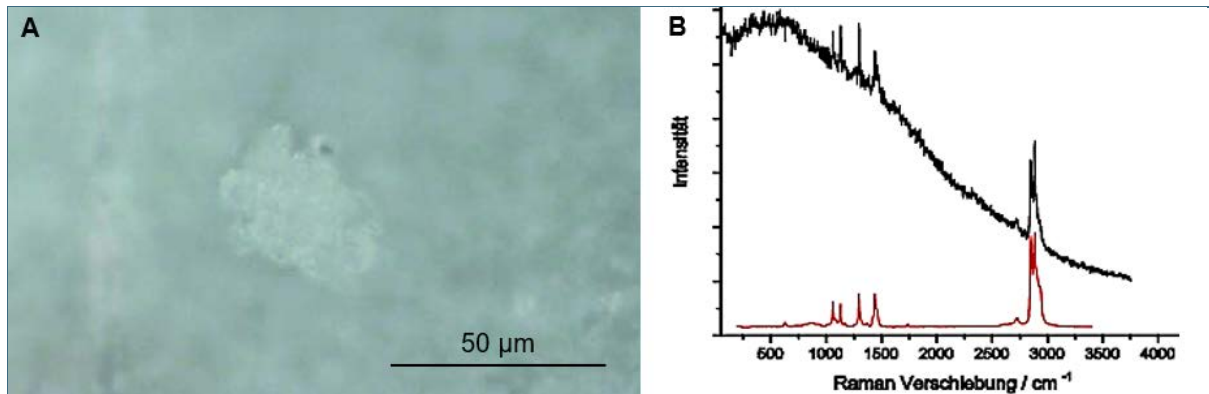


Abb. 34: PE-Partikel aus der Blindprobe des Aufschlusses; A) lichtmikroskopisches Bild; B) Spektren der PE-Referenz (rot) und des -Partikels (schwarz)

3.2.2 Auswirkungen der PVC-Mikropartikel auf die Muschelgesundheit

3.2.2.1 Pathologische Anatomie und Histopathologie

Generell wiesen die Tiere einen guten Ernährungszustand auf. Unabhängig von der Expositionsdauer oder davon, ob es sich um PVC-exponierte oder Kontrolltiere handelte, waren vereinzelt makroskopische Veränderungen der Schale, wie Verfärbungen oder Auflagerungen an/auf dem Periostracum (äußere, organische Schicht) und der Perlmuttertschicht vorhanden. Selten waren auch Veränderungen des Weichkörpers zu erkennen, wie gelbe oder gräuliche Auflagerungen auf den Kiemen oder kleine Vernarbungen. Mikroskopisch konnten wiederum unabhängig von der Versuchsgruppe vereinzelt Ciliaten zwischen den Kiemen der Muscheln gefunden werden.

Auch der Konditions-Index (CI) der Muscheln zeigte keinerlei Abhängigkeit von der eingesetzten PVC-Konzentration oder der Expositionsdauer (Abb. 35). Weiterhin traten während des gesamten Versuchszeitraums keine auffälligen oder Gruppen-abhängigen Mortalitäten auf. So verendeten im Kontrollkollektiv insgesamt zwei Tiere. Die Zahl verendeter Muscheln betrug nach Exposition in 500 ng PVC/l drei Tiere; in 5 µg PVC/l zwei Tiere und in 50 µg PVC/l ein Tier. Nach Exposition in 50 ng PVC/l verendete keine der Muscheln.

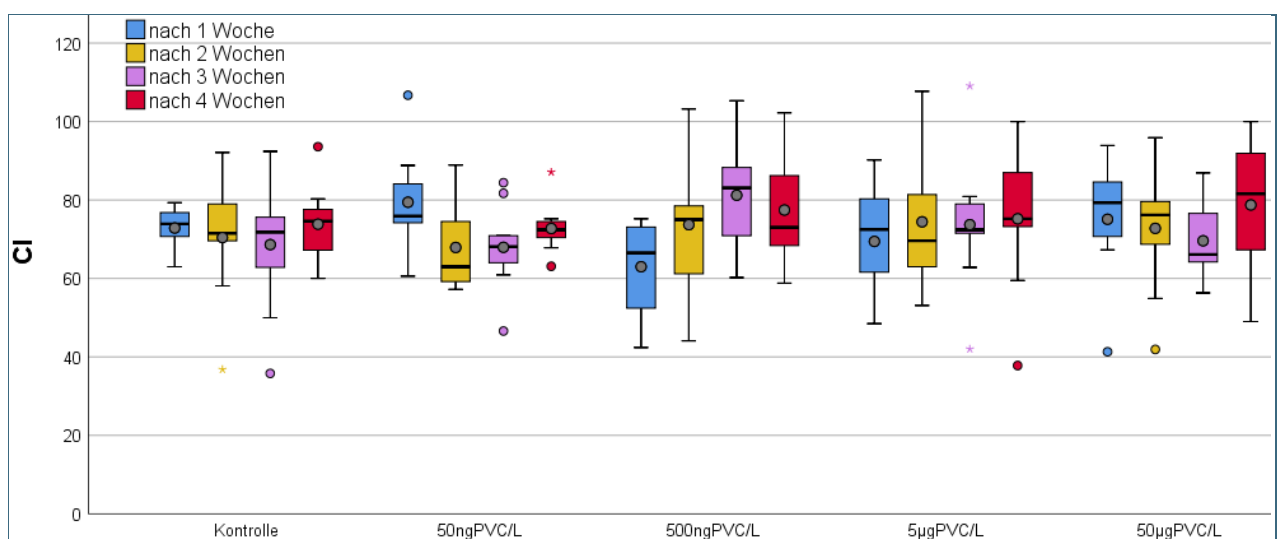


Abb. 35: Konditions-Index (CI) Großer Flussmuscheln (*U. tumidus*) nach wöchentlicher Entnahme ab Versuchsbeginn¹. Stichprobe (n) = 9 je Gruppe und Zeitpunkt. Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) sind nicht dargestellt. Sterne und Punkte unter- und oberhalb der Boxplots stellen milde und extreme Ausreißer dar (siehe Abb. 24). ¹Kollektiv für Biomarker-Analysen.

Lichtmikroskopisch wurden bei Tieren, die der höchsten PVC-Konzentration von 50 µg/l ausgesetzt waren keine Mikroplastik-ähnlichen Partikel im histologischen Schnitt beobachtet. Auch waren keine pathologischen Veränderungen sichtbar, welche nicht auch in den jeweiligen Kontrolltieren zu beobachten waren. Vielmehr handelt es sich um Nebenbefunde die hier der Vollständigkeit halber exemplarisch aufgeführt werden.

Die bisherigen Untersuchungen konzentrierten sich auf die Mitteldarmdrüse. Hier wurden, unabhängig davon ob die Muscheln PVC-Mikropartikeln ausgesetzt wurden oder ob es sich um Kontrolltiere handelte, bei einzelnen Muscheln entzündliche Reaktionen beobachtet (Abb. 36). Die Veränderungen traten in der Regel gleichzeitig mit einem Parasitenbefall auf, sodass ein kausaler Zusammenhang zu vermuten ist. Bei den Parasiten handelte es sich überwiegend um Larven von Trematoden (Bucephalidae).

Vereinzelt wurde sowohl bei PVC-exponierten Tieren als auch bei Kontrollgruppen eine Tubulusatrophie und -nekrose in der Mitteldarmdrüse diagnostiziert (Abb. 37). Darüber hinaus wies das Tubulusepithel der Mitteldarmdrüse von Tieren aller Gruppen verschiedene Zustandsformen auf, welche unterschiedliche physiologische Phasen der Verdauungsprozesse wie Resorptions-, Exkretions- und Regenerationsphase widerspiegeln (Abb. 38, Abb. 39).

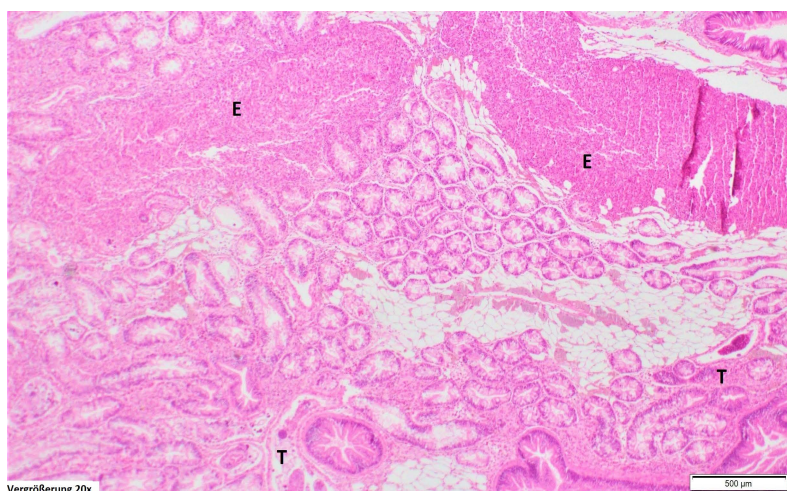


Abb. 36:
Histologischer Schnitt der Mitteldarmdrüse einer Großen Flussmuschel (*Unio tumidus*), Kontrolltier. Interstitium mit Entzündungsherden (E), Befall mit Trematodenlarven (T); Färbung H&E

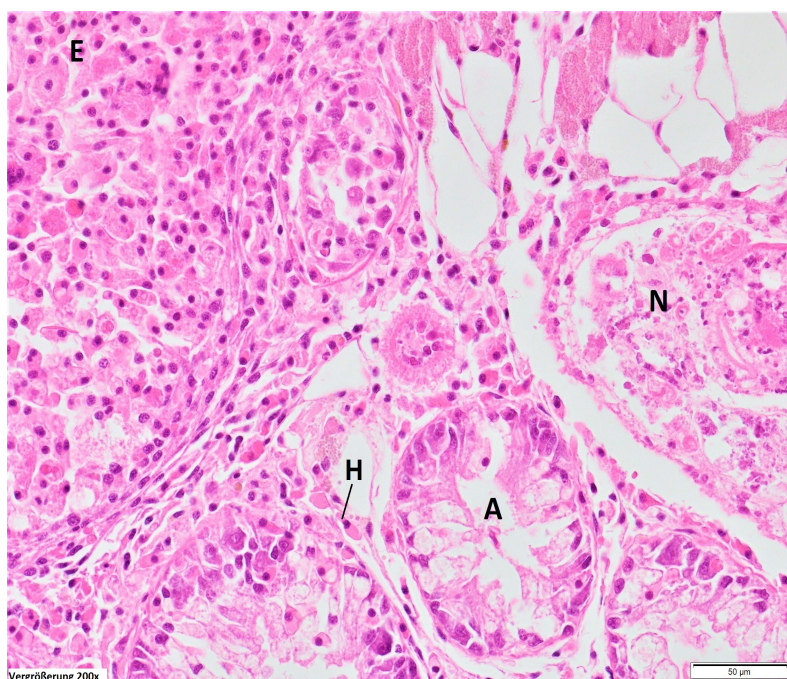


Abb. 37:
Histologischer Schnitt der Mitteldarmdrüse einer Großen Flussmuschel (*U. tumidus*), Kontrolltier. Entzündungsherde (E), atrophische Alteration (A), Nekrose von Tubuli (N), Hämocyten (H); Färbung H&E

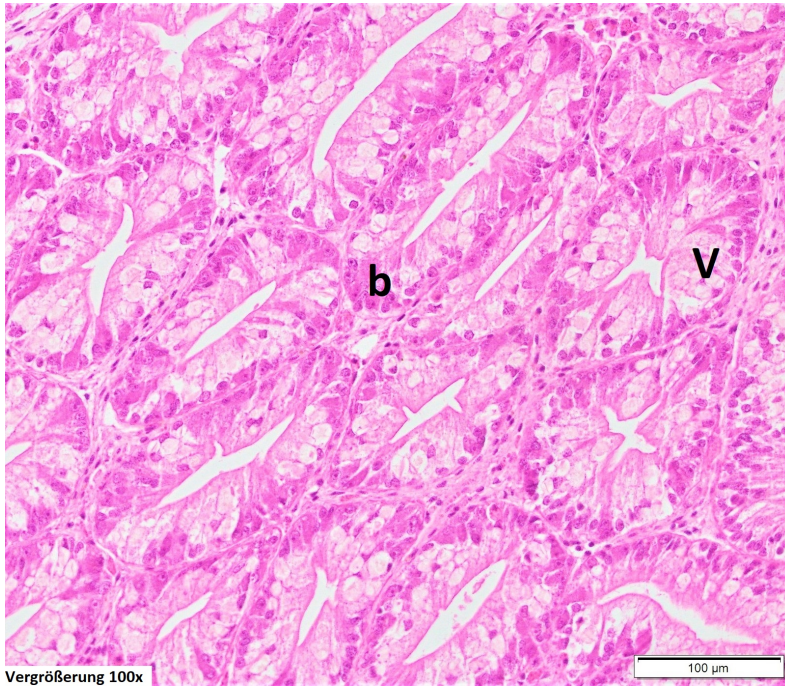


Abb. 38:
Histologischer Schnitt der Mittel-
darmdrüse einer Großen Flussmu-
schel (*U. tumidus*), 50µg PVC/l. Tu-
buli mit hohen Epithelsäumen und un-
regelmäßig bis sternförmig ein-
geengten Lumina, Verdauungszel-
len (V) mit Vesikeln, basophilen
Zellen (b) nach physiologischem
Verteilungsmuster im Tubu-
lusepithel; Färbung H&E

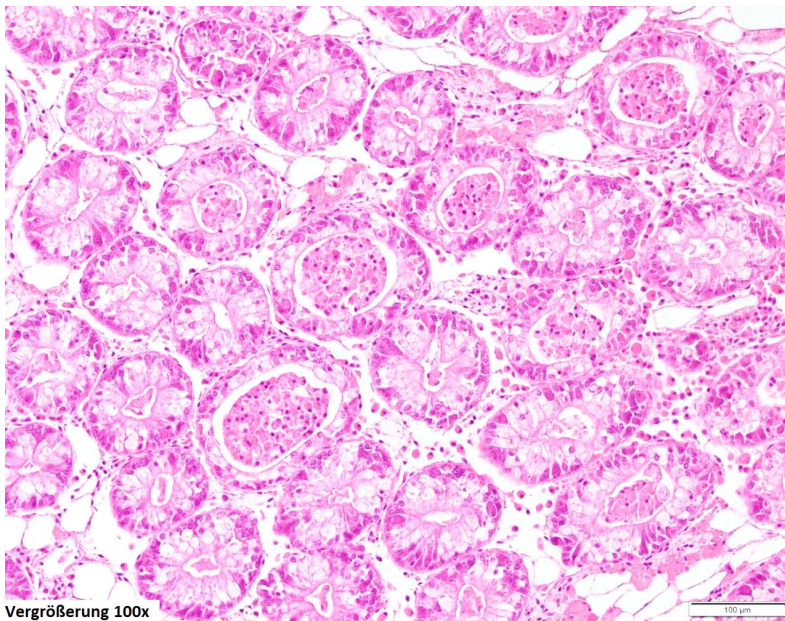


Abb. 39:
Histologischer Schnitt der Mittel-
darmdrüse einer Großen Flussmu-
schel (*U. tumidus*), 50 µg PVC/l.
Degenerative Veränderungen der
Tubuli, z.T. Regeneration, Zelldetri-
tus im Tubuluslumen, Verringerung
der Höhe des Tubulusepithels; Fär-
bung H&E

3.2.2.2 Klinische Chemie und Biomarker Kiemen

Die Calcium-Konzentrationen in den Kiemen der Muscheln unterschieden sich weder zwischen den PVC-exponierten Tieren und der Kontrolle innerhalb eines Probenahme-Zeitpunktes noch zwischen den verschiedenen Probenahmen signifikant (Abb. 1, Anhang I). Gleiches galt für die GGT-Werte (Abb. 2, Anhang I). Die HSP70-Werte hingegen waren in der Gruppe, die der höchsten PVC-Konzentration ausgesetzt war nach einwöchiger Exposition tendenziell erhöht (Abb. 3, Anhang I). Die Bestimmung der ALT-Aktivität ergab keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Allerdings zeigten sich Unterschiede zwischen den Zeitpunkten. Bei den Tieren aller Versuchsgruppen sowie der Kontrolle wurde ein signifikanter Anstieg der ALT-Aktivität von Woche eins auf Woche vier sowie eine signifikante Abnahme bis zur Woche acht beobachtet (Abb. 4, Anhang I). Die Aktivität von ALP zeigte

ein vergleichbares Muster, allerdings nicht so deutlich ausgeprägt, wie bei ALT (Abb. 5, Anhang I). Die GPx-Aktivitäten in den Kiemen der PVC-exponierten Tiere unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt von denen der Kontrolle. Allerdings zeigten sich in verschiedenen Gruppen signifikante Unterschiede zwischen der ersten und der achten Woche, beziehungsweise zwischen der vierten und der achten Woche. Allerdings ist bei der Interpretation dieser Unterschiede zu beachten, dass in einzelnen Tieren der nach acht Wochen beprobten Muschelgruppen extrem erhöhte Enzymaktivitäten gemessen wurden (Abb. 6, Anhang I), die nicht repräsentativ für die Gruppen waren. Die Aktivität von AST unterschied sich zu keinem Zeitpunkt zwischen den Gruppen (Abb. 7, Anhang I). Innerhalb der in 5 µg PVC/l beziehungsweise 50 µg PVC/l exponierten Muscheln wurde jeweils in einem Fall ein signifikanter Abfall der AST-Aktivität nach der Depurationsphase beobachtet. Eine Abnahme war auch in der Kontrolle festzustellen, allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant ($p=0,059$).

Mitteldarmdrüse

In der Mitteldarmdrüse wurden hinsichtlich der Konzentrationen von Calcium-, Glucose- und Protein- sowie den Enzymaktivitäten von ALP, GGT und AST (Abb. 8–13 Anhang I) keine Unterschiede zwischen PVC-exponierten und Kontrolltieren festgestellt. Vereinzelt unterschieden sich die Calcium-, und Protein-Konzentrationen sowie die Aktivität der GGT zwar signifikant zwischen den Zeitpunkten der Probenahme, allerdings ohne erkennbare Muster (Abb. 8, 10, 11 Anhang I). Für andere Parameter ergaben sich hingegen Muster bei einem Vergleich zwischen den Probenahmezeitpunkten. Wie in den Kiemen stiegen die ALP-Konzentrationen auch in der Mitteldarmdrüse im Mittel in allen Gruppen von Woche eins zu Woche vier an. Während bei Muscheln der beiden höchsten Testkonzentrationen die Unterschiede statistisch signifikant waren, wurden in den anderen Versuchsgruppen und in der Kontrolle nur Tendenzen ermittelt. In der Depurationsphase nahm die Aktivität in der Gruppe, die 5 µg PVC/l exponiert war wieder signifikant ab, was tendenziell auch in der Kontrolle und den beiden Gruppen zu beobachten war, die geringeren PVC-Konzentrationen ausgesetzt waren. Die ALP-Aktivität in der Mitteldarmdrüse der Tiere, die der höchsten Konzentration ausgesetzt waren, stieg hingegen in der Depurationsphase im Vergleich zu den Zeitpunkten während der Exposition im Mittel an (Abb. 9, Anhang I). Die AST-Aktivität war, mit Ausnahme der Kontrolltiere, nach vier Wochen am höchsten (Abb. 13, Anhang I), was sich wiederum mit den Befunden in den Kiemen deckt. Die Kontrolltiere wiesen nach der ersten Woche tendenziell die höchste, nach der achten Woche die niedrigste AST-Aktivität auf. Bezüglich der Aktivität der ALT war nach vier Wochen Exposition von der Kontrolle bis zur zweithöchsten PVC-Konzentration ein Anstieg zu beobachten (Abb. 15, Anhang I). Wie bei vielen anderen gemessenen Parametern auch, waren die mittleren ALT-Aktivitäten nach vier Wochen PVC-Exposition in der Regel (außer bei der Kontrolle) am höchsten. Die geringste Aktivität (teils tendenziell, teils signifikant) war nach der Depuration in allen Gruppen messbar (Abb. 15, Anhang I.) Die Konzentrationen von Glucose waren, mit Ausnahme der 50 ng PVC/l-Gruppe, nach der vierten Woche in allen Testgruppen (teils tendenziell, teils signifikant) am höchsten und wiederum nach der Depurationsphase deutlich niedriger und zeigten somit ein ähnliches Muster (Abb. 12, Anhang I). Die Konzentrationen der Triglyceride stiegen hingegen bei allen exponierten, außer der 5 µg PVC/l-Gruppe, bei der sich nur eine entsprechende Tendenz zeigte, zwischen der ersten und der achten Woche kontinuierlich und signifikant an. In den Kontrollmuscheln war hingegen zwischen der ersten und der vierten Woche eine Abnahme der Triglycerid-Konzentrationen zu beobachten. Ein Vergleich von PVC-exponierten Muscheln mit Kontrolltieren ergab nur bei Tieren, die über den Zeitraum von einer Woche 50 ng PVC/l ausgesetzt waren signifikant geringere Triglycerid-Konzentrationen. Tendenziell zeigten auch die übrigen PVC-exponierten Gruppen nach einer Woche im Mittel geringere Triglycerid-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 14, Anhang I).

Mantel

Im Mantelgewebe der Kontrolltiere und der Muscheln, die den beiden höchsten PVC-Konzentrationen ausgesetzt waren, stiegen die Calcium-Konzentrationen von der ersten bis zur achten Woche signifikant an. In den Muscheln, die den beiden niedrigeren PVC-Konzentrationen ausgesetzt wurden, war dieser Anstieg nicht signifikant ausgeprägt (Abb. 16, Anhang I). Die AST zeigte größtenteils das gleiche Aktivitätsmuster wie in der Mitteldarmdrüse. Die höchsten Werte traten, außer bei der Kontrolle, nach vierwöchiger PVC-Exposition auf. Nach der Depurationsphase lagen die Werte für AST in der Regel wieder auf einem niedrigen Niveau (Abb. 17, Anhang I). Auch die Protein-Konzentrationen waren mit Ausnahme der 5 µg PVC/l-Gruppe in der Regel nach vier Wochen am höchsten (Abb. 18, Anhang I). Im Gegensatz dazu zeigte die ALT nach vierwöchiger Exposition sowohl in der Kontrolle als auch in den Tieren der niedrigsten PVC-Konzentration die geringste Aktivität. Nach Exposition mit 500 ng, 5 µg und 50 µg PVC/l waren die ALT-Aktivitäten hingegen zu allen drei Probenahme-Zeitpunkten im Mittel fast identisch (Abb. 19, Anhang I). Die Glykogen-Konzentrationen im Mantelgewebe waren im Mittel nach vier Wochen Exposition in allen Gruppen, mit Ausnahme der Tiere, die der höchsten PVC-Konzentration ausgesetzt waren, am höchsten. Ein Vergleich zwischen den Gruppen ergab, dass nach vier Wochen mit steigender PVC-Testkonzentration die Glykogen-Konzentrationen im Mantel tendenziell abnahmen. Der Unterschied war allerdings nur bei Muscheln, die der höchsten PVC-Konzentration ausgesetzt wurden signifikant gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 40). Für die Glucose-Konzentrationen war ein gegenteiliger Trend zu beobachten. Während die Kontrolltiere nach der vierten Woche im Mittel die niedrigsten Werte aufwiesen, waren bei Tieren, die der höchsten PVC-Konzentration von 50 µg/l ausgesetzt waren, auch die höchsten Glucose-Werte nachweisbar. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Mittelwerte von einzelnen Extremwerten beeinflusst wurden. Zudem ist zu beachten, dass Glucose-Konzentrationen, welche unterhalb der Nachweisgrenze (2 mg/dl) lagen, als 2/3-Wert dieser Nachweisgrenze angenommen wurden (Abb. 41), da im Mantel von Muscheln auch im physiologischen Zustand Glucose enthalten ist (Chen et al. 2001). Bezüglich der Mantelgewichte beschränken sich die Ergebnisse auf Messdaten der ersten und vierten Versuchswoche, da die nach der achten Woche seziierten Muscheln anders aufgearbeitet wurden, sodass eine direkte Vergleichbarkeit der Messwerte nicht gegeben ist (siehe 2.2.3.2). Die Daten weisen mit steigender PVC-Konzentration auf eine tendenzielle Abnahme der mittleren Mantelgewichte zwischen der Kontrolle und allen PVC-exponierten Muschelgruppen hin. Diese Tendenz wurde sowohl nach einwöchiger als auch nach vierwöchiger Exposition beobachtet. Bei Muscheln, die der höchsten PVC-Konzentration ausgesetzt waren, lag das Mantelgewicht nach vier Wochen sogar signifikant unter dem der Kontrollmuscheln. Diese Gewichtsabnahme spiegelte sich allerdings nicht im CI der Muscheln wieder. Hier ergaben sich weder zwischen den Gruppen, noch zwischen den Zeitpunkten der Probenahmen signifikante Unterschiede (siehe Kapitel 3.2.2.1 und Abb. 35).

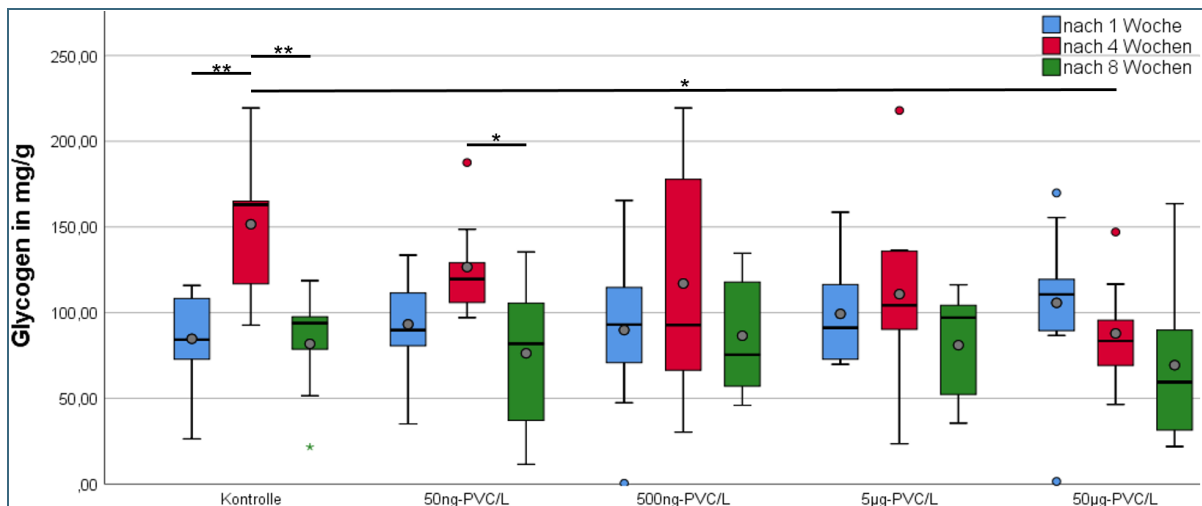


Abb. 40: Im Supernatant des Mantels Großer Flussmuscheln (*U. tumidus*) gemessene Glycogen-Konzentrationen nach einwöchiger (blau) und nach vierwöchiger PVC-Exposition (rot) und nach darauf folgenden vier Wochen Depuration in PVC-freiem Wasser (grün). Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) sind nicht dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen PVC-exponierten und Kontroll-Muscheln sowie zwischen den Probenahmezeitpunkten sind als Linien über den Boxplots dargestellt, wenn der entsprechende Kruskal-Wallis Test (gefolgt von Post-Hoc Tests) ein signifikantes Ergebnis lieferte. Die entsprechenden Signifikanzniveaus werden mittels Sternen (*) dargestellt: p -Wert $< 0,05$ \triangle^* , $< 0,01$ \triangle^{**} , $< 0,001$ \triangle^{***} .

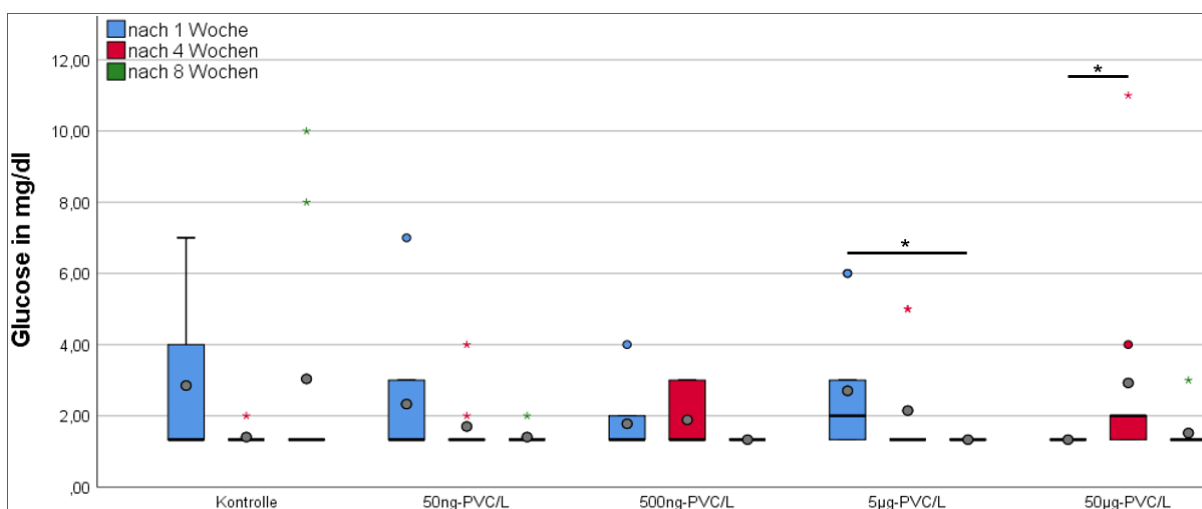


Abb. 41: Im Supernatant des Mantels Großer Flussmuscheln (*U. tumidus*) gemessene Glucose-Konzentrationen nach einwöchiger (blau) und nach vierwöchiger PVC-Exposition (rot) und nach darauf folgenden vier Wochen Depuration in PVC-freiem Wasser (grün). Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) sind nicht dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen PVC-exponierten und Kontroll-Muscheln sowie zwischen den Probenahmezeitpunkten sind als Linien über den Boxplots dargestellt, wenn der entsprechende Kruskal-Wallis Test (gefolgt von Post-Hoc Tests) ein signifikantes Ergebnis lieferte. Die entsprechenden Signifikanzniveaus werden mittels Sternen (*) dargestellt: p -Wert $< 0,05$ \triangle^* , $< 0,01$ \triangle^{**} , $< 0,001$ \triangle^{***} .

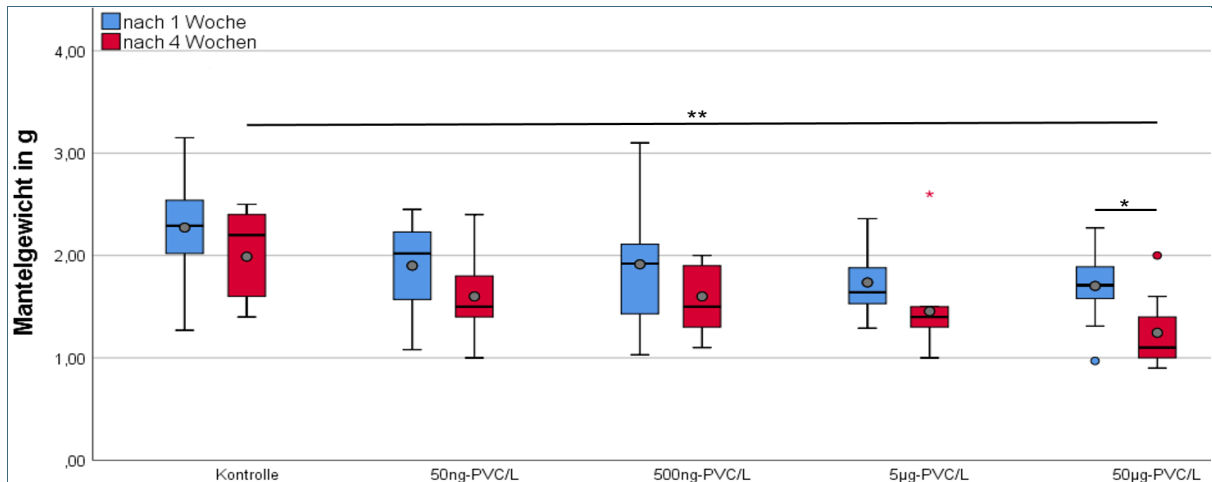


Abb. 42: Mantelgewichte Großer Flussmuscheln (*U. tumidus*) nach einwöchiger (blau) und nach vierwöchiger PVC-Exposition (rot). Die Gewichte nach Depuration sind nicht dargestellt, da die Gewebe nach diesem Zeitpunkt anders behandelt wurden. Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) sind nicht dargestellt. Die Vergleiche zwischen PVC-exponierten und Kontroll-Muscheln sowie zwischen den Probenahmezeitpunkten sind als Linien über den Boxplots dargestellt, wenn der entsprechende Mann-Whitney U-Test ein signifikantes Ergebnis lieferte. Die Signifikanzniveaus werden mittels Sternen (*) dargestellt: p -Wert $< 0,05 \triangleq^*$, $< 0,01 \triangleq^{**}$, $< 0,001 \triangleq^{***}$.

4 Diskussion

4.1 Verfahrensunsicherheiten und Grenzen der Interpretation

4.1.1 Kontamination

Synthetische Kunststoffe sind auch aus modernen Laboratorien nicht mehr wegzudenken. Ein Großteil aller Verbrauchsmaterialien und viele Geräte, Equipment oder Teile davon sind aus Kunststoffen hergestellt. Die Vermeidung einer Kontamination sowohl bei der Probennahme und -aufarbeitung, der Probenlagerung in Kunststoffgefäßen sowie der Analyse stellt eine große Herausforderung beim Nachweis von Mikroplastik in Umweltproben dar. Bei allen genannten Arbeitsschritten können sich Mikroplastik-Partikel lösen und in die Proben eingebracht werden. Darüber hinaus besteht die Gefahr der Kontamination aus der Luft oder über Fasern, die sich zum Beispiel aus der Kleidung lösen (Dris et al., 2018; Scopetani et al., 2019). Bei der Arbeit mit definierten, seltenen oder markierten Mikroplastik-Partikeln, wie im vorliegenden PVC-Versuch, können eventuelle Kontaminationen durch Kleidungsfasern oder kunststoffhaltiges Equipment, welche nicht aus dem nachzuweisenden Kunststoff bestehen, vernachlässigt werden. Bei der Untersuchung von Umweltproben oder grundsätzlich von Proben in denen verschiedenste Kunststoffe das Target bilden, wie bei der Untersuchung der Muscheln aus dem Freilandversuch, sollte jede Kontaminationsmöglichkeit möglichst ausgeschlossen werden. In vielen Studien, speziell zu Beginn der Mikroplastikforschung, wurde die Möglichkeit der Selbstkontamination allerdings wenig beachtet. Als Folge werden einige Studien mittlerweile stark diskutiert und deren Ergebnisse sogar angezweifelt (Lachenmeier et al., 2015; Rist et al., 2018; Scopetani et al., 2019). In vorliegender Studie wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen, um eine Kontamination der Proben mit Mikroplastik zu vermeiden (siehe 2.1.2, 2.2.1, 2.2.2 und 2.2.3.1). Die Untersuchungsergebnisse der Blindproben zeigen, dass die Maßnahmen geeignet waren, eine Kontamination zu verhindern. Ein weiteres Indiz für die Wirksamkeit der getroffenen Vorkehrungen ist, dass in Kontrolltieren des Freilandversuchs kein Mikroplastik nachweisbar war und in denen aus dem Laborversuch keine PVC-Mikropartikel vorhanden waren (siehe 3.1.1 und 3.2.1).

4.1.2 Einfluss des chemischen Aufschlusses und der Analysemethode

Voraussetzung für den Nachweis von Mikroplastikpartikeln in Muscheln ist die möglichst vollständige Entfernung von Muschelgewebe und weiteren organischen und anorganischen Substanzen. Hierfür wurden verschiedene Methoden beschrieben. In der Regel sind Säuren, Basen, oxidierende Chemikalien (zum Beispiel Wasserstoffperoxid, H_2O_2), Tenside (Natriumdodecylsulfat, SDS), Enzyme (Lipase, Amylase, Chitinase, Proteinase, Cellulase) oder eine Abfolge solcher Substanzen beteiligt (Xu et al., 2019). Allerdings beeinflussen diese Stoffe die späteren Analysenergebnisse.

Je nach eingesetzter Methode wird Gewebe unterschiedlich gut aufgeschlossen. Bei einem zu „milden“ Aufschluss kann Material auf dem Filter verbleiben und Partikel einschließen oder überdecken, sodass die Qualität der Partikeldetektion verschlechtert wird. Die im Gegensatz dazu in verschiedenen Studien genutzten starken Säuren (wie Salpetersäure (HNO_3), Claessens et al., 2013; van Cauwenberghe & Janssen, 2014; Witte et al., 2014) und Basen (Claessens et al., 2013; Dehaut et al., 2016; Rochman et al., 2015) ermöglichen zwar eine sehr effektive Zersetzung von Muschelweichkörpern, können die chemischen und optischen Eigenschaften von Polymeren allerdings beeinflussen (Avio, Gorbi, & Regoli, 2015; Cole et al., 2014). Dies kann zu Änderungen der Partikel-Morphologie und -Farbe führen, aber auch zu Verklumpung und Verschmelzung bis hin zur kompletten Auflösung der Mikroplastik-Partikel. So wurden in verschiedenen Studien beispielsweise Farbveränderungen, Gewichtsverluste oder die Zunahme der Partikeloberfläche von PET- und PE-Partikel beschrieben, sowie die komplette Zersetzung von Nylon-Fasern und PA-Partikeln (Catarino et al., 2017; Dehaut et al., 2016; Roch & Brinker, 2017). Dadurch kann die Detektion und Quantifizierung der Partikel oder einzelner Polymersorten verfälscht, oder ganz verhindert werden.

In Vorversuchen zur aktuellen Freilandstudie wurde kein Effekt der hier ebenfalls genutzten HNO_3 auf PET und PE festgestellt. PA wurde durch den Aufschluss jedoch vollständig aufgelöst. Somit ist nicht auszuschließen, dass sich auch in den an der Kläranlage exponierten Muscheln ursprünglich PA-Partikel befanden, die nach dem Aufschluss nicht mehr detektiert werden konnten. In anderen Freilandstudien in denen keine HNO_3 zum Einsatz kam, zählten PA- und PA-Cellulose zu den in Muscheln am häufigsten nachgewiesenen Polymeren (Courtene-Jones et al., 2017).

Im Vorfeld des Expositionsversuchs mit PVC wurde der Einfluss von HNO_3 auf dieses Polymer untersucht. Dabei wurden keine Veränderungen der eingesetzten PVC-Mikropartikel beobachtet. Andere Studien weisen zwar auf einen Einfluss von HNO_3 auf Farbe und Oberfläche (Vergilbung) hin (Dehaut et al., 2016; Roch & Brinker, 2017), eine vollständige Auflösung von PVC-Mikropartikeln durch HNO_3 wurde jedoch bisher nicht beschrieben. Somit ist davon auszugehen, dass die Anzahl der PVC-Mikropartikel in den Muscheln aus dem Laborversuch durch die Aufschlussmethode nicht beeinflusst wurde. Für zukünftige Studien sollte dennoch auf alternative Aufschlussmethoden zurückgegriffen werden, bei denen Gewebe statt mit HNO_3 zum Beispiel mit Enzymen oder schwachen Basen entfernt wird (Catarino et al., 2017; Thiele et al., 2019). Des Weiteren ist grundsätzlich eine Standardisierung der Aufschlussmethoden anzustreben, um eine bessere Vergleichbarkeit von Studienergebnissen zu erreichen (Catarino et al., 2017; Vandermeersch et al., 2015).

Bei der Analyse von Mikroplastik sollte gewährleistet sein, dass synthetische Polymere von natürlichen Partikeln oder Fasern, wie Quarz, Pflanzenteilen, Chitin-Teilchen oder Cellulose sicher unterschieden werden können. Weitgehend ungeeignet erscheint die in frühen Studien häufig angewendete optische Identifizierung mit dem bloßen Auge oder einem optischen Mikroskop (Dris et al., 2018). Es wurde gezeigt, dass eine solche Identifikation meist stark fehlerbelastet ist und umso unsicherer wird, umso kleiner die Partikel sind (Lenz et al., 2015; Song et al., 2015). So ergab eine Studie, dass 20 % aller Partikel kleiner 1 mm, die optisch als Mikroplastik eingeordnet wurden, aus Aluminiumsilikaten bestanden (Eriksen et al., 2013). Weitere Studien stellten bei der optischen Bestimmung von Polymeren Fehlerquoten von bis zu 70 % (Hidalgo-Ruz et al., 2012; Lenz et al., 2015) bei der Identifikation von Fasern sogar von 100 % (Remy et al., 2015) fest.

Als state-of-the-art Methodik zum qualitativen sowie quantitativen Nachweis von Mikroplastik gelten gegenwärtig die Fourier-Transformations-Infrarot- (FTIR, Löder & Gerds 2015; Löder et al. 2015) sowie die Raman-Mikrospektroskopie (Anger et al. 2018; Song et al. 2015). Beide Methoden erlauben eine quantitative Partikelanalyse sowie eine eindeutige Bestimmung der Polymersorte. Allerdings sind auch mit diesen Methoden ermittelte Analyseergebnisse nicht ohne Einschränkung vergleichbar, sondern eher komplementär zu sehen (Cabernard et al., 2018). Anhand der FTIR-Spektroskopie ist derzeit nur eine Identifizierung von Plastikpartikeln bis zu einer minimalen Größe von 20 μm möglich. Die Raman-Mikrospektroskopie eignet sich insbesondere zum sicheren Nachweis sehr kleiner Mikroplastikpartikel von bis zu 1 μm (Käppler et al. 2016; Anger et al. 2018). Während die FTIR-Spektroskopie die Analyse aller Partikel auf einem Probenfilter erlaubt, kann mittels Raman-Mikrospektroskopie im Moment nur ein geringer Anteil der Filterfläche mit einem tragbaren Zeitaufwand analysiert werden. Deshalb werden, wie auch in vorliegender Studie, meist nur kleine Teilbereiche (< 5 % Filterfläche) oder Einzelpartikel evaluiert und diese Teilergebnisse anschließend auf den kompletten Filter extrapoliert (Enders et al., 2015; Lenz et al., 2015; Oßmann et al., 2018). In wieweit Messungen von Teilbereichen repräsentativ sind und statistische Aussagekraft besitzen, hängt unter anderem stark von der Art der Probe und deren Aufbereitung ab (Xu et al., 2019). So sollten Partikel homogen über den Analysefilter verteilt sein, um eine valide Hochrechnung zu ermöglichen. Da dies jedoch mit der momentan gängigen Filtrationstechnik nicht vollständig gewährleistet werden kann, handelt es sich bei den durch Hochrechnung ermittelten Partikelzahlen um Näherungswerte an den tatsächlichen Mikroplastikgehalt einer Probe.

Wenn es darum geht, Partikel unterschiedlicher Polymerzusammensetzung in Umwelt oder Biotaprobennachzuweisen, stellen die genannten spektroskopischen Methoden die Mittel der Wahl dar. Für den Nachweis von PVC-Partikeln wird derzeit am LfU eine Methode entwickelt, die auf einer automatisierten Messung mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) in Verbindung mit Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) beruht. Diese Methode hat den Vorteil, dass die PVC-Mikropartikel ebenso sicher identifiziert werden können, wie mit Raman-Mikrospektroskopie, dies aber bei besserer Auflösung und bei höheren Vergrößerungen. Dadurch können sogar noch kleinere Partikel identifiziert werden. Mit Hilfe einer inzwischen etablierten Automatisierungs-Software ist es möglich, komplette Filter zu analysieren. Eine ähnliche Methodik wurde bereits erfolgreich zur Unterscheidung von Mikroplastik und anorganischen Materialien in Sedimentproben von Fließgewässern (Blair et al., 2019), Oberflächenwasser von Seen (Eriksen et al., 2013) sowie Biota-Proben (Su et al., 2016; Wagner et al., 2017; Wang, Ndungu et al., 2017) eingesetzt.

4.2 Aufnahme und Wirkung von Mikroplastik in Flussmuscheln

4.2.1 Freilandexposition an der Kläranlage Weißenburg

Bisherige Untersuchungen zum Vorkommen von Mikro- und Makroplastik konzentrierten sich in erster Linie auf aus dem Freiland entnommene, marine Muscheln (Abidli et al., 2019; Bråte et al., 2018; Dehaut et al., 2016; Digka et al., 2018; Fang et al., 2019; Fernández Severini et al., 2019; Li et al., 2015; Li et al., 2016; van Cauwenberghe, Devriese et al., 2015; van Cauwenberghe & Janssen, 2014; Webb et al., 2019; Zhao et al., 2018), während Süßwassermuscheln kaum untersucht wurden (Berglund et al., 2019; Su et al., 2016; Su et al., 2018).

In vorliegender Studie wurde exemplarisch an der Kläranlage Weißenburg ein aktives Monitoring mit einheimischen Flussmuscheln (*U. pictorum*) durchgeführt. Dabei wurde je ein Tierkollektiv im gereinigten Abwasser der Kläranlage sowie in der als Vorfluter dienenden Schwäbischen Rezat oberhalb und unterhalb der Kläranlageneinleitung exponiert. Die Untersuchungen ergaben, dass ausschließlich in Abwasser exponierten Muscheln Mikroplastik nachgewiesen wurde. Das lässt darauf schließen, dass im gereinigten Abwasser während der Versuchsphase Mikroplastik vorhanden war und somit von einem Eintrag in die Schwäbische Rezat auszugehen ist. Bei der Mehrzahl dieser Mikropartikel handelte es sich um PVC, einem Polymer, das oft in Kanal- und Abwasserrohrsystemen enthalten ist (Titow, 1984). Ein Zusammenhang zwischen den im Abwasser detektierten PVC-Partikeln und dem Abwasserröhrensystem ist nicht gänzlich auszuschließen. Zur sicheren Klärung der Herkunft der PVC-Mikropartikel und deren Eintragswege in das Abwasser wären weitere Studien erforderlich. Die Tatsache, dass in den unterhalb der Abwassereinleitung in der Schwäbischen Rezat exponierten Flussmuscheln kein Mikroplastik gefunden wurde, spricht dafür, dass die Konzentrationen aufgrund der dort herrschenden Verdünnungsverhältnisse zu gering waren, um von den Muscheln aufgenommen zu werden.

Neben der Höhe der Mikroplastikkonzentration hat auch die Expositionsdauer einen Einfluss auf die Anzahl der in den Muscheln nachgewiesenen Mikroplastikpartikel. Bei der Interpretation der Analysendaten ist zu berücksichtigen, dass für den Nachweis von Kunststoffteilchen größer 50 µm 12,5 % der effektiven Filterfläche, für Partikel kleiner 50 µm hingegen nur 1,8 % der Filterfläche analysiert wurden. Hochgerechnet auf die gesamte Filterfläche wiesen die Muscheln nach einmonatiger Exposition im gereinigten Abwasser der Kläranlage durchschnittlich vier Partikel auf. Nach einer Expositionsdauer von sechs Monaten wurde in den Muscheln mit durchschnittlich 113 Partikeln deutlich mehr Mikroplastik gefunden. Die vier nach einmonatiger Exposition nachgewiesenen Mikroplastikpartikel waren größer als 50 µm. Von den nach sechsmonatiger Exposition detektierten 113 Kunststoffpartikeln waren

zwei Partikel ebenfalls dieser Größenfraktion zuzuordnen. Ein Großteil der Mikroplastikpartikel (111 Partikel) wies allerdings eine Größe von weniger als 50 µm auf.

Vorbehaltlich methodischer Unsicherheiten, insbesondere durch die Hochrechnung der Anzahl analysierter Mikroplastikpartikel auf die effektive Filterfläche, weisen die Befunde darauf hin, dass die Dauer der Exposition einen Einfluss auf die Höhe der aufgenommenen Partikelzahlen hat. In Übereinstimmung mit Befunden anderer Studien (Browne et al. 2008) sprechen die vorliegenden Ergebnisse auch dafür, dass, zumindest bei einer längeren Expositionszeit von 6 Monaten, in erster Linie sehr kleine Partikel mit einer maximalen Ausdehnung von unter 20 µm aufgenommen werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass filtrierende Muscheln aufgrund hochentwickelter Selektionsmechanismen die Partikel aufgrund ihrer geringen Größe aufnehmen und größere Partikel vor der Aufnahme ausselektieren. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass die zu den beiden Untersuchungszeitpunkten in den Muscheln nachgewiesenen, unterschiedlichen Partikelkonzentrationen und Größenverteilungen die jeweils vorliegende Partikelbelastung des Abwassers widerspiegeln.

Muscheln werden im Vollzug der Oberflächengewässerverordnung (OGewV, 2016) zur Überwachung von Umweltqualitätsnormen prioritärer Schadstoffe eingesetzt. In vorliegender Studie wurden Muscheln über definierte Zeiträume als Indikatororganismen exponiert um Mikroplastikbelastungen im gereinigten Abwasser der Kläranlage Weißenburg sowie im Vorfluter Schwäbische Rezat abzubilden. Der Vorteil dieser Vorgehensweise gegenüber stichprobenartigen Untersuchungen von Abwasser- und Gewässerproben besteht darin, dass die Ergebnisse keine Momentaufnahme darstellen, sondern eine höchstwahrscheinlich variierende Belastung über den gesamten Expositionszeitraum darstellen.

4.2.2 Exposition mit PVC-Mikropartikeln unter Laborbedingungen

Für eine Risikobewertung der in Gewässern vorhandenen Mikroplastikkonzentrationen ist entscheidend, ob und in welchem Umfang die Partikel von Organismen aufgenommen werden und ob Mikroplastik im Zuge einer Depurationsphase wieder ausgeschieden werden kann. Ziel vorliegender Studie war darüber hinaus zu ermitteln, in wieweit die aufgenommenen Mikroplastikpartikel schädliche Auswirkungen auf Gewässerorganismen entfalten. Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen wurde eine PVC-Exposition unter Laborbedingungen gewählt, da hierdurch andere, belebte und unbelebte Faktoren, die unter Freilandbedingungen Einfluss auf die Gesundheit der Organismen haben können, ausgeschlossen werden.

Der Expositionsversuch unter Laborbedingungen orientierte sich an der Vorgehensweise und den Ergebnissen des Freilandversuches. Als Testorganismen wurde ebenfalls eine Flussmuschelart (*U. tumidus*) verwendet. Als Testmaterial wurde PVC ausgewählt, da dieses Polymer sowohl im Ablauf der Kläranlage Weißenburg (Domogalla-Urbansky et al. 2018), als auch in bayerischen Flüssen und Seen (Heß et al. 2018, Schwaiger 2019) zu den am häufigsten detektierten Kunststoffen zählt. Da filtrierende Muscheln Partikel bestimmter Eigenschaften präferieren (Ward et al. 2019), wurden die Tiere PVC-Mikropartikeln verschiedener Größe und Form ausgesetzt, wobei ein Großteil der im Versuch eingesetzten Partikel eine Größe von 5 µm und kleiner aufwies. Des Weiteren wurde berücksichtigt, dass sowohl der Expositionszeitdauer als auch der eingesetzten Mikroplastikkonzentration möglicherweise eine entscheidende Rolle hinsichtlich der aufgenommenen Menge an Mikroplastik und der daraus resultierenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen zukommt. So wurden die Muscheln in Aquarien über vier Wochen definierten PVC-Konzentrationen zwischen 50 ng–50 µg PVC/l Aquarienwasser ausgesetzt. Dabei entsprach die niedrigste der eingesetzten Konzentrationen (50 ng PVC/l) in etwa einer Partikelzahl von 1.760 Partikeln/m³ und lag damit nur um zwei Größenordnungen über den, in der Wasserphase bayerischer Flüsse und Seen ermittelten Partikelzahlen (Heß et al. 2018, Schwaiger 2019). Die höchste Konzentration (50 µg PVC/l) hingegen lag bei etwa 1,76 Mio. Partikeln/m³. Zudem ist zu berücksichtigen, dass es aufgrund der bisher praktizierten Probenahmetechnik am Gewässer mit Netzen oder Sieben mit

einer Maschenweite von 300 µm in der Regel zu einer deutlichen Unterschätzung der tatsächlichen Partikelzahlen kommt. Im internationalen Vergleich kommt sowohl der Testkonzentration von 50 ng/l als auch 500 ng/l eine Umweltrelevanz zu. So wurden in Wasserproben chinesischer Seen Partikelzahlen zwischen 1.660 (Su et al. 2016) und 15.000 Partikel/m³ (Wang, Ndungu et al., 2017) detektiert.

Ein weiterer Schwerpunkt der Studie war, zu untersuchen, ob von Muscheln aufgenommenes Mikroplastik akkumuliert oder wieder abgegeben wird. Deshalb schloss sich an die vierwöchige Mikroplastik-Exposition eine Depurationsphase an, in der die Tiere in PVC-freiem Quellwasser gehalten wurden.

4.2.2.1 Mikroplastik-Aufnahme und Depuration

Eine Analyse von PVC-Mikropartikeln mittels Raman-Spektroskopie wurde an Muscheln, die der höchsten Partikelkonzentration von 50 µg PVC/l ausgesetzt waren, durchgeführt. Wie bei der Freilandstudie (4.4.1) wurde auch im Laborversuch zwischen den Größenklassen größer bzw. kleiner 50 µm differenziert. Ebenso ist auch bei der Interpretation der Analysendaten zu berücksichtigen, dass für den Nachweis von Kunststoffteilchen größer 50 µm 12,5 % der effektiven Filterfläche, für Partikel kleiner 50 µm hingegen 1,8 % der Filterfläche analysiert wurden.

Es zeigte sich, dass eine vierwöchige Exposition zur Aufnahme von PVC-Mikropartikeln in Flussmuscheln führt. So wurden nach diesem Zeitraum, hochgerechnet auf die effektive Filterfläche, 5056 ± 3000 PVC-Mikropartikel der Größenklasse kleiner 50 µm, sowie 1.064 ± 360 PVC-Mikropartikel größer 50 µm identifiziert. Nach acht Wochen wurden hochgerechnet nur noch 111 ± 56 Partikel kleiner 50 µm sowie 24 ± 16 Partikel größer 50 µm aus PVC nachgewiesen.

Die Muscheln nahmen somit deutlich mehr Partikel kleiner 50 µm als größer 50 µm auf. Dies ist zum einen damit zu erklären, dass ein Großteil der im Versuch eingesetzten Partikel eine Größe von 50 µm und kleiner aufwies, sodass die Muscheln überproportional häufig mit Partikeln dieser Größenklasse in Kontakt waren. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass Muscheln bevorzugt Partikel dieser Größe aufnehmen (Browne et al. 2008). Nach anschließender, vierwöchiger Hälterung der Muscheln in Quellwasser, ohne Zugabe von PVC, wurden in den Tieren vergleichsweise wenige PVC-Mikropartikel detektiert.

Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen an meist marinen, für den menschlichen Verzehr kultivierten Muschelarten. So wurde beispielsweise in Gemeinen Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) und Pazifischen Austern (*Magallana gigas*) nach Ingestion von Mikroplastik bereits nach dreitägiger Exposition in Mikroplastik-freiem Wasser eine circa 30-prozentige Abnahme der Partikelanzahl beobachtet (van Cauwenberghe & Janssen, 2014). Eine andere, ebenfalls an Pazifischen Austern durchgeführte Studie ergab nach dreitägiger Depurationsphase sogar eine knapp 85-prozentige Mikroplastik-Abnahme (Graham et al., 2019). Andere Untersuchungen an Gemeinen Miesmuscheln und Mittelmeer-Miesmuscheln (*Mytilus galloprovincialis*) zeigten, dass diese nicht nur Partikel, sondern auch Mikroplastik-Fasern wieder abgegeben können (Fernández & Albentosa, 2019; Gonçalves et al., 2019; Kolandhasamy et al., 2018; Woods et al., 2018).

Einen Unterschied gibt es möglicherweise zwischen kultivierten und wilden Muscheln. So lag die Ausscheidungsrate innerhalb von 93 Stunden bei kultivierten Schinkenmuscheln (*Perna perna*) mit 28,95 % etwas niedriger als bei wildlebenden Individuen (46,79 %) (Birnstiel et al., 2019). Auch für die Quagga-Dreikantmuschel (*Dreissena rostriformis bugensis*), eine Süßwassermuschelart, wurde gezeigt, dass Mikroplastik in Form fluoreszierender PS-Partikel wieder abgegeben wird. Allerdings wurden auch hier nach Monaten immer noch Partikel in und an den Muscheln gefunden (Merzel et al., 2019).

Die Befunde sprechen dafür, dass in Übereinstimmung mit anderen Studien (z. B. Ribeiro et al., 2017) Muscheln Mikroplastik aufnehmen, dass aber ein großer Prozentsatz der Partikel in einer Depurationsphase wieder abgegeben wird. Sehr wenige Partikel können jedoch auch für längere Zeit in den Tieren verbleiben. Dadurch ist nicht auszuschließen, dass sich in den Partikeln enthaltene Additive oder an der Oberfläche adsorbierte organische Stoffe lösen und gegebenenfalls Wirkungen bei Gewässerorganismen entfalten (Schrank et al., 2019).

4.2.2.2 Pathologische Anatomie und Histopathologie

Generell wiesen die Tiere einen guten Ernährungszustand auf. Pathologisch-anatomische Befunde, wie zum Beispiel Auflagerungen auf dem Periostracum, der Perlmuttertschicht oder den Kiemen traten gelegentlich sowohl bei PVC-exponierten Muscheln als auch bei Kontrolltieren auf und werden als Nebenbefunde gewertet. Die Mortalitätsrate war in allen Gruppen sehr gering.

Bei Einhaltung eines entsprechenden Qualitätsstandards und unter Voraussetzung, dass die Befunderhebung durch erfahrene Pathologen erfolgt, ist die Histopathologie eine gut geeignete Methode, um Gewebsläsionen unterschiedlicher Genese zu detektieren. Auch endokrine oder toxische Wirkungen von Additiven (Flammschutzmittel, Farbstoffe, Weichmacher, etc.) können zum Teil durch eine histopathologische Untersuchung von Zielorganen erfasst und gegebenenfalls durch Untersuchungsergebnisse zu klinisch-chemischen Parametern und Biomarkern ergänzt und bestätigt werden.

Die histopathologischen Untersuchungen in vorliegender Studie an Flussmuscheln konzentrierten sich auf die Mitteldarmdrüse, einem im Rahmen ökotoxikologischer Studien an Muscheln häufig untersuchten Zielorgan (Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003).

Die diagnostizierten Alterationen beschränkten sich auf vereinzelte, entzündliche Reaktionen sowohl bei PVC-exponierten Muscheln als auch bei Kontrollindividuen, die vermutlich auf einen Parasitenbefall mit Trematodenlarven zurückzuführen sind. Dies ist für die im Versuch eingesetzten Flussmuscheln nicht ungewöhnlich, da sie obligate Zwischenwirte von Digenea, einer Unterklasse der Trematoden sind (Petkevičiūtė et al., 2014). Die Versuchsmuscheln wurden aus einer Zuchtanlage im Halbfreiland bezogen, wo diese Parasiten vermutlich auch vorkommen. In den histologischen Schnitten der Mitteldarmdrüse wurden weder Strukturen identifiziert, die im Sinne von PVC-Mikropartikeln zu interpretieren sind, noch wurden Zell- oder Gewebeveränderungen beobachtet, die sich auf die PVC-Exposition zurückführen lassen. Somit sprechen die aktuellen Befunde gegen eine Translokation von PVC-Partikeln aus dem Verdauungstrakt in die Mitteldarmdrüse. Auch in anderen, methodisch ähnlichen Studien, in denen auch oft sehr kleine Mikroplastik-Partikel eingesetzt wurden, wurde kein Übergang von Mikroplastik ins Gewebe beobachtet. So wiesen beispielsweise Sussarellu et al. (2016) in Austern nach achtwöchiger Exposition in PS-Partikeln mit einem Durchmesser von 2 und 6 µm in einer Konzentration von 0,023 mg/l ausschließlich in den Lumina von Magen und Darm PS-Partikel nach, nicht jedoch in den Zellen der Mitteldarmdrüse. Paul-Pont et al. (2016) detektierten PS-Partikel nach siebentägiger Exposition ausschließlich in Schleimauflagerungen der Kiemen sowie im Lumen des Verdauungstraktes.

Im Gegensatz dazu wiesen Untersuchungen an Miesmuscheln auf eine Translokation von Polyethylen in das Muschelgewebe hin (Moos et al. 2012). Als Aufnahmepfad wurde unter anderem eine, bereits in den 70iger Jahren beschriebene Aufnahme aus dem Magen über die Epithelzellen der Mitteldarmdrüse (Mathers, 1972) diskutiert. Auch andere Untersuchungen ergaben eine Translokation von Mikroplastik in das Darmepithel oder die Hämolymphe (Avio, Gorbi, Milan et al., 2015; Browne et al., 2008; Magni et al., 2018; Ribeiro et al., 2017; Scanes et al., 2019; Sendra et al., 2019). Zudem wurden durch Mikroplastik hervorgerufene Schädigungen im Bereich der Epithelien von Gastrointestinaltrakt und Kiemen sowie entzündliche Veränderungen beschrieben (Paul-Pont et al., 2016; Sikdokur et al., 2020; Song et al., 2019).

Prinzipiell sind somit durch Mikroplastik-Partikel verursachte, vielfältige histopathologische Veränderungen bei Muscheln denkbar. Die in vorliegender Studie durchgeführten Untersuchungen der Mitteldarmdrüse von Muscheln, die der höchsten PVC-Konzentrationen von 50 µg/l ausgesetzt waren, ergaben jedoch keinerlei Hinweise auf histopathologische Alterationen.

4.2.2.3 Klinische Chemie und Biomarker

Anhand von Biomarkern und klinisch-chemischen Parametern lassen sich physiologische und biochemische Prozesse in Organismen messen. Die Ergebnisse haben prognostische und diagnostische Aussagekraft und können als Indikatoren für Umweltbelastungen herangezogen werden. Die Parameter bilden entweder unspezifische Wirkungen ab oder reagieren sehr spezifisch auf eine Einwirkung von Stoffen oder Stoffgruppen (Tsangaris et al., 2010). Da bisher noch wenig zur Wirkungsweise zu Wirkmechanismen von Mikroplastik auf Muscheln bekannt ist, wurde in vorliegender Studie eine Vielzahl von Parametern untersucht, um eine umfassende Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustandes der Muscheln zu ermöglichen und gegebenenfalls eine Beeinträchtigung durch PVC-Mikropartikel aufzuzeigen.

Auch wenn die Anzahl von Studien sowohl an marinen (Aouini et al., 2018; Blasco et al., 1993; Blasco & Puppo, 1999) als auch an Süßwassermuscheln (Cossu et al., 2000; Newton & Cope, 2007) zunimmt, in denen Biomarker zum Einsatz kommen, ist zu berücksichtigen, dass es nur für wenige der Parameter an Muscheln angepasste Methoden gibt. Insbesondere klinisch-chemische Untersuchungsergebnisse variieren in Abhängigkeit von der Spezies, dem Geschlecht sowie dem Alter der Tiere (Fritts, Peterson, Wisniewski et al., 2015; Zilberberg et al., 2011), sodass eine Interpretation der Ergebnisse oft schwierig ist.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse lassen unabhängig davon, ob Kiemen, Mitteldarmdrüse oder Mantelgewebe untersucht wurde, für die meisten Parameter keine Veränderungen erkennen, die auf eine PVC-Exposition zurückzuführen sind. Teilweise werden Reaktionsmuster sichtbar, die jedoch nicht mit der Höhe der eingesetzten PVC-Konzentrationen korrelieren.

Die Untersuchungsergebnisse weisen jedoch auf eine Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels der Muscheln hin. So enthielt die Muschelgruppe, die vier Wochen der höchsten PVC-Konzentration von 50 µg/l ausgesetzt war, signifikant weniger Glykogen im Mantelgewebe als die Kontrolltiere. Auch war das Mantelgewicht im Durchschnitt signifikant geringer als das der Kontrollmuscheln. Ein gegenteiliger Trend wurde für die Glucose beobachtet. Die durchschnittliche Glucose-Konzentration war nach vierwöchiger Exposition in den Muscheln am höchsten, die der höchsten PVC-Konzentration ausgesetzt waren. Bei der Interpretation der Glucose-Werte ist zu beachten, dass diese stark durch einzelne Extremwerte beeinflusst wurden und insgesamt eine starke Streuung aufwiesen. Die Ergebnisse sind jedoch plausibel, da sie generelle Rückkopplungsmechanismen des Glykogen-Glucose-Metabolismus widerspiegeln. Dabei dient Glucose als Hauptenergiequelle, während Glykogen das vornehmliche Speichermolekül darstellt. Fällt bei Muscheln unter belastenden Bedingungen die Glucose-Konzentration ab (Haag et al., 1993; Patterson et al., 1999), wird durch den Katabolismus des Speicherstoffes Glykogen Glucose mobilisiert (de Zwaan, 1983). Wie in vorliegendem Versuch, wurden auch in anderen Studien in der Folge abnehmende Glykogen-Konzentrationen im Gewebe beschrieben (Fritts, Peterson, Hazelton et al., 2015).

Eine Beeinflussung der Ernährungsphysiologie wurde auch in einer, hauptsächlich in Korea und China als Nahrungsmittel genutzten Muschel (*Mytilus coruscus*) nach Exposition in PS-Partikeln beobachtet (Wang et al. 2019). In der Studie waren klassische Verdauungsenzyme wie Pepsin, Lipase, Trypsin und Alpha-Amylase signifikant inhibiert, während Parameter, die durch oxidativem Stress beeinflusst werden (GPx und Superoxide-Dismutase), nicht verändert waren.

Die in der aktuellen Studie nach PVC-Exposition beobachteten Veränderungen von Parametern des Kohlenhydratstoffwechsels beschränkten sich auf das Mantelgewebe, während die in der Mitteldarmdrüse gemessenen Parameter nicht beeinflusst wurden. Eine gewebespezifische Reaktion ist in Muscheln nicht ungewöhnlich. Détrée & Gallardo-Escárate (2017) zeigten nach Exposition von Mittelmeer-Miesmuscheln mit PE-Microbeads je nach untersuchtem Gewebe verschiedene Transkriptionsmuster von Genen, die an Funktionen des Kohlenhydratstoff-Stoffwechsels, des Immunsystems sowie an Apoptose beteiligt sind. So ähnelten sich die Ergebnisse von Mitteldarmdrüse und Mantel, während in Kiemen und Hämolymphe andere Reaktionsmuster beobachtet wurden.

In der Literatur finden sich sehr widersprüchliche Angaben dazu, in wieweit Mikroplastik zu Veränderungen bei Muscheln führt. Zum Teil wurden negative, von Mikroplastik ausgelöste Effekte beschrieben (Xu et al., 2020), während in anderen Studien kaum oder keinerlei Unterschiede zwischen Kontrollgruppen und Mikroplastik-exponierten Tieren ermittelt wurden (Li et al., 2020; Magni et al., 2018; Santana et al., 2018). Diese Studien zeigen darüber hinaus, dass auch Gewebeart sowie Entwicklungsstadium und Geschlecht der eingesetzten Organismen die Ergebnisse beeinflussen. Zudem darf Mikroplastik nicht undifferenziert als uniformer „Schadstoff“ betrachtet werden. Neben der Polymerorte und den gegebenenfalls enthaltenen Additiven sowie der Partikelkonzentration und -form können auch noch andere Eigenschaften des verwendeten Mikroplastik Effekte in Versuchstieren hervorrufen (Kögel et al., 2019; Xu et al., 2020).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Exposition von Flussmuscheln in hohen Konzentrationen von PVC-Mikropartikeln einen ähnlichen Einfluss auf ausgewählte ernährungsphysiologische Parameter hat, wie auch andere, für Muscheln ungünstige Lebensbedingungen. Dazu zählen zum Beispiel Nahrungskarenz oder ein Befall mit *Dreissena polymorpha* (Haag et al., 1993; Patterson et al., 1999). Die tendenziell erhöhte HSP70-Konzentration bei Tieren, die der höchsten PVC-Konzentration ausgesetzt waren, deutet auf eine allgemeine Stressreaktion hin. Unklar bleibt allerdings, ob dieser unspezifische Effekt durch das PVC selbst (Romano et al., 2018; Xia et al., 2020), darin enthaltene Additive (Schrank et al., 2019), oder durch andere, mit der partikulären Belastung des Wassers einhergehende Veränderungen, wie zum Beispiel der Trübung des Wassers hervorgerufen wurde. Ein solcher, sogenannter Partikel-Effekt wurde ebenfalls als Auslöser für einen Glykogen-Abfall beschrieben (Patterson et al., 1999). Der Grund dafür ist, dass manche Muschelarten in solchen Fällen die Filtration herabsetzen und mit zunehmender Menge an suspendierten Feststoffen die Schale sogar komplett schließen und die Filtration einstellen (Wilber & Clarke, 2001). Andere Muschelarten filtrieren zwar weiter, nehmen aber durch den fehlenden Nährwert der Kunststoffpartikel weniger Energie auf beziehungsweise müssen Energie darauf verwenden diese Partikel wieder abzugeben. In beiden Fällen entstehen Energiedefizite, sodass die Glykogen-Reserven zur Aufrechterhaltung der Körperfunktionen verbraucht werden.

Somit ist nicht auszuschließen, dass die in vorliegender Studie beobachteten, Mikroplastik-bedingten Veränderungen bei Muscheln im freien Gewässer auch durch andere Faktoren induziert werden. So können Effekte, die in aktuellen ökotoxikologischen Studien auf eine Einwirkung von Mikroplastik zurückgeführt werden, auch durch natürliche, in Gewässern vorhandene Partikel, wie zum Beispiel Lehm, Ton und Quarzsand ausgelöst werden (Ogonowski et al. 2018).

Die beobachteten Effekte traten unter den gegebenen Expositionsbedingungen nur in PVC-Konzentrationen auf, die ein Vielfaches über den in Gewässern detektierten Konzentrationen von PVC-Partikeln oder Mikroplastik allgemein lagen. Allerdings lag die Expositionsdauer bei nur vier Wochen, während Muscheln in ihrer natürlichen Umgebung unter Umständen dauerhaft einer Mikroplastikbelastung ausgesetzt sind. Für eine Bewertung der Umweltkonzentrationen ist zudem zu berücksichtigen, dass Muscheln im Gewässer einer Vielzahl anthropogener Einflüsse, wie zum Beispiel chemischen Verbindungen

dungen, Krankheitserregern und klimatischen Faktoren ausgesetzt sind. Unter ungünstigen Umweltbedingungen ist nicht auszuschließen, dass ein zusätzliches, z. B. durch Mikroplastik ausgelöstes Energiedefizit mit zu einer Beeinträchtigung des allgemeinen Gesundheitszustandes von Muscheln beitragen kann.

5 Zusammenfassung

Bayern ist momentan das einzige Bundesland, in dem von Behördenseite systematische Studien zum Vorkommen und möglichen Auswirkungen von Mikroplastik auf aquatische Lebewesen durchgeführt werden. Der vorliegende Bericht liefert erstmals Daten sowohl zur Aufnahme und Wiederabgabe als auch zur Wirkung von Mikroplastik auf einheimische Flussmuscheln.

Zur Ermittlung einer potenziellen Aufnahme von Mikroplastik durch Flussmuscheln wurden zwei unterschiedliche Expositionsszenarien gewählt. In einem realitätsnahen Freilandversuch wurde exemplarisch an der Kläranlage Weißenburg ein aktives Monitoring mit Flussmuscheln (*U. pictorum*) über einen Zeitraum von einem sowie sechs Monaten durchgeführt. Dabei wurden die Tiere sowohl im gereinigten Abwasser der Kläranlage als auch in der als Vorfluter dienenden Schwäbischen Rezat oberhalb und unterhalb der Kläranlageneinleitung gehalten. Anhand der Raman-Spektroskopie wurde ausschließlich in Muscheln, die direkt im gereinigten Abwasser der Kläranlage exponiert wurden, Mikroplastik nachgewiesen. Dabei handelte es sich zum Großteil um PVC-Mikropartikel kleiner 50 µm. Die Anzahl der Partikel nahm mit steigender Expositionsdauer zu. So wurden in Muscheln nach einmonatiger Exposition durchschnittlich weniger Mikroplastik (4 Partikel) detektiert, als nach sechsmonatiger Exposition (113 Partikel). Insgesamt wurden jedoch deutlich mehr Partikel detektiert, bei denen es sich nicht um Mikroplastik, sondern beispielsweise um natürliche Partikel handelte. In den oberhalb und unterhalb des Kläranlagenablaufs im Gewässer exponierten Muscheln waren keine Mikroplastik-Partikel nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass hier die Konzentration von Mikroplastik zum Zeitpunkt der Exposition aufgrund der Verdünnungsverhältnisse in der Schwäbischen Rezat zu gering war, um von den Muscheln aufgenommen zu werden.

In einem zweiten Versuch wurden Muscheln unter standardisierten Laborbedingungen für vier Wochen PVC-Mikropartikeln unterschiedlicher Größe in Konzentrationen zwischen 50 ng/l und 50 µg/l ausgesetzt. Anschließend wurden die Tiere in einer Depurationsphase für weitere vier Wochen ohne Zusatz von PVC in Quellwasser gehalten. Ein Nachweis von Mikroplastik erfolgte ebenfalls anhand der Raman-Spektroskopie in Muscheln, die der höchsten Partikelkonzentration von 50 µg PVC/l ausgesetzt waren. Auch in dieser Studie wurde eine Aufnahme von PVC-Mikropartikeln in den Muscheln beobachtet. Nach weiteren vier Wochen in PVC-freiem Wasser wurden in den Tieren deutlich weniger PVC-Mikropartikel detektiert. Diese Beobachtung spricht dafür, dass Muscheln bereits aufgenommene PVC-Mikropartikel auch wieder abgeben können.

Der Laborversuch hatte darüber hinaus zum Ziel, mögliche Auswirkungen von PVC-Mikropartikeln auf den Gesundheitszustand der Muscheln zu erfassen. Hierzu wurden in Kiemen, Mitteldarmdrüse und Mantel von Tieren aller Testkonzentrationen sowie Kontrolltieren sowohl nach ein- und vierwöchiger PVC-Exposition sowie am Ende der Depurationsphase verschiedene klinisch-chemische Parameter sowie Biomarker analysiert. An Tieren, die der höchsten Test-Konzentration ausgesetzt waren, erfolgte zudem eine pathologisch-anatomische Untersuchung sowie eine histopathologische Beurteilung der Mitteldarmdrüse.

Aufgrund der klinisch-chemischen Analysenergebnisse ist von einer geringgradigen Beeinflussung des Kohlenhydrat-Stoffwechsels der Muscheln auszugehen. So nahmen die Konzentrationen des Speicherstoffs Glykogen im Muschelmantel mit steigender PVC-Konzentration ab, während gleichzeitig die Glucose-Konzentrationen tendenziell zunahm. Es ist zu vermuten, dass diese Veränderungen auf ein Energie-Defizit zurückzuführen sind. Dieser Zustand beruht möglicherweise darauf, dass die Muscheln teilweise anstatt Nahrung Mikroplastik-Partikel und damit weniger Nährstoffe aufgenommen haben. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass sich die Tiere, bedingt durch die hohe Partikel-Exposition, in einer allgemeinen Stresssituation befanden und dadurch entweder weniger Nah-

zung zu sich nahmen oder einen erhöhten Energiebedarf aufwiesen. Für das Vorliegen einer unspezifischen Stresssituation sprechen auch die tendenziell erhöhten Konzentrationen von HSP70 bei Tieren der höchsten PVC-Testkonzentration. Darüber hinaus wurden keine weiteren Effekte beobachtet, die direkt oder indirekt auf die PVC-Exposition zurückzuführen waren.

Die beobachteten Veränderungen traten unter den gegebenen Expositionsbedingungen nur in PVC-Konzentrationen auf, die ein Vielfaches über den in Gewässern nachgewiesenen Konzentrationen von PVC-Mikropartikeln lagen. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass im Falle einer dauerhaften Mikroplastik-Belastung eines Gewässers auch niedrigere Konzentrationen zu einem Energiedefizit bei Muscheln führen können. In Kombination mit weiteren, ungünstigen Umweltbedingungen kann dies unter Umständen zu einer Reduzierung des Allgemeinzustandes der Muscheln führen.

6 Literaturverzeichnis

- Abidli, S., Lahbib, Y., & Trigui El Menif, N. (2019). Microplastics in commercial molluscs from the lagoon of Bizerte (Northern Tunisia). *Marine Pollution Bulletin*, 142, 243–252.
- Adam, V., Yang, T., & Nowack, B. (2019). Toward an ecotoxicological risk assessment of microplastics: Comparison of available hazard and exposure data in freshwaters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(2), 436–447.
- Anbumani, S., & Kakkar, P. (2018). Ecotoxicological effects of microplastics on biota: A review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(15), 14373–14396.
- Anger, P. M., Esch, E. von der, Baumann, T., Elsner, M., Niessner, R., & Ivleva, N. P. (2018). Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 109, 214–226.
- Aouini, F., Trombini, C., Volland, M., Elcafsi, M., & Blasco, J. (2018). Assessing lead toxicity in the clam *Ruditapes philippinarum*: Bioaccumulation and biochemical responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 193–203.
- Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., & Regoli, F. (2015). Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198, 211–222.
- Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 111, 18–26.
- Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2014). Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environmental Pollution*, 185, 16–23.
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1526), 1985–1998.
- Baumann, L., Schmidt-Posthaus, H., Segner, H., & Wolf, J. C. (2016). Comment on "Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver". *Environmental Science & Technology*, 50(22), 12521–12522.
- Berglund, E., Fogelberg, V., Nilsson, P. A., & Hollander, J. (2019). Microplastics in a freshwater mussel (*Anodonta anatina*) in Northern Europe. *Science of the Total Environment*, 134192.
- Bergmann, M., Gutow, L., & Klages, M. (Eds.). (2015). *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing.
- Bertling, J., Bertling, R., & Hamann, L. (2018). *Kunststoffe in der Umwelt: Mikro- und Makroplastik: Ursachen, Mengen, Umweltschicksale, Wirkungen, Lösungsansätze, Empfehlungen*. Oberhausen. Fraunhofer-Institut für Umwelt-, Sicherheits- und Energietechnik UMSICHT.
- Bertling, J., Hamann, L., & Hiebel, M. (2018). *Mikroplastik und synthetische Polymere in Kosmetikprodukten sowie Wasch-, Putz- und Reinigungsmitteln*. Oberhausen. Fraunhofer-Institut für Umwelt-, Sicherheits- und Energietechnik UMSICHT.
- Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E. M., van den Heuvel-Greve, M. J., & Koelmans, A. A. (2013). Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environmental Science & Technology*, 47(1), 593–600.
- Bignell, J. P., Stentiford, G. D., Taylor, N. G. H., & Lyons, B. P. (2011). Histopathology of mussels (*Mytilus* sp.) from the Tamar estuary, UK. *Marine Environmental Research*, 72(1-2), 25–32.
- Birnstiel, S., Soares-Gomes, A., & da Gama, B. A. P. (2019). Depuration reduces microplastic content in wild and farmed mussels. *Marine Pollution Bulletin*, 140, 241–247.
- Blair, R. M., Waldron, S., Phoenix, V. R., & Gauchotte-Lindsay, C. (2019). Microscopy and elemental analysis characterisation of microplastics in sediment of a freshwater urban river in Scotland, UK. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(12), 12491–12504.

- Blasco, J., & Puppo, J. (1999). Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 122(2), 253–263.
- Blasco, J., Puppo, J., & Sarasquete, C. (1993). Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Biology*, 115(1), 113–118.
- Bråte, I. L. N., Hurley, R., Iversen, K., Beyer, J., Thomas, K. V., Steindal, C. C., Green, N. W., Olsen, M., & Lusher, A. (2018). *Mytilus* spp. As sentinels for monitoring microplastic pollution in Norwegian coastal waters: A qualitative and quantitative study. *Environmental Pollution*, 243(Pt A), 383–393.
- Bretas Alvim, C., Mendoza-Roca, J. A., & Bes-Piá, A. (2020). Wastewater treatment plant as microplastics release source – Quantification and identification techniques. *Journal of Environmental Management*, 255, 109739.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5026–5031.
- Busse, L., & Rechenberg, B. (2019). *Kunststoffe in der Umwelt*. Dessau-Roßlau. Umweltbundesamt (UBA).
- Cabernard, L., Roscher, L., Lorenz, C., Gerdt, G., & Primpke, S. (2018). Comparison of Raman and Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Quantification of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environmental Science & Technology*, 52(22), 13279–13288.
- Capolupo, M., Sørensen, L., Jayasena, K. D. R., Booth, A. M., & Fabbri, E. (2020). Chemical composition and ecotoxicity of plastic and car tire rubber leachates to aquatic organisms. *Water Research*, 169, 115270.
- Carpenter, E. J., Anderson, S. J., Harvey, G. R., Miklas, H. P., & Peck, B. B. (1972). Polystyrene spherules in coastal waters. *Science*, 178(4062), 749–750.
- Catarino, A. I., Thompson, R., Sanderson, W., & Henry, T. B. (2017). Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(4), 947–951.
- Chen, L.-Y., Heath, A. G., & Nevas, R. (2001). An Evaluation of Air and Water Transport of Freshwater Mussels (*Bivalvia: Unionidae*). *American Malacological Bulletin*, 16(147-154).
- Chen, Y., Ling, Y., Li, X., Hu, J., Cao, C., & He, D. (2020). Size-dependent cellular internalization and effects of polystyrene microplastics in microalgae *P. helgolandica* var. *tsingtaoensis* and *S. quadricauda*. *Journal of Hazardous Materials*, 399, 123092.
- Choi, J. S., Hong, S. H., & Park, J.-W. (2019). Evaluation of microplastic toxicity in accordance with different sizes and exposure times in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Marine Environmental Research*, 104838.
- Claessens, M., van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2013). New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1-2), 227–233.
- Cole, M., & Galloway, T. S. (2015). Ingestion of Nanoplastics and Microplastics by Pacific Oyster Larvae. *Environmental Science & Technology*, 49(24), 14625–14632.
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2014). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports*, 4, 4528.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., & Vasseur, P. (2000). Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(2), 106–121.
- Courtene-Jones, W., Quinn, B., Murphy, F., Gary, S. F., & Narayanaswamy, B. E. (2017). Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Anal. Methods*, 9(9), 1437–1445.
- CUSABIO. (2018a). Fish Glutathione Peroxidase (GSH-PX) ELISA kit. <https://www.cusabio.com/uploadfile/Ins/2018-08-13/CSB-E15930Fh.pdf>

- CUSABIO. (2018b). Fish Heat Shock Protein 70 (HSP-70) ELISA Kit. <https://www.cusabio.com/uploadfile/Ins/2018-08-20/CSB-E16327Fh.pdf>
- Dailianis, S. (2011). Environmental impact of anthropogenic activities: The use of mussels as a reliable tool for monitoring marine pollution. In *Mussels: Anatomy, Habitat and Environmental Impact*. (ed. L. E. McGevin), Chapter 17, pp. 43–72. Nova Sciences Publishers Inc. New York
- Davenport, J., & Chen, X. (1987). A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal of Molluscan Studies*, 53(3), 293–297.
- de Zwaan, A. (1983). Carbohydrate catabolism in bivalves. In *The Mollusca*, Vol. 1, *Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics* (ed. P. W. Hochachka), pp. 137–175. Academic Press.
- Dehaut, A., Cassone, A.-L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., & Paul-Pont, I. (2016). Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, 215, 223–233.
- Détrée, C., & Gallardo-Escárate, C. (2017). Polyethylene microbeads induce transcriptional responses with tissue-dependent patterns in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Molluscan Studies*, 83(2), 220–225.
- Digka, N., Tsangaris, C., Torre, M., Anastasopoulou, A., & Zeri, C. (2018). Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 30–40.
- Dioses-Salinas, D., Pérez-Baca, B., & De-la-Torre, G. (2019). Ecotoxicological effects of microplastics and adsorbed contaminants on aquatic organisms. *Manglar*, 16(2), 173–182.
- Domogalla-Urbansky, J., Anger, P. M., Ferling, H., Rager, F., Wiesheu, A. C., Niessner, R., Ivleva, N. P., & Schwaiger, J. (2018). Raman microspectroscopic identification of microplastic particles in freshwater bivalves (*Unio pictorum*) exposed to sewage treatment plant effluents under different exposure scenarios. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 2007–2012.
- Dris, R., Imhof, H. K., Löder, M. G.J., Gasperi, J., Laforsch, C., & Tassin, B. (2018). Microplastic Contamination in Freshwater Systems: Methodological Challenges, Occurrence and Sources. In *Microplastic Contamination in Aquatic Environments* (pp. 51–93). Elsevier.
- Duis, K., & Coors, A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: Sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe*, 28(2), 1–25.
- Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C. A., & Nielsen, T. G. (2015). Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10\mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 70–81.
- Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H., & Amato, S. (2013). Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1-2), 177–182.
- Fang, C., Zheng, R., Chen, H., Hong, F., Lin, L., Lin, H., Guo, H., Bailey, C., Segner, H., Mu, J., & Bo, J. (2019). Comparison of microplastic contamination in fish and bivalves from two major cities in Fujian province, China and the implications for human health. *Aquaculture*, 512, 734322.
- Farrell, P., & Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, 177, 1–3.
- Faure, F., Corbaz, M., Baecher, H., & Alencastri, L. F. de (2012). Pollution due to plastics and microplastics in lake Geneva and in the Mediterranean sea. *Archives Des Sciences*, 2012(65), 157–164.
- Fendall, L. S., & Sewell, M. A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin*, 58(8), 1225–1228.
- Fernández, B., & Albentosa, M. (2019). Insights into the uptake, elimination and accumulation of microplastics in mussel. *Environmental Pollution*, 249, 321–329.
- Fernández Severini, M. D., Villagran, D. M., Buzzi, N. S., & Sartor, G. C. (2019). Microplastics in oysters (*Crassostrea gigas*) and water at the Bahía Blanca Estuary (Southwestern Atlantic): An emerging issue of global concern. *Regional Studies in Marine Science*, 32, 100829.
- Fischer, I., Schmitt, W. F., Porth, H.-C., Allsopp, M. W., & Vianello, G. (2000). Poly(Vinyl Chloride). In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (pp. 1–30). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Frias, J. P. G. L., & Nash, R. (2019). Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*, 138, 145–147.
- Fritts, A. K., Peterson, J. T., Hazelton, P. D., Bringolf, R. B., & MacLatchey, D. (2015). Evaluation of methods for assessing physiological biomarkers of stress in freshwater mussels. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 72(10), 1450–1459.
- Fritts, A. K., Peterson, J. T., Wisniewski, J. M., Bringolf, R. B., & MacLatchey, D. (2015). Nonlethal assessment of freshwater mussel physiological response to changes in environmental factors. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 72(10), 1460–1468.
- Fu, D., Zhang, Q., Fan, Z., Qi, H., Wang, Z., & Peng, L. (2019). Aged microplastics polyvinyl chloride interact with copper and cause oxidative stress towards microalgae *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 216, 105319.
- Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., & Vrees, L. de (2013). Marine litter within the European Marine Strategy Framework Directive. *ICES Journal of Marine Science*, 70(6), 1055–1064.
- Gardon, T., Reisser, C., Soye, C., Quillien, V., & Le Moullac, G. (2018). Microplastics Affect Energy Balance and Gametogenesis in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. *Environmental Science & Technology*, 52(9), 5277–5286.
- Gonçalves, C., Martins, M., Sobral, P., Costa, P. M., & Costa, M. H. (2019). An assessment of the ability to ingest and excrete microplastics by filter-feeders: A case study with the Mediterranean mussel. *Environmental Pollution*, 245, 600–606.
- Graham, P., Palazzo, L., Andrea de Lucia, G., Telfer, T. C., Baroli, M., & Carboni, S. (2019). Microplastics uptake and egestion dynamics in Pacific oysters, *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), under controlled conditions. *Environmental Pollution*, 252, 742–748.
- Green, D. S. (2016). Effects of microplastics on European flat oysters, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities. *Environmental Pollution*, 216, 95–103.
- Guo, X., & Wang, J. (2019). Sorption of antibiotics onto aged microplastics in freshwater and seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110511.
- Haag, W. R., Berg, D. J., Garton, D. W., & Farris, J. L. (1993). Reduced Survival and Fitness in Native Bivalves in Response to Fouling by the Introduced Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) in Western Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(1), 13–19.
- Haap, Classen, Beringer, Mecheels, & Gutmann (2019). Microplastic Fibers Released by Textile Laundry: A New Analytical Approach for the Determination of Fibers in Effluents. *Water*, 11(10), 2088.
- Hartmann, N. B., Hüffer, T., Thompson, R. C., Hassellöv, M., Verschoor, A., Daugaard, A. E., Rist, S., Karlsson, T., Brennholt, N., Cole, M., Herrling, M. P., Heß, M. C., Ivleva, N. P., Lusher, A. L., & Wagner, M. (2019). Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environmental Science & Technology*, 53(3), 1039–1047.
- Heß, M., Diehl, P., Mayer, Jens, Rahm, Harald, Reifenhäuser, W., Stark, J., & Schwaiger, J. (2018). Mikroplastik in Binnengewässern Süd- und Westdeutschlands: Bundesländerübergreifende Untersuchungen in Baden-Württemberg, Hessen, Nordrhein-Westfalen und Rheinlandpfalz. Teil 1: Kunststoffpartikel in der oberflächennahen Wasserphase. Karlsruhe, Augsburg, Wiesbaden, Recklinghausen, Mainz.
- 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. *Environmental Science & Technology*, 46(6), 3060–3075.
- Imhof, H. K., Ivleva, N. P., Schmid, J., Niessner, R., & Laforsch, C. (2013). Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. *Current Biology*, 23(19), R867–R868.
- Imhof, H. K., Schmid, J., Niessner, R., Ivleva, N. P., & Laforsch, C. (2012). A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. *Limnology and Oceanography: Methods*(10), 524–537.
- Imhof, H. K., Sigl, R., Brauer, E., Feyl, S., Giesemann, P., Klink, S., Leupolz, K., Löder, M. G. J., Löschel, L. A., Missun, J., Muszynski, S., Ramsperger, A. F. R. M., Schrank, I., Speck, S., Steibl, S.,

- Trotter, B., Winter, I., & Laforsch, C. (2017). Spatial and temporal variation of macro-, meso- and microplastic abundance on a remote coral island of the Maldives, Indian Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 116(1-2), 340–347.
- Ivleva, N. P., & Nießner, R. (2015). Kunststoffpartikel im Süßwasser. *Nachrichten Aus Der Chemie*, 63(1), 46–50.
- Ivleva, N. P., Wiesheu, A. C., & Niessner, R. (2017). Microplastic in Aquatic Ecosystems. *Angewandte Chemie (International Ed. In English)*, 56(7), 1720–1739.
- Janssen, H. H. (1981). Zur Histologie der Mitteldarmdrüse von *Mytilus edulis*: I. Ultrastrukturelle Merkmale. *Zool. Jb. Anat.*, 1981(106), 289–322.
- Käppler, A., Fischer, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K.-J., Voit, B. (2016): Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(29), 8377–8391.
- Kershaw, P., Turra, A., Galgani, F. (2019) Guidelines for the Monitoring and Assessment of Plastic Litter in the Ocean-GESAMP Reports and Studies No. 99." *GESAMP Reports and Studies*
- Koelmans, A. A., Besseling, E., Foekema, E., Kooi, M., Mintenig, S., Ossendorp, B. C., Redondo-Haselerharm, P. E., Verschoor, A., van Wezel, A. P., & Scheffer, M. (2017). Risks of Plastic Debris: Unravelling Fact, Opinion, Perception, and Belief. *Environmental Science & Technology*, 51(20), 11513–11519.
- Koelmans, A. A., Besseling, E., Wegner, A., & Foekema, E. M. (2013). Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: A model analysis. *Environmental Science & Technology*, 47(14), 7812–7820.
- Kögel, T., Bjørøy, Ø., Toto, B., Bienfait, A. M., & Sanden, M. (2019). Micro- and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors. *The Science of the Total Environment*, 709, 136050.
- Kolandhasamy, P., Su, L., Li, J., Qu, X., Jabeen, K., & Shi, H. (2018). Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: A novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *The Science of the Total Environment*, 610-611, 635–640.
- Kramm, J., Völker, C., & Wagner, M. (2018). Superficial or Substantial: Why Care about Microplastics in the Anthropocene? *Environmental Science & Technology*, 52 (6), 3336-3337.
- Krause, S., Günthert, W. F., & Rödel, S. (2015). Elimination von anthropogenen Spurenstoffen auf kommunalen Kläranlagen Errichtung und Nachweis der Leistungsfähigkeit einer 4. Reinigungsstufe [1. Zwischenbericht]. Universität der Bundeswehr München.
- Lachenmeier, D. W., Kocareva, J., Noack, D., & Kuballa, T. (2015). Microplastic identification in German beer – an artefact of laboratory contamination? *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift Für Lebensmittelkunde Und Lebensmittelrecht*, 111(4).
- Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y, Fu, Z., Shi, H., Raley-Susman, K. M., & He, D. (2018). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Science of the Total Environment*, 619-620, 1–8.
- Lenz, R., Enders, K., & Nielsen, T. G. (2016). Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), E4121-2.
- Lenz, R., Enders, K., Stedmon, C. A., Mackenzie, D. M. A., & Nielsen, T. G. (2015). A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 82–91.
- Li, J., Chapman, E. C., Shi, H., & Rotchell, J. M. (2020). Pvc Does Not Influence Cadmium Uptake or Effects in the Mussel (*Mytilus edulis*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 104, 315–320.
- Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Bråte, I. L. N., Sun, C., Shahadat Hossain, M., Li, Q., Kolandhasamy, P., & Shi, H. (2019). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environmental Pollution*, 244, 522–533.
- Li, J., Qu, X., Su, L., Zhang, W., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., & Shi, H. (2016). Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environmental Pollution*, 214, 177–184.

- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., & Shi, H. (2015). Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental Pollution*, 207, 190–195.
- Lithner, D. (2011). Environmental and health hazards of chemicals in plastic polymers and products. [Doctoral Thesis]. Department of Plant and Environmental Science, Faculty of Science, University of Gothenburg.
- Löder, M. G. J., & Gerdt, G. (2015). Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics—A Critical Appraisal. In M. Bergmann, L. Gutow, & M. Klages (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 201–227). Cham: Springer International Publishing.
- Löder, M. G. J., Kuczera, M., Mintenig, S., Lorenz, C., & Gerdt, G. (2015). Focal plane array detector-based micro-Fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples. *Environmental Chemistry*, 12(5), 563.
- Lyons, C., Dowling, V., Tedengren, M., Gardeström, J., Hartl, M. G.J., O'Brien, N., van Pelt, F. N.A.M., O'Halloran, J., & Sheehan, D. (2003). Variability of heat shock proteins and glutathione S-transferase in gill and digestive gland of blue mussel, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 56(5), 585–597.
- Magni, S., Gagné, F., André, C., Della Torre, C., Auclair, J., Hanana, H., Parenti, C. C., Bonasoro, F., & Binelli, A. (2018). Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia). *The Science of the Total Environment*, 631-632, 778–788.
- Maier, R. D., & Schiller, M. (Eds.). (2016). *Handbuch Kunststoff Additive*. Hanser Verlag GmbH Co KG.
- Mathers, N. F. (1972). The tracing of a natural algal food labelled with a carbon 14 isotope through the digestive tract of *Ostrea edulis* L. *Journal of Molluscan Studies*, 40(2), 115–124.
- McCreery, R. L. (2002). Raman spectroscopy for chemical analysis. *Chemical analysis: Vol. 157*. Wiley.
- McElwain, A., & Bullard, S. A. (2014). Histological Atlas of Freshwater Mussels (Bivalvia, Unionidae): *Villosa nebulosa* (Ambleminae: Lampsilini), *Fusconaia cerina* (Ambleminae: Pleurobemini) and *Strophitus connasaugaensis* (Unioninae: Anodontini). *Malacologia*, 57(1), 99–239.
- Merzel, R. L., Purser, L., Soucy, T. L., Olszewski, M., Colón-Bernal, I., Duhaime, M., Elgin, A. K., & Banaszak Holl, M. M. (2019). Uptake and Retention of Nanoplastics in Quagga Mussels. *Global Challenges*, 9, 1800104.
- Miklos, D., Obermaier, N., & Jekel, M. (2016). Mikroplastik: Entwicklung eines Umweltbewertungskonzepts: Erste Überlegungen zur Relevanz von synthetischen Polymeren in der Umwelt (Texte 32 / 2016; Masterarbeit). Dessau-Roßlau. Umweltbundesamt (UBA).
- Mintenig, S., Int-Veen, I., Löder, M., & Gerdt, G. (2014). Mikroplastik in ausgewählten Kläranlagen des Oldenburgisch- Ostfriesischen Wasserverbandes (OOWV) in Niedersachsen: Probenanalyse mittels Mikro-FTIR Spektroskopie. Helgoland. Alfred-Wegener-Institut, Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung (AWI).
- Moos, N. von, Burkhardt-Holm, P., & Kohler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. After an experimental exposure. *Environmental Science & Technology*, 46(20), 11327–11335.
- Murray, F., & Cowie, P. R. (2011). Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Marine Pollution Bulletin*, 62(6), 1207–1217.
- Newton, T. J., & Cope, W. G. (2007). Biomarkers responses of Unionid Mussels to Environmental Contaminants. In J. L. Farris & J. H. van Hassel (Eds.), *Freshwater Bivalve Ecotoxicology* (Chapter 10, pp. 95–134). CRC Press.
- Oberflächengewässerverordnung (OGewV) vom 20. Juni 2016 (BGBl. 2016 I, Nr. 28, 1373-1443)
- Oehlmann, J., & Schulte-Oehlmann, U. (2003). Molluscs as Bioindicators. In B.-A. Markert, A. M. Breure, & H. G. Zechmeister (Eds.), *Trace Metals and other Contaminants in the Environment. Bioindicators & Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications* (Chapter 17, pp. 577–635). Elsevier B.V.
- Ogonowski, M., Gerdes, Z., & Gorokhova, E. (2018). What we know and what we think we know about microplastic effects - A critical perspective. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 41–46.

- Oßmann, B. E., Sarau, G., Holtmannspötter, H., Pischetsrieder, M., Christiansen, S. H., & Dicke, W. (2018). Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Research*, 141, 307–316.
- Patterson, M. A., Parker, B. C., & Neves, R. J. (1999). Glycogen Concentration in the Mantle Tissue of Freshwater Mussels (*Bivalvia: Unionidae*) During Starvation and Controlled Feeding. *American Malacological Bulletin*, 15 (1), 47–50.
- Paul-Pont, I., Lacroix, C., González Fernández, C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Frère, L., Cassone, A.-L., Sussarellu, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albentosa, M., Huvet, A., & Soudant, P. (2016). Exposure of marine mussels *Mytilus spp.* To polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 216, 724–737.
- Pedà, C., Caccamo, L., Fossi, M. C., Gai, F., Andaloro, F., Genovese, L., Perdichizzi, A., Romeo, T., & Maricchiolo, G. (2016). Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environmental Pollution*, 212, 251–256.
- Pempkowiak, M., Radlowska, J., Beldowski, G., Kupryszewski, J., Wysocki, R., & Glos Nicka, J. (2001). Western blotting versus ELISA detection of stress proteins induced in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to cadmium and tributyltin. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 6(6), 400–405.
- Petkevičiūtė, R., Stunžėnas, V., & Stanevičiūtė, G. (2014). Differentiation of European freshwater bucephalids (Digenea: Bucephalidae) based on karyotypes and DNA sequences. *Systematic Parasitology*, 87(2), 199–212.
- 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. *Scientific Reports*, 8(1), 17950.
- PlasticsEurope. (2019). *Plastics - The Facts 2019: An analysis of European plastics production, demand and waste data*. <https://www.plasticseurope.org/de/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>.
- Rager, F. (2015). Durchführung eines Expositionsversuchs mit Muscheln und Entwicklung einer Probenaufbereitungsmethode für die Analyse von Mikroplastik mittels Raman-Mikrospektroskopie [Bachelors Thesis]. Technische Universität München, München.
- Rauscher, H., Roebben, G., Sanfeliu, A. B., Emons, H., Gibson, N., Koeber, R., Linsinger, T., Rasmussen, K., Sintes, JR, & Sokull-Kluttgen, B. (2014). Towards a review of the EC recommendation for a definition of the term "nanomaterial". Technical report. Joint Research Centre (JRC); EU.
- Rech, S., Macaya-Caquilpan, V., Pantoja, J. F., Rivadeneira, M. M., Jofre Madariaga, D., & Thiel, M. (2014). Rivers as a source of marine litter - a study from the SE Pacific. *Marine Pollution Bulletin*, 82(1-2), 66–75.
- Remy, F., Collard, F., Gilbert, B., Compère, P., Eppe, G., & Lepoint, G. (2015). When Microplastic Is Not Plastic: The Ingestion of Artificial Cellulose Fibers by Macrofauna Living in Seagrass Macrophytodetritus. *Environmental Science & Technology*, 49(18), 11158–11166.
- Ribeiro, F., Garcia, A. R., Pereira, B. P., Fonseca, M., Mestre, N. C., Fonseca, T. G., Ilharco, L. M., & Bebianno, M. J. (2017). Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2), 379–391.
- Rist, S., Carney Almroth, B., Hartmann, N. B., & Karlsson, T. M. (2018). A critical perspective on early communications concerning human health aspects of microplastics. *The Science of the Total Environment*, 626, 720–726.
- Rist, S. E., Assidqi, K., Zamani, N. P., Appel, D., Perschke, M., Huhn, M., & Lenz, M. (2016). Suspended micro-sized PVC particles impair the performance and decrease survival in the Asian green mussel *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, 111(1-2), 213–220.
- Roch, S., & Brinker, A. (2017). Rapid and Efficient Method for the Detection of Microplastic in the Gastrointestinal Tract of Fishes. *Environmental Science & Technology*, 51(8), 4522–4530.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Hentschel, B. T., & Kaye, S. (2013). Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: Implications for plastic marine debris. *Environmental Science & Technology*, 47(3), 1646–1654.

- Rochman, C. M., Tahir, A., Williams, S. L., Baxa, D. V., Lam, R., Miller, J. T., Teh, F.-C., Werorilangi, S., & Teh, S. J. (2015). Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific Reports*, 5, 14340.
- Romano, N., Ashikin, M., Teh, J. C., Syukri, F., & Karami, A. (2018). Effects of pristine polyvinyl chloride fragments on whole body histology and protease activity in silver barb *Barbodes gonionotus* fry. *Environmental Pollution*, 237, 1106–1111.
- Santana, M. F. M., Moreira, F. T., Pereira, C. D. S., Abessa, D. M. S., & Turra, A. (2018). Continuous Exposure to Microplastics Does Not Cause Physiological Effects in the Cultivated Mussel *Perna perna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 74(4), 594–604.
- Scanes, E., Wood, H., & Ross, P. (2019). Microplastics detected in haemolymph of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110537.
- Schiller, M. (2015). *PVC Additives: Performance, chemistry, developments, and sustainability*. Hanser Verlag GmbH Co KG.
- Schrader, B. (2008). *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*. Wiley-VCH.
- Schrank, I., Trotter, B., Dummert, J., Scholz-Böttcher, B. M., Löder, M. G. J., & Laforsch, C. (2019). Effects of microplastic particles and leaching additive on the life history and morphology of *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 255(Pt 2), 113233.
- Schür, C., Zipp, S., Thalau, T., & Wagner, M. (2020). Microplastics but not natural particles induce multigenerational effects in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 260, 113904.
- Schwaiger, J. (2019). *Mikroplastik in bayerischen Seen - Eine Pilotstudie (UmweltSpezial)*. Augsburg. Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU).
- Scopetani, C., Esterhuizen-Londt, M., Chelazzi, D., Cincinelli, A., Setälä, H., & Pflugmacher, S. (2019). Self-contamination from clothing in microplastics research. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 110036.
- Sendra, M., Saco, A., Yeste, M. P., Romero, A., Novoa, B., & Figueras, A. (2019). Nanoplastics: From tissue accumulation to cell translocation into *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. Resilience of immune cells exposed to nanoplastics and nanoplastics plus *Vibrio splendidus* combination. *Journal of Hazardous Materials*, 121788.
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., & Lehtiniemi, M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution*, 185, 77–83.
- Signa, G., Di Leonardo, R., Vaccaro, A., Tramati, C. D., Mazzola, A., & Vizzini, S. (2015). Lipid and fatty acid biomarkers as proxies for environmental contamination in caged mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators*, 57, 384–394.
- Sıkdokur, E., Belivermiş, M., Sezer, N., Pekmez, M., Bulan, Ö. K., & Kılıç, Ö. (2020). Effects of microplastics and mercury on manila clam *Ruditapes philippinarum*: Feeding rate, immunomodulation, histopathology and oxidative stress. *Environmental Pollution*, 262, 114247.
- Song, Y., Cao, C., Qiu, R., Hu, J., Liu, M., Lu, S., Shi, H., Raley-Susman, K. M., & He, D. (2019). Uptake and adverse effects of polyethylene terephthalate microplastics fibers on terrestrial snails (*Achatina fulica*) after soil exposure. *Environmental Pollution*, 250, 447–455.
- Song, Y. K., Hong, S. H., Jang, M., Han, G. M., Rani, M., Lee, J., & Shim, W. J. (2015). A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin*, 93(1-2), 202–209.
- Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65(1-6), 143–150.
- Sørensen, L., Rogers, E., Altin, D., Salaberria, I., & Booth, A. M. (2019). Sorption of PAHs to microplastic and their bioavailability and toxicity to marine copepods under co-exposure conditions. *Environmental Pollution*, 258, 113844.
- Stock, F., Kochleus, C., Bänsch-Baltruschat, B., Brennholt, N., & Reifferscheid, G. (2019). Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment – A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 84–92.

- Su, L., Cai, H., Kolandhasamy, P., Wu, C., Rochman, C. M., & Shi, H. (2018). Using the Asian clam as an indicator of microplastic pollution in freshwater ecosystems. *Environmental Pollution*, 234, 347–355.
- Su, L., Xue, Y., Li, L., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., & Shi, H. (2016). Microplastics in Taihu Lake, China. *Environmental Pollution*, 216, 711–719.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E. J., Le Goic, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., & Huvet, A. (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(9), 2430–2435.
- Talsness, C. E., Andrade, A. J. M., Kuriyama, S. N., Taylor, J. A., & Vom Saal, F. S. (2009). Components of plastic: Experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1526), 2079–2096.
- Tang, Y., Rong, J., Guan, X., Zha, S., Shi, W., Han, Y., Du, X., Wu, F., Huang, W., & Liu, G. (2020). Immunotoxicity of microplastics and two persistent organic pollutants alone or in combination to a bivalve species. *Environmental Pollution*, 258, 113845.
- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R. U., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Bjorn, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., Galloway, T. S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P. H., Tana, T. S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M. P., Akkhavong, K., Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1526), 2027–2045.
- Thiele, C. J., Hudson, M. D., & Russell, A. E. (2019). Evaluation of existing methods to extract microplastics from bivalve tissue: Adapted KOH digestion protocol improves filtration at single-digit pore size. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 384–393.
- Titow, W. V. (1984). *PVC Technology*. Springer Netherlands.
- Tsangaris, C., Kormas, K., Stroglyoudi, E., Hatzianestis, I., Neofitou, C., Andral, B., & Galgani, F. (2010). Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(3), 369–378.
- van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2015). Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental Pollution*, 199, 10–17.
- van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., & Janssen, C. R. (2015). Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research*, 111, 5–17.
- van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 193, 65–70.
- Vandenabeele, P. (2013). *Practical Raman spectroscopy: An introduction*. Analytical techniques in the sciences. Wiley.
- Vandermeersch, G., van Cauwenberghe, L., Janssen, C. R., Marques, A., Granby, K., Fait, G., Kotterman, M. J. J., Diogène, J., Bekaert, K., Robbens, J., & Devriese, L. (2015). A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research*, 143(Pt B), 46–55.
- Velzeboer, I., Kwadijk, C. J. A. F., & Koelmans, A. A. (2014). Strong Sorption of PCBs to Nanoplastics, Microplastics, Carbon Nanotubes, and Fullerenes. *Environmental Science & Technology*, 48(9), 4869–4876.
- Völker, C., Kramm, J., & Wagner, M. (2019). On the Creation of Risk: Framing of Microplastics Risks in Science and Media. *Global Challenges*, 50, 1900010.
- Vroom, R. J. E., Koelmans, A. A., Besseling, E., & Halsband, C. (2017). Aging of microplastics promotes their ingestion by marine zooplankton. *Environmental Pollution*, 231(Pt 1), 987–996.
- Wagner, J., Wang, Z.-M., Ghosal, S., Rochman, C., Gassel, M., & Wall, S. (2017). Novel method for the extraction and identification of microplastics in ocean trawl and fish gut matrices. *Anal. Methods*, 9(9), 1479–1490.

- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A. D., Winther-Nielsen, M., & Reifferscheid, G. (2014). Microplastics in freshwater ecosystems: What we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 1977
- Waldschläger, K. (2019). *Mikroplastik in der aquatischen Umwelt: Quellen, Senken und Transportpfade*. Springer.
- Wang, W., Ndungu, A.W., Li, Z., Wang, J., (2017). Microplastics pollution in inland freshwaters of China: a case study in urban surface waters of Wuhan, China. *Sci. Total Environ.* 575, 1369–1374.
- Wang, X., Huang, W., Wei, S., Shang, Y., Gu, H., Wu, F., Lan, Z., Hu, M., Shi, H., & Wang, Y. (2019). Microplastics impair digestive performance but show little effects on antioxidant activity in mussels under low pH conditions. *Environmental Pollution*, 113691.
- Wang, Z.-M., Wagner, J., Ghosal, S., Bedi, G., & Wall, S. (2017). Sem/eds and optical microscopy analyses of microplastics in ocean trawl and fish guts. *The Science of the Total Environment*, 603-604, 616–626.
- Ward, J. E., Rosa, M., & Shumway, S. E. (2019). Capture, ingestion, and egestion of microplastics by suspension-feeding bivalves: A 40-year history. *Anthropocene Coasts*, 2(1), 39–49.
- Webb, S., Ruffell, H., Marsden, I., Pantos, O., & Gaw, S. (2019). Microplastics in the New Zealand green lipped mussel *Perna canaliculus*. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110641.
- Wesch, C., Bredimus, K., Paulus, M., & Klein, R. (2016). Towards the suitable monitoring of ingestion of microplastics by marine biota: A review. *Environmental Pollution*, 218, 1200–1208.
- Wiesheu, A. C. (2017). *Raman-Mikrospektroskopie zur Analyse von organischen Bodensubstanzen und Mikroplastik [Doctoral Thesis]*. Technische Universität München, München.
- Wilber, D. H., & Clarke, D. G. (2001). Biological Effects of Suspended Sediments: A Review of Suspended Sediment Impacts on Fish and Shellfish with Relation to Dredging Activities in Estuaries. *North American Journal of Fisheries Management*, 21(4), 855–875.
- Witte, B. de, Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G, Cooreman, K., & Robbens, J. (2014). Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. *Marine Pollution Bulletin*, 85(1), 146–155.
- Woods, M. N., Stack, M. E., Fields, D. M., Shaw, S. D., & Matrai, P. A. (2018). Microplastic fiber uptake, ingestion and egestion rates in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Marine Pollution Bulletin*, 137, 638–645.
- Xia, X., Sun, M., Zhou, M., Chang, Z., & Li, L. (2020). Polyvinyl chloride microplastics induce growth inhibition and oxidative stress in *Cyprinus carpio* var. larvae. *Science of the Total Environment*, 136479.
- Xu, J.-L., Thomas, K. V., Luo, Z., & Gowen, A. A. (2019). FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: State of the art, challenges and prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 119, 115629.
- Xu, S., Ma, J., Ji, R., Pan, K., & Miao, A.-J. (2020). Microplastics in aquatic environments: Occurrence, accumulation, and biological effects. *The Science of the Total Environment*, 703, 134699.
- Zhao, S., Ward, J. E., Danley, M., & Mincer, T. J. (2018). Field-Based Evidence for Microplastic in Marine Aggregates and Mussels: Implications for Trophic Transfer. *Environmental Science & Technology*, 52(19), 11038–11048.
- Zilberberg, C., Sereno, D., Lima, G., Custódio, M. R., & Lôbo-Hajdu, G. (2011). Effect of Mussel's Gender and Size on a Stress Response Biomarker. *Water, Air, & Soil Pollution*, 217(1-4), 317–320.

7 Abkürzungsverzeichnis

Die hier aufgeführten Abkürzungen finden sich im Fließtext. Abkürzungen, die ausschließlich in Tabellen oder Abbildungsbeschriftungen genutzt werden, sind dort jeweils extra aufgeführt.

Abkürzung	ungekürzt
%	Prozent
<, >	Kleiner als, größer als
°C	Grad Celcius
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
CaCO ₃	Calciumcarbonat
CI	Konditions-Index
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
etc.	und so weiter (lateinisch: et cetera)
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
g	Gramm
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GPx	Glutathionperoxidase
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HNO ₃	Salpetersäure
HSP70	Gruppe von Hitzeschockproteinen mit einer Masse von 70 kDa
Hz	Hertz
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
kg	Kilogramm
l	Liter
LfU	Bayerisches Landesamt für Umwelt
m	Meter
m ³	Kubikmeter
mg/dL	Milligramm pro Deziliter
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mW	Milliwatt
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
µS/cm	Mikrosiemens pro Zentimeter

Abkürzung	ungekürzt
n	Umfang der Stichprobe
NA	Numerische Aparatur
NA _{LWD}	Numerische Aparatur Long working distance
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PA	Polyamid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Polyethylen
PE-HD	High Density Polyethylen
PE-LD	Low Density Polyethylen
PE-LLD	Linear Low Density Polyethylen
PE-MD	Medium Density Polyethylen
PET	Polyethylenterephthalat
pH-Wert	lat. Potentia hydrogenii (Maßzahl der Wasserstoffionenkonzentration)
PLA	Poly lactide (umgangssprachlich Polymilchsäure)
POP	Persistent organic pollutant
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUR	Polyurethan
PVA	Polyvinylacetat
PVC	Polyvinylchlorid, Trivialbezeichnung für Poly-(1-chlorethylen)
uPVC	PVC ohne Weichmacher (englisch: unplasticised polyvinyl chlorid)
p-Wert	Signifikanzwert
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie)
ROS (intrazelluläres)	Reaktive Sauerstoffspezies (englisch reactive oxygen species)
SD	Standardabweichung (englisch standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sek	Sekunden
sp.	Species
SPOS	Single Partikle Optical Sizing
StMUV	Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz
Tab.	Tabelle
TiO ₂	Titandioxid
U	Einheit der Enzymaktivität (entspricht einem mikromol Substratumsatz pro Minute unter definierten Bedingungen)
v/v	Volumenprozent
w/w	Gewichtsprozent

8 Anhang

Graphische Darstellungen der im Supernatant der Kiemen, der Mitteldarmdrüse und des Mantels von Großen Flussmuscheln (*U. tumidus*) gemessenen Biomarker und klinisch-chemischen Parameter. Gemessen wurde nach einer Woche (blau) und nach vier Wochen PVC-Exposition (rot) und nach darauffolgenden vier Wochen Depuration (grün) in PVC-freiem Wasser. Der Mittelwert zu jedem Boxplot wird jeweils als grauer Kreis dargestellt (siehe auch Abb. 24, Kapitel 2.2.4). Vergleiche zwischen Muscheln, die einer der vier PVC-Konzentrationen oder der Kontrolle ausgesetzt waren und Vergleiche zwischen den Zeitpunkten sind als Linien über den Boxplots dargestellt, wenn der entsprechende Kruskal-Wallis Test und der nachfolgende Post-Hoc Test ein signifikantes Ergebnis lieferten. Stichprobe (n) = 9 pro Gruppe und Zeitpunkt. Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) sind nicht dargestellt. Die Signifikanzniveaus werden mittels Sternen (*) dargestellt: p -Wert $< 0,05 \triangleq *$, p -Wert $< 0,01 \triangleq **$, p -Wert $< 0,001 \triangleq ***$.

Kiemen

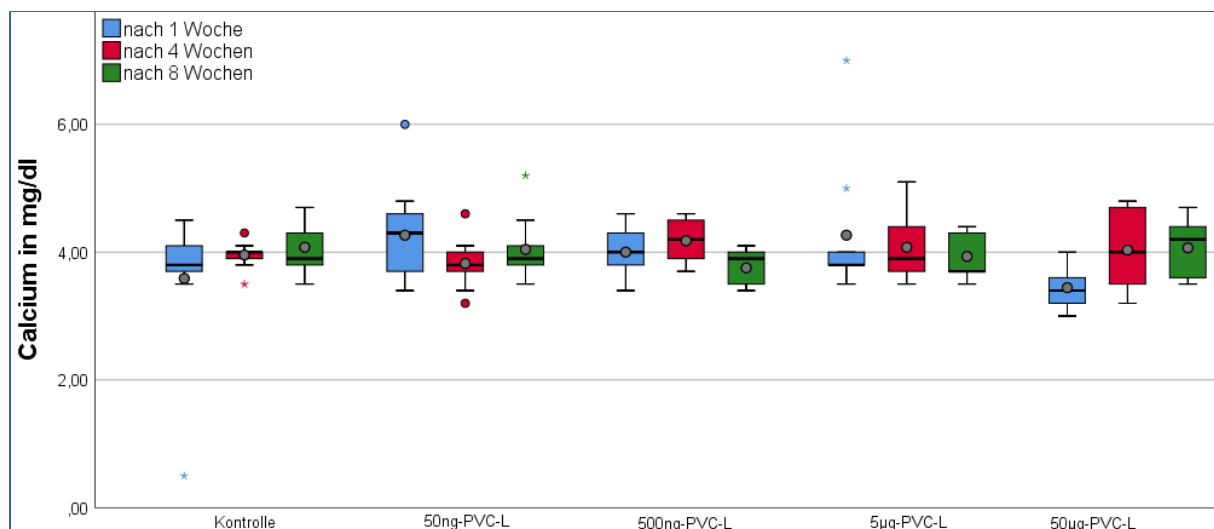


Abb.1: Calcium-Konzentration in den Kiemen

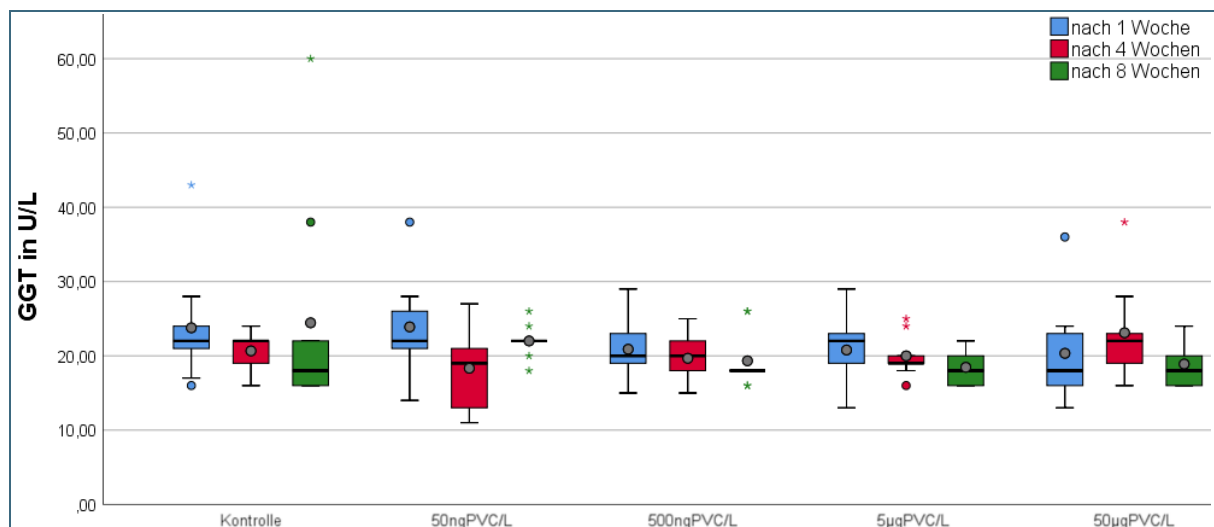


Abb. 2: Aktivität der γ -Glutamyl-transferasen (GGT) in den Kiemen

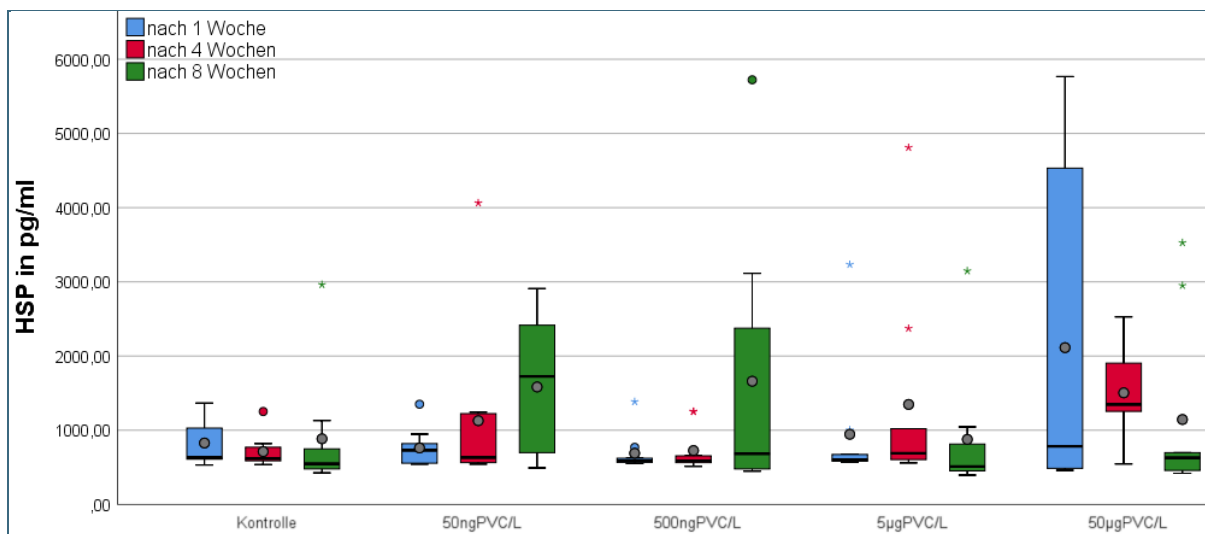


Abb. 3: Konzentration von Hitzeschockprotein70 (HSP70) in den Kiemen

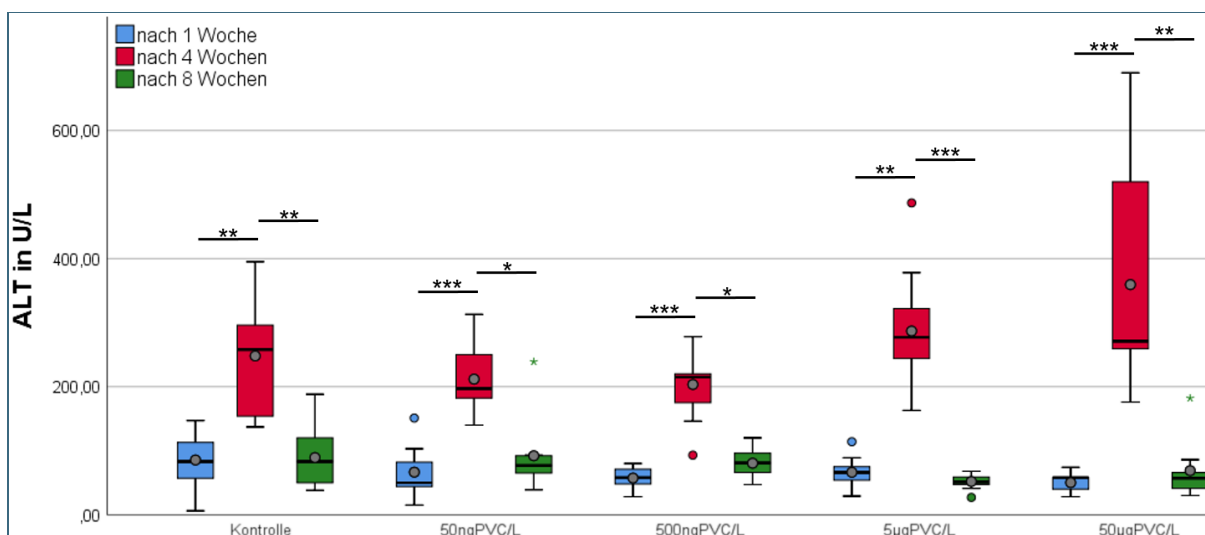


Abb. 4: Aktivität von Alanin-Aminotransferase (ALT) in den Kiemen

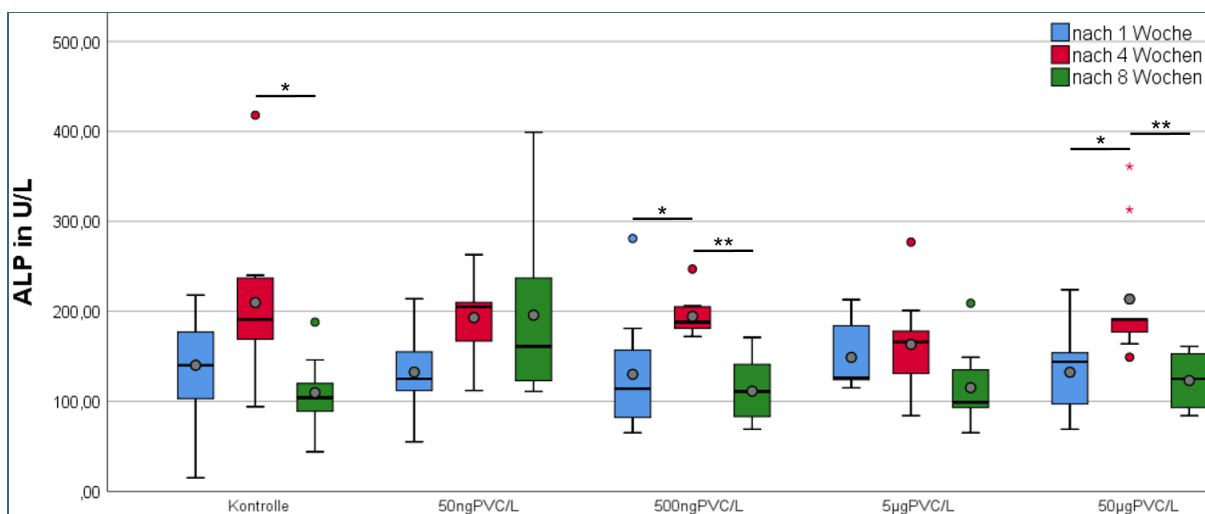


Abb. 5: Aktivität von alkalischer Phosphatase (ALP) in den Kiemen

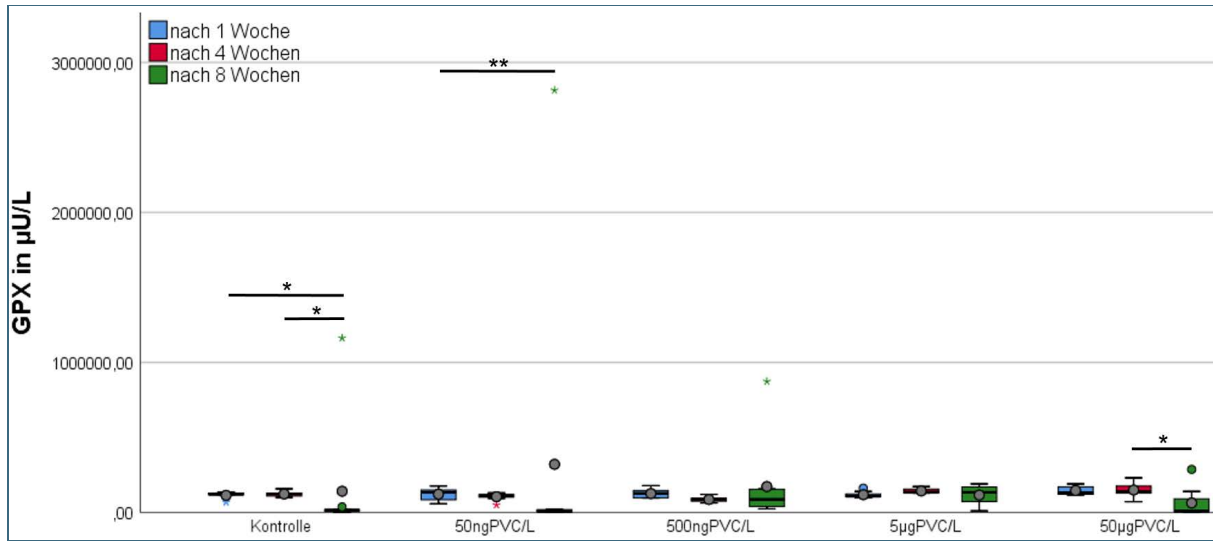


Abb. 6: Aktivität von Glutathion-Peroxidasen (GPx) in den Kiemen

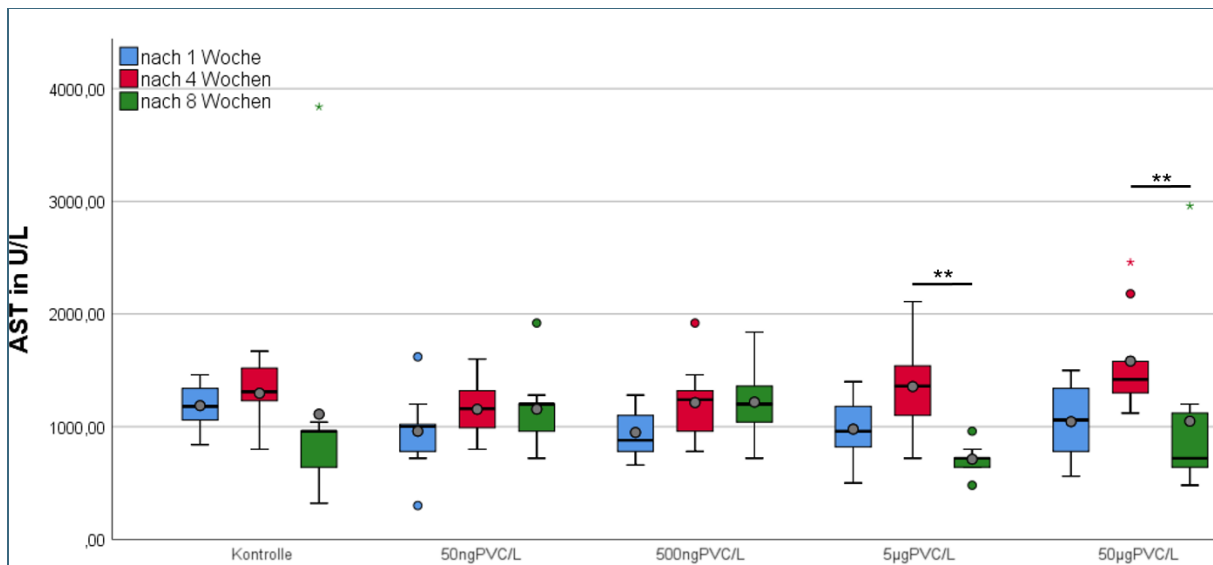


Abb. 7: Aktivität von Aspartat-Aminotransferase (AST) in den Kiemen

Mitteldarmdrüse

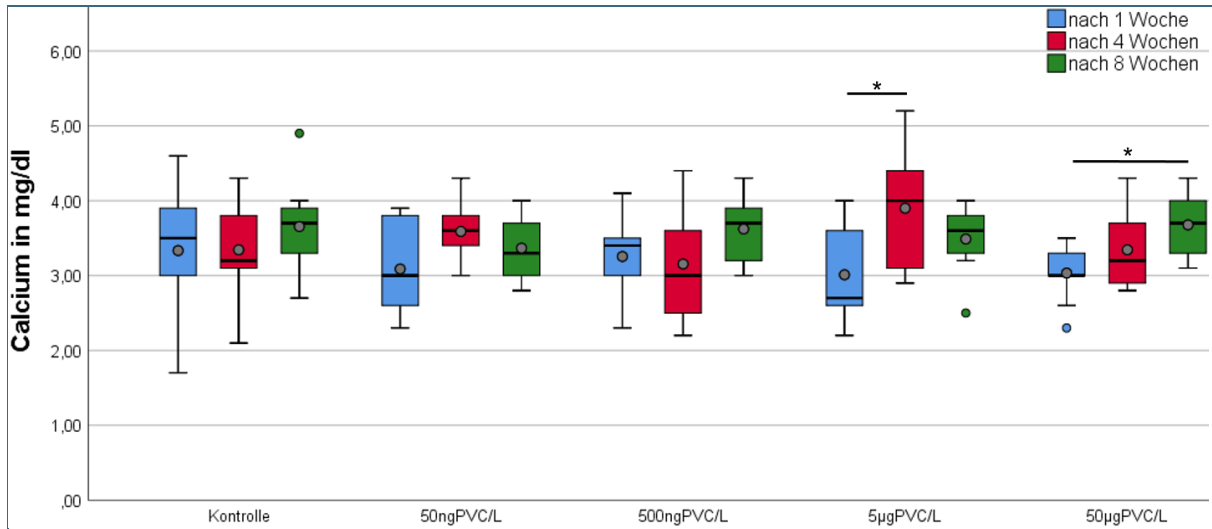


Abb. 8: Calcium-Konzentration in der Mitteldarmdrüse

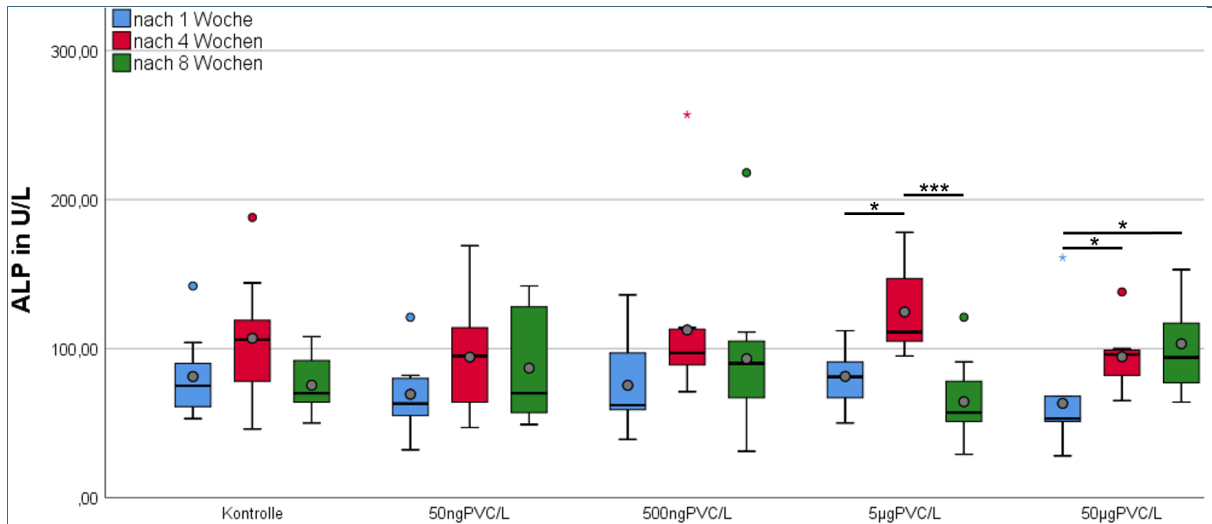
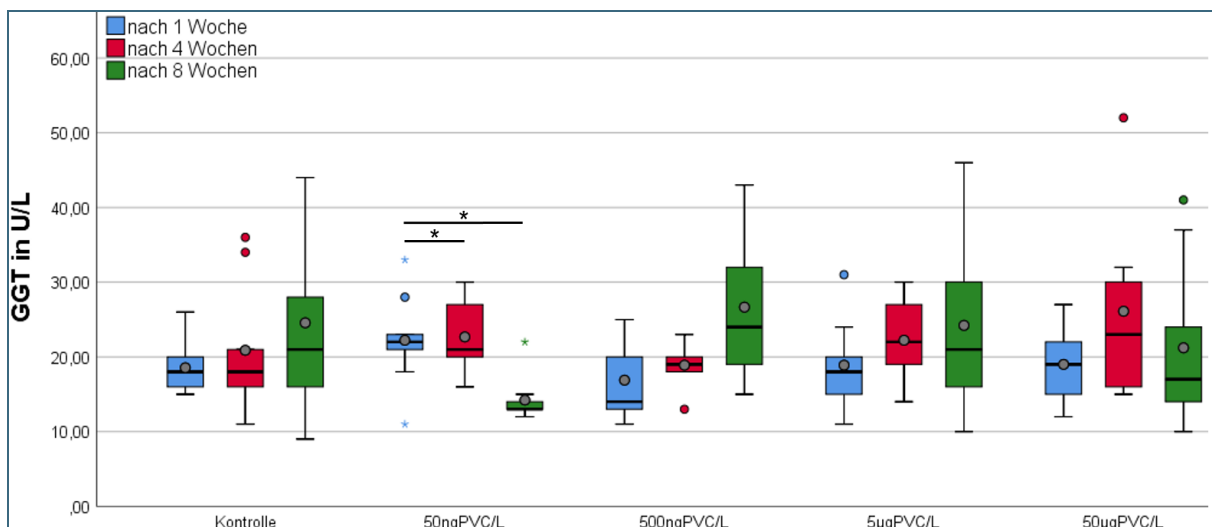


Abb. 9: Aktivität von alkalischer Phosphatase (ALP) in der Mitteldarmdrüse

Abb. 10: Aktivität von γ -Glutamyl-transferasen (GGT) in der Mitteldarmdrüse

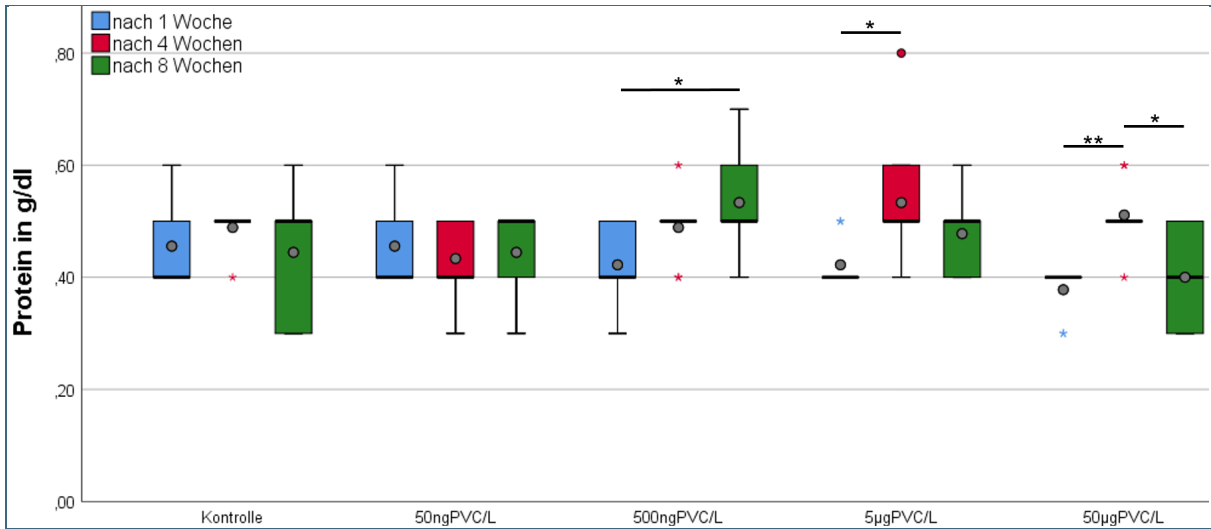


Abb. 11: Gesamtprotein-Konzentration in der Mitteldarmdrüse

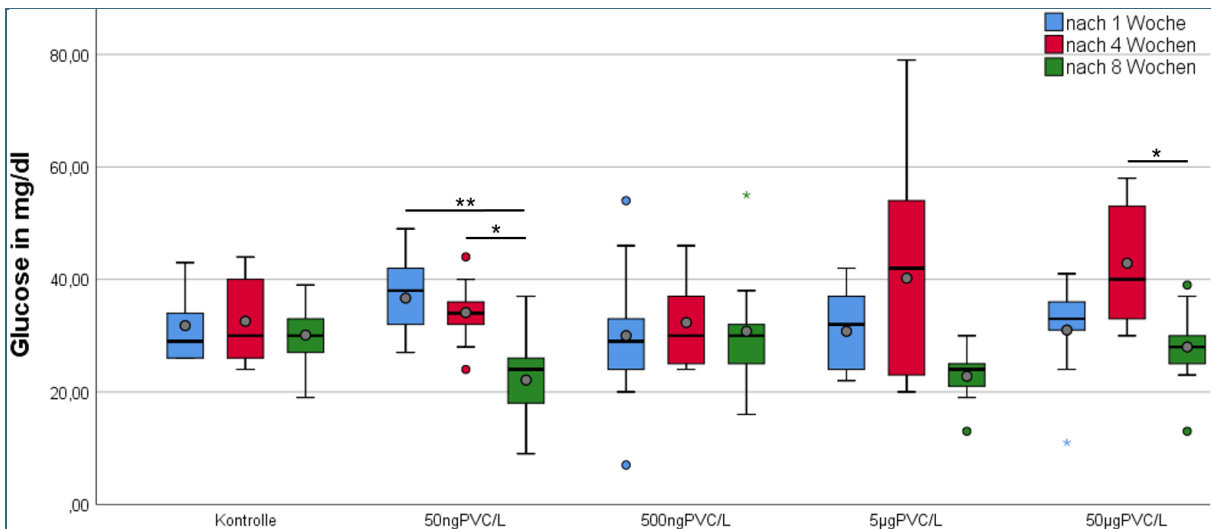


Abb. 12: Glucose-Konzentration in der Mitteldarmdrüse

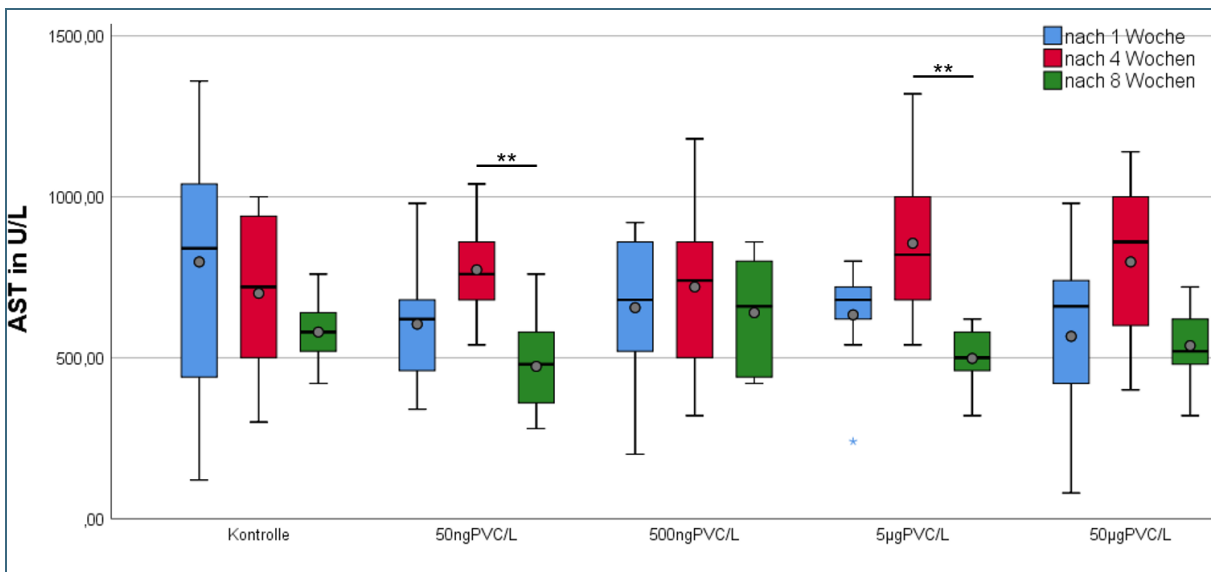


Abb. 13: Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (AST) in der Mitteldarmdrüse

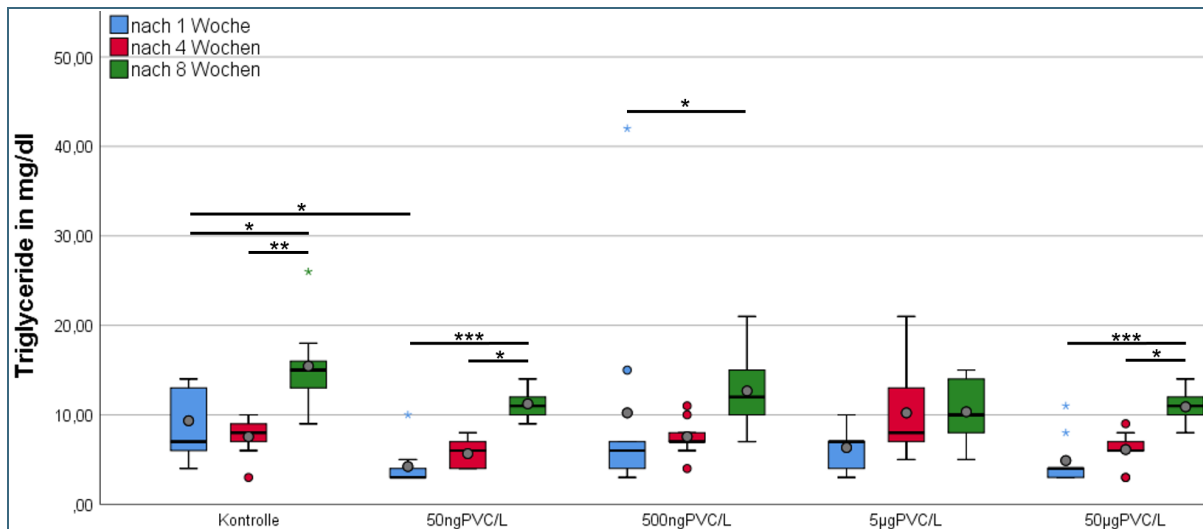


Abb. 14: Triglycerid-Konzentration in der Mitteldarmdrüse

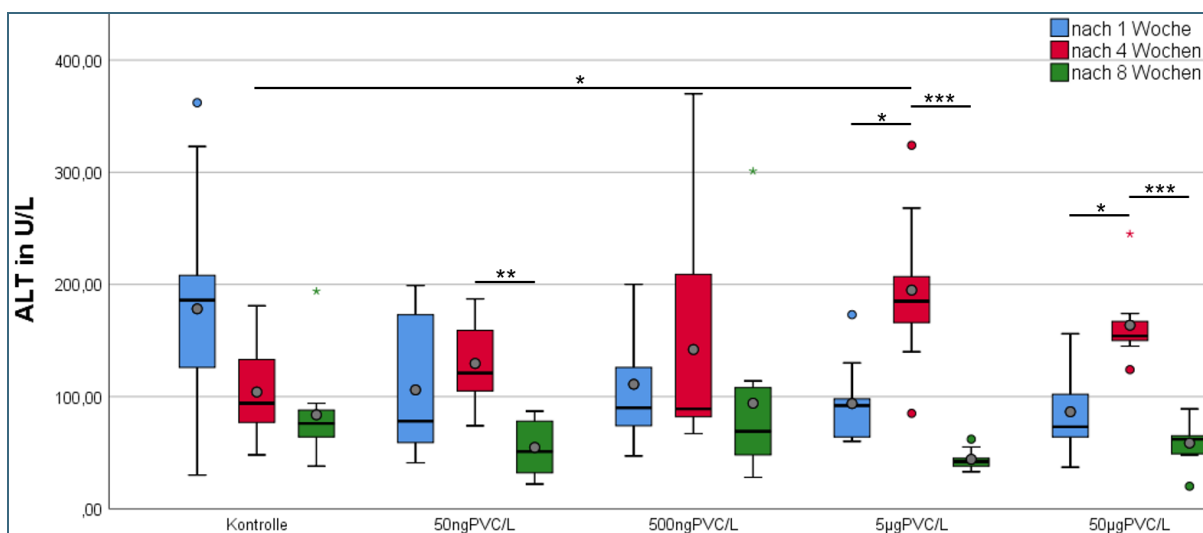


Abb. 15: Aktivität von Alanin-Aminotransferase (ALT) in der Mitteldarmdrüse

Mantel

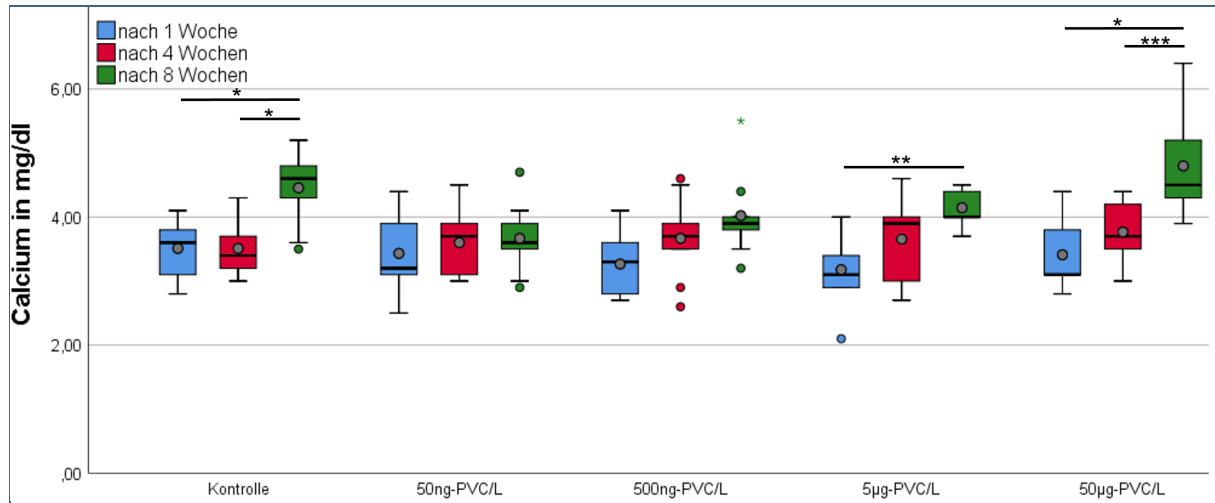


Abb. 16: Calcium-Konzentration im Mantel

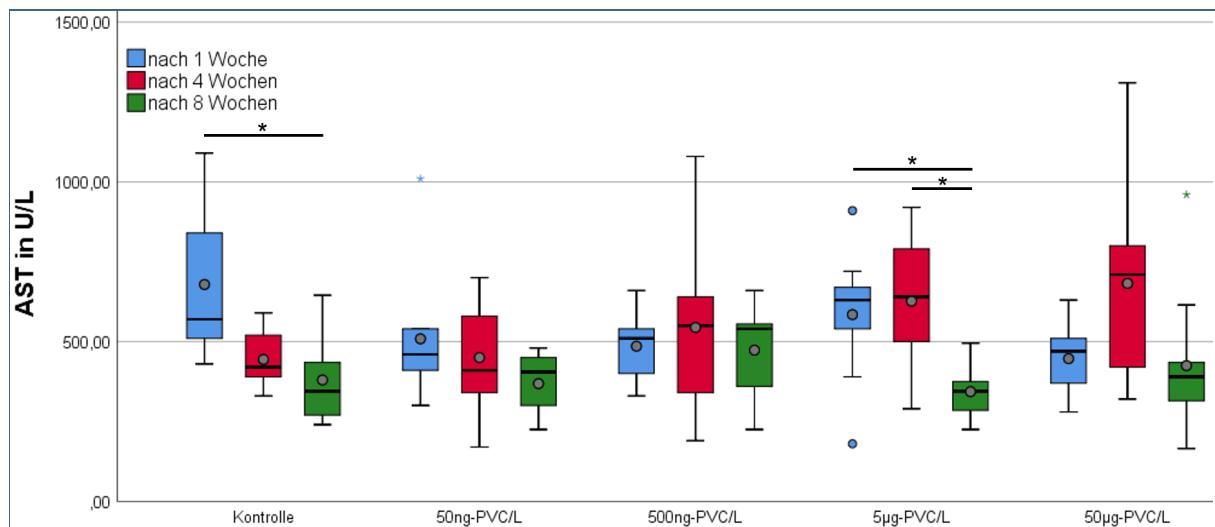


Abb. 17: Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (AST) im Mantel

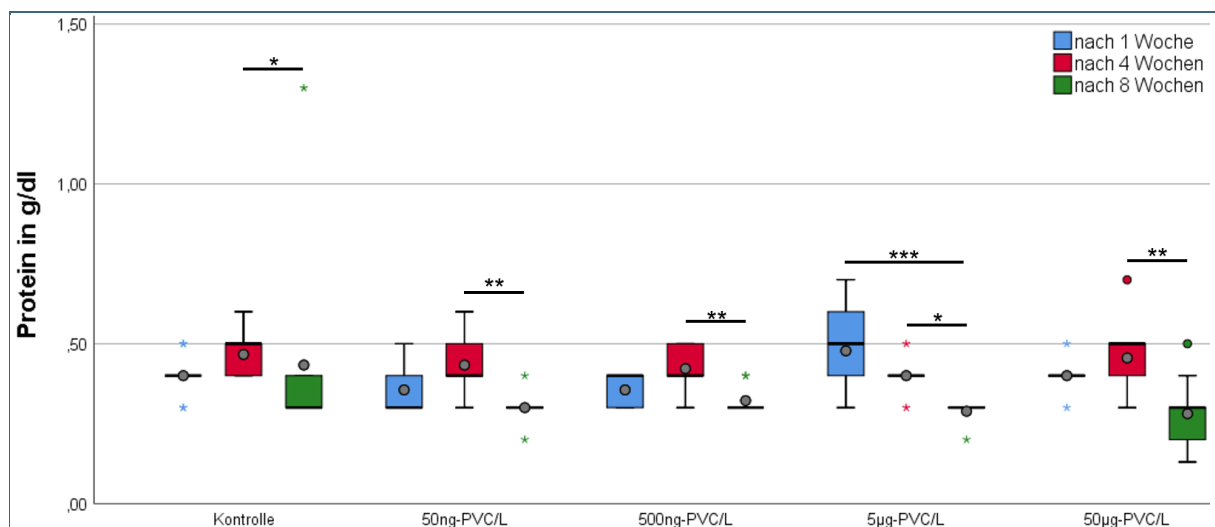


Abb. 18: Gesamtprotein-Konzentration im Mantel

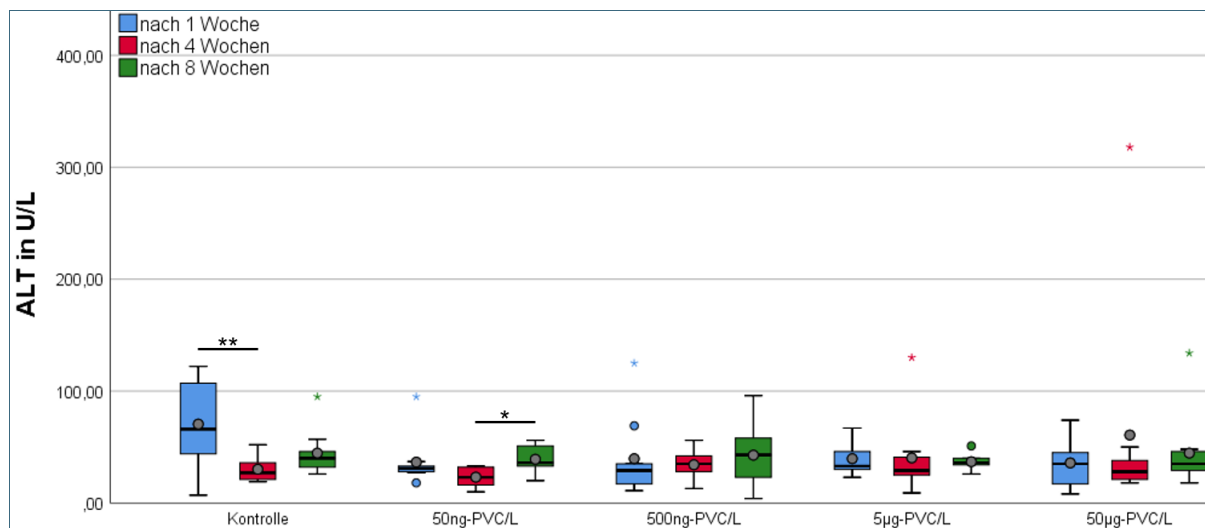


Abb. 19: Aktivität von Alanin-Aminotransferase (ALT) im Mantel



Eine Behörde im Geschäftsbereich
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz

