

**JPI Oceans – Verbundprojekt RESPONSE**  
**Risikobasierte Analyse von Mikroplastik-Kontaminationen**  
**in marinen Ökosystemen**



**Abschlussbericht**

**Effektbezogene Analyse von Mikroplastik-  
Partikeln und deren Extrakten**

Förderkennzeichen: 03F0853A

Projektlaufzeit: 01.01.2020 – 31.08.2023

Zuwendungsempfänger: Aquatische Ökologie und Toxikologie, COS – Centre for Organismal Studies, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 230, D-69120 Heidelberg

Projektleiter: Prof. Dr. Thomas Braunbeck

Bearbeiter: Dr. Patrick Heinrich, M.Sc. Lisa Bauer, M.Sc. Florian Walter, Prof. Dr. Thomas Braunbeck





## **Kurzzusammenfassung des Gesamtprojekts RESPONSE<sup>1</sup>**

Aufgrund der Covid-19-Pandemie wurde der offizielle Beginn des RESPONSE-Projekts vom Januar auf September 2020 verschoben. Im Juni 2020 fand jedoch bereits ein erstes virtuelles Kick-off-Meeting statt, um relevante Aspekte der Projektdurchführung und -verwaltung zu erörtern. Dabei wurden auch die Hauptverantwortlichkeiten für die Arbeitspakete (APs) und Querschnittsaktivitäten festgelegt. In den ersten Monaten des Projekts organisierten die AP-Leiter virtuelle Treffen, um die Ziele zu besprechen und die spezifischen Forschungsinitiativen für jedes Arbeitspaket (AP1-AP8) zu koordinieren. Im September 2021 wurde das erste offizielle (virtuelle) Jahrestreffen organisiert, um die in den einzelnen Arbeitspaketen durchgeführten Aktivitäten zu präsentieren und die Ziele für das zweite Projektjahr zu koordinieren. Daneben wurden virtuelle AP-Meetings organisiert, um spezifische Ergebnisse zu präsentieren und gemeinsame Aktivitäten zwischen den am selben Arbeitspaket beteiligten Partnern zu planen. Im März 2023 wurde ein weiteres Jahrestreffen in Ancona, Italien, organisiert. Schließlich präsentierten einige Partner von RESPONSE die wichtigsten Ergebnisse auf dem JPI-Ocean-Abschlusstreffen, das im September 2023 in Galway stattfand.

### **AP1: Überwachung von Mikroplastikpartikeln in europäischen Küstengebieten<sup>2</sup>**

Gemäß dem Projektplan wurden systematische Probenahmen durchgeführt, um Präsenz und Verteilung von Mikroplastik (MP) in verschiedenen abiotischen und biotischen Umweltmatrizes (Oberflächengewässer, Wassersäule, Sedimente, Organismen) unter Verwendung standardisierter Methoden und Protokolle zu untersuchen. Um die in verschiedenen Regionen erzielten Ergebnisse vergleichen zu können, wurde von allen Partnern das gleiche Wasserfiltersystem genutzt.

Die Probenahmen wurden in verschiedenen geografischen Gebieten durchgeführt, u.a. in der Adria, an der tyrrhenischen und ligurischen Küste, im westlichen Mittelmeer, in Süd- und Nordwestportugal, im Nordostatlantik, in der Nordsee und in der Ostsee. Die Ergebnisse von Organismen, die entlang der adriatischen Küste gesammelt wurden, zeigten, dass 23 % der untersuchten Exemplare maximal 2 MP aufgenommen hatten, die meist aus Fragmenten bestanden und aus verschiedenen Polymeren wie Polyethylen (PE), Silikon, Gummi und Polyurethan hergestellt waren. Fast alle Organismen enthielten Mikrofasern, die meisten natürlichen Ursprungs.

Im Kattegat lag z.B. die MP-Konzentration im Oberflächenwasser bei 2 - 77 Partikeln pro m<sup>3</sup>; die häufigsten Polymerpartikel waren aus Polyester, Polypropylen und Polyethylen. In Zooplanktonproben schwankte MP-Konzentration zwischen 0 und 3 Partikeln pro m<sup>3</sup>, was auf eine nur sehr geringe Akkumulation von MP im Mesozooplankton

---

<sup>1</sup> Basierend auf: Regoli, F. (2023) RESPONSE – Towards a risk-based assessment of microplastic pollution in marine ecosystems. Final Report, submitted to JPI Oceans on December 2023.

<sup>2</sup> Keine Beteiligung der Universität Heidelberg an der Sammlung der MPs, jedoch Überprüfung der biologischen Wirksamkeit von Extrakten aus gemahlenem gestrandetem Plastik.

hinweist. Sedimentproben aus dem Nordostatlantik ergaben eine sehr niedrige MP-Konzentration im Vergleich zur Wassersäule und zu den wild lebenden Austern. Im Gegensatz dazu zeigten Proben im westlichen Mittelmeer deutlich andere Konzentrationen von MP in Oberflächenwasser, Wassersäule und Sediment, wobei Fasern insgesamt. Die MP-Proben wurden vor allem durch FT-IR-,  $\mu$ FT-IR- und  $\mu$ -Raman-Spektroskopie charakterisiert.

Um die Freisetzung von Schadstoffen von MPs zu erfassen, wurden Sickerwässer, die nach einem standardisierten und gemeinsamen Protokoll aus gestrandeten Materialien gewonnen wurden, mittels HPLC und GC-MS auf organische Schadstoffe und Spurenmetalle hin untersucht. Vorläufige Ergebnisse dokumentieren je nach Polymer die Fähigkeit der MP, sowohl polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe als auch aliphatische Kohlenwasserstoffe zu adsorbieren, wobei Polystyrol die höchsten Werte erzielte. Dabei wurden gestrandete Kunststoffe auf verschiedene Größenordnungen gemahlen (mikronisiert), um sie dann unter anderem in Heidelberg auf Effekte auf Meeresorganismen zu bewerten.

### **AP2: Biologisches Schicksal von Micro- und Nanoplastikpartikeln**

Um die Aufnahme, Kompartimentierung und Wirkung von MP in Meeresorganismen zu bewerten, wurden u.a. Untersuchungen mit Larven und adulten Muscheln, Quallen, erwachsenen Copepoden, Larven von Salinenkrebse, Medakas und Zebrafischen sowie Zellkulturen durchgeführt. Die verschiedenen Meeresorganismen zeigten eine unterschiedliche Akkumulationsrate: Bei Muscheln fand sich z.B. eine Akkumulation von Polyamid-Mikrofasern in der Mitteldarmdrüse gefunden, während Polyester- und Baumwollfasern nicht akkumulierten. Salinenkrebse Larven nahmen MP auf, die aus Kappen und biokompatiblen Polymeren (PVDF) stammten, während Quallen und Copepoden solche Partikel nicht internalisierten. Copepoden lehnten 80 % der MP ab, wenn diese mit den Mundwerkzeugen in Berührung kamen. Die hohen Ablehnungsraten von MP waren unabhängig von Art des Polymers, Form, Vorhandensein von Biofilmen oder adsorbiertem Schadstoff (Pyren), was darauf hindeutet, dass MP für Copepoden ungenießbar sind. Im Medaka wurden auch biologisch abbaubare Polymere angereichert. NPs induzierten Zytotoxizität in den verschiedenen Hämocyten-Subpopulationen von Muscheln (Apoptose; Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies). Weitere Effekte werden im nachfolgenden Bericht beschrieben.

### **AP3: Biomarker in ökologischen Risikoanalysen von Mikroplastikpartikeln**

Die Auswirkungen von MP, NP und MF in Meeresorganismen wurden in einer Reihe von biologischen Reaktionen (Biomarkern) bewertet, darunter molekulare, biochemische und zelluläre Parameter. In Miesmuscheln aus dem Mittelmeer wurden z.B. Veränderungen des Immunsystems, eine Störung des antioxidativen Systems und der Beginn zellulärer Veränderungen diagnostiziert. und das Fehlen von oxidativen Schä-

den an der DNA. Verschiedene Fraktionen aus gemahlene gestrandeten Plastikproben induzierten vielfältige Wirkungen in Fischzellkulturen und Embryonen des Zebrafisches (s. diesen Bericht).

#### **AP4: Bioassays in ökologischen Risikoanalysen von Mikro- und Nanoplastikpartikeln**

Bei Bioassays mit verschiedenen Modellorganismen wie Seeigel-Embryonen und Muscheln wurde eine mäßige Toxizität biologisch abbaubarer kommerzieller Kunststoffe und im Freiland gesammelter Kunststoff-sickerwässer festgestellt. In Langzeitexperimenten zeigten Seeigel-Embryonen nach Exposition gegenüber Mikro- und Nanopartikeln Veränderungen in Verhalten und Schwimmggeschwindigkeit. Im Medaka lösten Reifenpartikel-Sickerwasser keine Entwicklungsveränderungen aus, während sich Sickerwasser aus Reifenabriebpartikeln bei marinen Copepoden und drei Phytoplanktonarten als toxisch erweisen. Erhöhter Lichtintensität und hohe Temperatur verstärkten die Toxizität von Mikropartikeln auf Copepoden (erhöhte Aktivität der Tiere). In Fischzellkulturen und Embryonen des Zebrafisches lassen sich durch Extrakte aus mikronisiertem gestrandetem Plastik zwar nachweisen, jedoch nicht in umweltrelevanten Konzentrationsbereichen.

#### **AP5: Auswirkungen von Mikroplastik auf ökologische Funktionen**

In Mesokosmen wurden die Auswirkungen von verwittertem Mikroplastik auf Mikro- und Mesozooplanktongemeinschaften der Ostsee untersucht. Eine Studie über die Rolle der Algen bei der Verteilung und Bioverfügbarkeit von MP in der Küstenregion der zentralen Adria ergab, dass alle untersuchten Algenarten MP je nach Jahreszeit mit unterschiedlicher Fähigkeit einfangen, wobei wiederum Fasern dominierten.

#### **AP6: Weight-of-Evidence (WOE) Modell für Mikroartikel**

Um verschiedene Arten von Daten (Lines of Evidence, LOEs) zu integrieren, wurde ein quantitatives Weight-of-Evidence (WOE)-Modell entwickelt. Die betrachteten LOEs bewerten die Eigenschaften von MP und möglicherweise NP, die in Wasser, Sedimenten und Biota extrahiert werden, einschließlich Verweil-/Aufnahmezeiten, Bioverfügbarkeit von (de)sorbierten Schadstoffen, Synergien mit anderen Stressoren, Modulation chronischer Wirkungen auf zellulärer, organischer oder gemeinschaftlicher/ökologischer Ebene. Für jede LOE werden die Daten in spezifischen HQs zusammengefasst und in eine allgemeine WOE-Bewertung integriert. Die Entwicklung mathematischer Algorithmen und logischer Flussdiagramme wurde mit den von allen Partnern produzierten Daten validiert.

### **AP7: „Smart Hub“ der Analyseeinrichtungen**

In diesem Teil des Projekts sollten konventionelle und innovative Methoden zur Charakterisierung von MP und NP in Abhängigkeit von Partikelgröße, Form und Polymer-typ verglichen werden. Zu den bisher verwendeten konventionellen Methoden gehören Fluoreszenzfärbung, konfokale Mikroskopie, SEM unter Umweltbedingungen, dynamische Lichtstreuung, Coulter-Zählung, Durchflusszytometrie, FTIR und Raman-Spektroskopie. Zu den innovativeren Techniken gehören die Rasterelektronenmikroskopie, die Kleinwinkel-Röntgenstreuung und die Hyperspektralmikroskopie. Diese Techniken wurden in Zusammenarbeit mit anderen Universitäten und Forschungszentren wie der Universität Gent (Belgien), dem Politecnico di Milano und dem Synchrotron von Triest getestet. Unter anderem wurden die mit den MP und NP assoziierten Verunreinigungen und die Rolle der Kunststoffe als Überträger von Schadstoffen in den aus gestrandetem Material gewonnenen Sickerwässern untersucht, die im Hinblick auf organische Verunreinigungen und Spurenmetalle charakterisiert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass alle Kunststoffe sowohl polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe als auch aliphatische Kohlenwasserstoffe adsorbiert hatten; ein kg dieses Materials kann etwa 2 mg PAK und fast 1 g aliphatische Kohlenwasserstoffe freisetzen. Leider konnten die Harmonisierungs- und Schulungsaktivitäten aufgrund der Covid-Pandemie nicht umgesetzt werden.

### **AP8: Kommunikation und Verbreitung.**

Im November 2020 ging Projekt RESPONSE mit der Website <https://www.response-jpioceans.eu/> online. Die Kommunikation auf der Website wurde durch soziale Medien (Twitter und Facebook) unterstützt, um eine schnelle und effektive Korrespondenz über das Projekt zu ermöglichen. Auf der Projektwebsite wurde eine Broschüre zum Download bereitgestellt (<https://www.response-jpioceans.eu/multimedia>). Drei Newsletter wurden über die Projektwebsite und die sozialen Medien verbreitet. Es wurden zwei Workshops organisiert und diverse Informationsblätter erstellt. Die Projektergebnisse wurden durch Konferenzen, Workshops, wissenschaftliche und populäre Veröffentlichungen, Ausstellungen und Videos verbreitet. Viele Masterkandidaten und Doktoranden arbeiten an den Projekten mit.

## Short abstract of the entire RESPONSE project<sup>3</sup>

Due to the Covid-19 pandemic, the official start of the RESPONSE project was postponed from January to September 2020. However, a first virtual kick-off meeting took place in June 2020 to discuss relevant aspects of project implementation and management. The main responsibilities for the work packages (WPs) and cross-cutting activities were also defined. In the first months of the project, the WP leaders organized virtual meetings to discuss the objectives and coordinate the specific research initiatives for each work package (WP1-WP8). In September 2021, the first official (virtual) annual meeting was organized to present the activities carried out in each work package and coordinate the objectives for the second year of the project. In addition, virtual WP meetings were organized to present specific results and to plan joint activities between the partners involved in the same work package. In March 2023, another annual meeting was organized in Ancona, Italy. Finally, some RESPONSE partners presented the main results at the JPI Ocean final meeting, which took place in Galway in September 2023.

### WP1: Monitoring of microplastics in European coastal areas<sup>4</sup>

According to the project plan, systematic sampling was carried out to investigate the presence and distribution of microplastics (MP) in various abiotic and biotic environmental matrices (surface water, water column, sediments, organisms) using standardized methods and protocols. To be able to compare the results obtained in different regions, the same water filter system was used by all partners.

Sampling was carried out in different geographical areas, including the Adriatic Sea, the Tyrrhenian and Ligurian coasts, the western Mediterranean, southern and north-western Portugal, the north-eastern Atlantic, the North Sea and the Baltic Sea. The results of organisms collected along the Adriatic coast showed that 23% of the specimens examined had absorbed a maximum of 2 MP, which mostly consisted of fragments and were made of various polymers such as polyethylene (PE), silicone, rubber and polyurethane. Almost all organisms contained microfibers, most of which were of natural origin.

In the Kattegat, for example, the MP concentration in surface water was 2-77 particles per m<sup>3</sup>; the most common polymer particles were made of polyester, polypropylene and polyethylene. In zooplankton samples, the MP concentration varied between 0 and 3 particles per m<sup>3</sup>, indicating only very low accumulation of MP in mesozooplankton. Sediment samples from the Northeast Atlantic showed a very low MP concentration compared to the water column and wild oysters. In contrast, samples from the Western

---

<sup>3</sup> Based on: Regoli, F. (2023) RESPONSE – Towards a risk-based assessment of microplastic pollution in marine ecosystems. Final Report, submitted to JPI Oceans on December 2023.

<sup>4</sup> No involvement of the University of Heidelberg in the collection of MPs, but testing of the biological effectiveness of extracts from ground stranded plastics.

Mediterranean showed significantly different concentrations of MP in surface water, water column and sediment, with fibers accounting for the majority. The MP samples were characterized mainly by FT-IR,  $\mu$ FT-IR and  $\mu$ -Raman spectroscopy.

To assess the release of pollutants from MPs, leachates obtained from stranded materials according to a standardized and common protocol were analyzed for organic pollutants and trace metals by HPLC and GC-MS. Preliminary results document the ability of the MPs to adsorb both polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons, depending on the polymer, with polystyrene achieving the highest values. Stranded plastics were ground to different sizes (micronized) and then evaluated in Heidelberg, among other places, for their effects on marine organisms.

### **AP2: Biological fate of micro- and nanoplastic particles**

In order to assess the uptake, compartmentalization and effect of MP in marine organisms, studies were conducted with larvae and adult mussels, jellyfish, adult copepods, larvae of brine shrimp, medaka and zebrafish, as well as cell cultures. The various marine organisms showed different accumulation rates: in mussels, for example, polyamide microfibers were found to accumulate in the midgut gland, while polyester and cotton fibers did not accumulate. Brine shrimp larvae ingested MP derived from caps and biocompatible polymers (PVDF), whereas jellyfish and copepods did not internalize such particles. Copepods rejected 80% of the MP when they came into contact with the mouthparts. The high rejection rates of MP were independent of the type of polymer, shape, presence of biofilms or adsorbed pollutant (pyrene), suggesting that MP are not edible for copepods. Biodegradable polymers were also accumulated in medaka. NPs induced cytotoxicity in the different hemocyte subpopulations of mussels (apoptosis; production of reactive oxygen species). Further effects are described in the following report.

### **AP3: Biomarkers in ecological risk assessments of microplastic particles**

The effects of MP, NP and MF in marine organisms were evaluated in a series of biological responses (biomarkers), including molecular, biochemical and cellular parameters. In mussels from the Mediterranean, for example, changes in the immune system, a disruption of the antioxidant system and the onset of cellular changes were diagnosed. and the absence of oxidative damage to DNA. Various fractions from ground stranded plastic samples induced a wide range of effects in fish cell cultures and zebrafish embryos (see this report).

#### **AP4: Bioassays in ecological risk assessments of micro- and nanoplastics**

In bioassays with various model organisms such as sea urchin embryos and mussels, a moderate toxicity of biodegradable commercial plastics and plastic leachates collected in the field was detected. In long-term experiments, sea urchin embryos showed changes in behavior and swimming speed after exposure to micro- and nanoparticles. In medaka, tire particle leachate did not cause any developmental changes, whereas leachate from tire abrasion particles was toxic to marine copepods and three phytoplankton species. Increased light intensity and high temperature enhanced the toxicity of microparticles on copepods (increased activity of the animals). In fish cell cultures and zebrafish embryos, extracts of micronized stranded plastic can be detected, but not at environmentally relevant concentrations.

#### **AP5: Effects of microplastics on ecological functions**

The effects of weathered microplastics on micro- and mesozooplankton communities in the Baltic Sea were investigated in mesocosms. A study on the role of algae in the distribution and bioavailability of MP in the coastal region of the central Adriatic showed that all the algae species investigated capture MP with varying degrees of efficiency depending on the season, with fibers again dominating.

#### **AP6: Weight of Evidence (WOE) model for microplastics**

A quantitative weight-of-evidence (WOE) model was developed to integrate different types of data (lines of evidence, LOEs). The considered LOEs evaluate the properties of MP and possibly NP extracted in water, sediment and biota, including residence/uptake times, bioavailability of (de)sorbed contaminants, synergies with other stressors, modulation of chronic effects at cellular, organismic or community/ecological level. For each LOE, the data are summarized in specific HQs and integrated into a general WOE assessment. The development of mathematical algorithms and logical flow diagrams was validated with the data produced by all partners.

#### **WP7: “Smart Hub” of the analytical facilities**

In this part of the project, conventional and innovative methods for characterizing MP and NP depending on particle size, shape and polymer type were compared. Conventional methods used so far include fluorescence staining, confocal microscopy, SEM under environmental conditions, dynamic light scattering, Coulter counting, flow cytometry, FTIR and Raman spectroscopy. More innovative techniques include scanning electron microscopy, small-angle X-ray scattering and hyperspectral microscopy. These techniques have been tested in collaboration with other universities and research centers such as the University of Ghent (Belgium), the Politecnico di Milano and the Synchrotron of Trieste. Among other things, the impurities associated with the

MP and NP and the role of plastics as a carrier of pollutants in the leachates obtained from stranded material were investigated, which were characterized with regard to organic impurities and trace metals. The results showed that all plastics had adsorbed both polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons; one kg of this material can release about 2 mg of PAHs and almost 1 g of aliphatic hydrocarbons. Unfortunately, the harmonization and training activities could not be implemented due to the Covid pandemic.

#### **WP8: Communication and dissemination.**

In November 2020, the RESPONSE project went online with the website <https://www.response-jpioceans.eu/>. Communication on the website was supported by social media (Twitter and Facebook) to enable quick and effective correspondence about the project. A brochure was made available for download on the project website (<https://www.response-jpioceans.eu/multimedia>). Three newsletters were distributed via the project website and social media. Two workshops were organized and various information sheets were created. The project results were disseminated through conferences, workshops, scientific and popular publications, exhibitions and videos. Many master and doctoral students have been working on the projects.

## Inhalt

Kurzzusammenfassung des Gesamtprojekts RESPONSE	3
Short abstract of the entire RESPONSE project	7
Inhalt	11
Zusammenfassung des RESPONSE-Teilprojekts an der Universität Heidelberg	13
Summary of the RESPONSE sub-project at Heidelberg University	14
1. Einleitung und Aufgabenstellung	15
2. Ansatz des RESPONSE-Teilprojekts der Universität Heidelberg	16
3. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Aquatische Ökologie und Toxikologie an der Universität Heidelberg	16
4. Die wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse des Projekts RESPONSE	17
4.1 Biologisches Verhalten von Mikroplastikpartikeln und Nanoplastikpartikeln (AP2)	17
4.1.1 Auswahl der verwendeten Mikro- und Nanoplastikpartikel und Chemikalien	17
4.1.2 Nachweis der zellulären Aufnahme von Mikro- und Nanoplastik-Partikeln	18
4.2 Biomarker in ökologischen Risikoanalysen von Mikroplastikpartikeln (AP3)	20
4.3 Bioassays in ökologischen Risikoanalysen von Mikroplastikpartikeln und Nanoplastikpartikeln (AP 4)	29
5. Schlussfolgerungen aus den gewonnenen Ergebnissen	33
6. Arbeiten, die ausstehen bzw. zu keiner Lösung geführt haben	35
7. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	35
8. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	36
9. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	36
10. Bezug zu den förderpolitischen Zielen des BMBF	36
11. Liste der Bachelorarbeiten und Dissertationen, die bisher im Rahmen von RESPONSE entstanden sind	37
12. Liste der Publikationen der AG Aquatische Ökologie und Toxikologie an der Universität Heidelberg zum Thema Mikroplastik	38
13. Zitierte Literatur	40
14. Anlagen	43



## Zusammenfassung des RESPONSE-Teilprojekts an der Universität Heidelberg

Das vorliegende Projekt war Teil des im Rahmen von JPI Oceans geförderten Projekt RESPONSE („Towards a Risk-Based Assessment of Microplastic Pollution in Marine Ecosystems“): RESPONSE bündelte Fachwissen in den Bereichen Ozeanographie, Umweltchemie, Ökotoxikologie, experimentelle Ökologie und Modellierung, um wichtige Forschungsfragen zum Verbleib und zu den biologischen Auswirkungen von Mikroplastik (MP) und Nanoplastik (NP) in marinen Ökosystemen zu beantworten. Das Projekt identifizierte Akkumulationszonen in europäischen Küstenökosystemen und charakterisierte die vertikale Verteilung von MPs und NPs im Wasser und in Sedimenten. RESPONSE untersuchte den trophischen Transfer und die biologischen Auswirkungen in Mesokosmos- und Laborstudien. Ein technologischer Smart Hub sollte komplementäre Einrichtungen und Fachkenntnisse bündeln. Das übergeordnete Ziel von RESPONSE war die Entwicklung eines quantitativen Weight-of-Evidence-Modells (WOE) für MPs und NPs in der Meeresumwelt, um Daten zu integrieren und differenziert zu gewichten und so die Entwicklung von Überwachungsstrategien für MSFD zu unterstützen.

Die Aufgabe der Arbeitsgruppe Aquatische Ökologie und Toxikologie an der Universität Heidelberg bestand darin, (1) das Verhalten von MPs und NPs in Fischzellkulturen und frühen Embryonalstadien von Zebrafärblingen (*Danio rerio*) zu charakterisieren, (2) Biomarker und Bioassays für die ökologische Risikoanalyse von MPs und NPs mit zu entwickeln, (3) zu dem „Smart Hub“ von Analyseeinrichtungen beizutragen sowie (4) Daten für die Entwicklung des Weight-of-Evidence-Modells zu schaffen.

Die wichtigsten Befunde aus den Untersuchungen in Heidelberg lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) MPs werden innerhalb von Nahrungsketten weitergegeben und können so Mikroschadstoffe in Organismen eintragen;
- (2) die Belastung von Organismen durch Mikroschadstoffe wird durch MPs insgesamt aber nicht erhöht; vielmehr führt die Einstellung ein neues Verteilungsgleichgewichts zu einer Umverteilung der Mikroschadstoffe im System;
- (3) auch schadstoffbelastete NPs können in höheren Konzentrationen zu einer erhöhten Cytotoxizität führen, wobei die Partikel selbst nicht toxisch sind;
- (4) Aufnahme und Wirkung von Mikroschadstoffen in Zellen können auch mit Hilfe von Zellkulturen (aus Fischen) und in frühen (rechtlich ungeschützten) Embryonalstadien von Fischen untersucht werden;
- (5) Sehr kleine MPs und NPs können prinzipiell mit STED (Stimulated Emission Depletion)-Mikroskopie nachgewiesen werden (Untersuchungen noch nicht abgeschlossen);
- (6) Untersuchungen zur Wirkung von Hexanextrakten gestrandeter und mikronisierter Plastikproben mit Hilfe von Zellkulturen und Fischembryonen zeigen zwar durchaus Effekte auf die DNA, Enzyme (Cytochrom P450, Ethoxyresorufin-O-Deethylase, Acetylcholinesterase), den Redoxstatus und das Verhalten von Embryonen, jedoch nicht in umweltrelevanten Konzentrationen.

Personalprobleme und die Covid-Pandemie führten dazu, dass zum Ende der Projektlaufzeit noch nicht alle Arbeitspakete abgeschlossen werden konnten. Einige Experimente laufen noch und die Daten werden nachgereicht.

## Summary of the RESPONSE sub-project at Heidelberg University

This project was part of the JPI Oceans-funded project RESPONSE (“Towards a Risk-Based Assessment of Microplastic Pollution in Marine Ecosystems”): RESPONSE brought together expertise in oceanography, environmental chemistry, ecotoxicology, experimental ecology and modeling to answer key research questions on the fate and biological impacts of microplastics (MP) and nanoplastics (NP) in marine ecosystems. The project identified accumulation zones in European coastal ecosystems and characterized the vertical distribution of MPs and NPs in water and sediments. RESPONSE investigated trophic transfer and biological effects in mesocosm and laboratory studies. A technological smart hub was to bring together complementary facilities and expertise. The overall objective of RESPONSE was to develop a quantitative weight-of-evidence (WOE) model for MP and NP in the marine environment to integrate and differentially weight data to support the development of monitoring strategies for the MSFD.

The task of the Aquatic Ecology and Toxicology group at the University of Heidelberg was (1) to characterize the behavior of MPs and NPs in fish cell cultures and early embryonic stages of zebrafish (*Danio rerio*), (2) to co-develop biomarkers and bioassays for the ecological risk analysis of MPs and NPs, (3) to contribute to the “Smart Hub” of analytical facilities and (4) to generate data for the development of the weight-of-evidence model.

The most important findings from the studies in Heidelberg can be summarized as follows:

- (1) MPs are passed on within food chains and can thus introduce micropollutants into organisms;
- (2) the burden of micropollutants on organisms is not increased overall by MPs; rather, the adjustment of a new distribution equilibrium leads to a redistribution of micropollutants in the system;
- (3) NPs contaminated with pollutants can also lead to increased cytotoxicity in higher concentrations, although the particles themselves are not toxic;
- (4) Uptake and effect of micropollutants in cells can also be investigated using cell cultures (from fish) and in early (legally unprotected) embryonic stages of fish;
- (5) Very small MPs and NPs can in principle be detected using STED (Stimulated Emission Depletion) microscopy (studies not yet completed);
- (6) Studies on the effect of hexane extracts of stranded and micronized plastic samples using cell cultures and fish embryos show effects on DNA, enzymes (cytochrome P450, ethoxyresorufin-O-deethylase, acetyl-cholinesterase), the redox status and the behavior of embryos, but not in environmentally relevant concentrations.

Staffing problems and the Covid pandemic meant that not all work packages could be completed by the end of the project period. Some experiments are still ongoing and the data will be submitted later.

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Im Rahmen des RESPONSE-Projekts übernahm die Universität Heidelberg bestimmte Teilaufgaben, um mögliche Effekte von Mikroplastik- (MP) und Nanoplastikpartikel (NP) auf aquatische Organismen zu untersuchen. Der Fokus der Untersuchungen liegt hierbei vor allem auf der Funktion der Partikel als Vektor für organische Schadstoffe, die an die Partikeloberfläche adsorbieren und durch die Aufnahme der Partikel in die Organismen gelangen können. Als Modellorganismus hierfür wurden der Zebrafärb-ling (*Danio rerio*) sowie verschiedene Zellkulturmodelle verwendet, wobei für die *In vivo*-Experimente hauptsächlich Embryonen eingesetzt wurden.

Die Universität Heidelberg war zusammen mit weiteren Projektpartnern an vier unterschiedlichen Arbeitspaketen (AP) des Projekts beteiligt:

AP2: Biologisches Verhalten von Mikro- und Nanoplastikpartikeln;

AP3: Biomarker in ökologischen Risikoanalysen von Mikroplastikpartikeln;

AP4: Bioassays in ökologischen Risikoanalysen von Mikro-/Nanoplastikpartikeln;

AP7: „Smart Hub“ von Analyseeinrichtungen.

Dem Projektantrag entsprechend konnten die Aufgaben an der Universität Heidelberg folgendermaßen zusammengefasst werden:

- 1) Untersuchung der Auswirkung von Nanoplastikpartikeln sowie die Identifikation von Desorptionsbedingung Nanoplastikpartikel-assoziiertes Schadstoffe unter physiologischen Bedingungen;
- 2) Untersuchung möglicher Effekte von feldgesammelten Mikroplastikpartikel-Proben, die von den Projektpartnern zur Verfügung gestellt werden;
- 3) Entwicklung von Methoden, um die Aufnahme und die Verteilung von Nanoplastikpartikeln zu verfolgen;
- 4) Versuch, eine Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe der Beitrag von Mikro- und Nanoplastikpartikeln zur Aufnahme von organischen Schadstoffen abgeschätzt werden kann.

Der offizieller Projektbeginn wurde auf den 01.01.2020 festgelegt. Da aber erst zum 01.10.2020 mit Florian Walter ein geeigneter Doktorand eingestellt werden konnte und Laborarbeiten aufgrund der Corona-Pandemie zunächst nur sehr eingeschränkt möglich waren, konnten die Laborarbeiten erst im Februar 2021 aufgenommen werden.

Im Oktober 2021 wurde leider ein Personalwechsel notwendig, da Florian Walter beschloss, das Projekt zu verlassen, um ein Zweitstudium aufzunehmen. An seiner Stelle konnte nach Rücksprache mit dem Projektträger Dr. Patrick Heinrich für die Mitarbeit im Projekt gewonnen werden. Da aber aufgrund der Corona-Situation im Winter 2021/2022 abermals nur ein stark eingeschränkter Laborbetrieb möglich war, konnten die laborexperimentellen Arbeiten erst im April 2022 wieder aufgenommen werden.

In dem Versuch, die durch die genannten Gründe entstandene Verzögerung der Arbeiten aufzuholen, wurde am 01.05.2023 Lisa Bauer als weitere Mitarbeiterin für das Projekt gewonnen. Ihre Finanzierung erfolgt aus Eigenmitteln der Universität Heidelberg; sie wird ihre Dissertation im Laufe des Jahres 2025 abschließen. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen zur Wirkung von Nanopartikeln auf Embryonen des Zebraabärblings werden dem BMBF zu gegebener Zeit in Kurzform nachgereicht werden.

## **2. Ansatz des RESPONSE-Teilprojekts der Universität Heidelberg**

An der Universität Heidelberg werden vor allem verschiedene Lebensstadien des Zebraabärblings (*Danio rerio*) als sehr gut untersuchtem Modellorganismus dazu eingesetzt, das Schicksal sehr kleiner Mikro- und Nanoplastikpartikel näher zu untersuchen, wobei unterschiedliche mikroskopische und elektronenmikroskopische Techniken eingesetzt werden, um den Weg der Mikro- und Nanoplastikpartikeln zu verfolgen (RESPONSE WP2.5). Besonderes Augenmerk wird dabei auch auf den Einfluss spezifischer physiologischer Bedingungen im Darm von Fischen gelegt, die zur Ablösung von Mikroschadstoffen von MPs und NPs führen (RESPONSE WP2.6, WP2.8). Die Befunde aus den Laboruntersuchungen am Zebraabärbling werden auch direkt in WP3 (RESPONSE; Biomarker) und WP6 (RESPONSE; Weight-of-Evidence-Modell) eingespeist. In Kooperation mit den Projektpartnern werden an embryonalen Entwicklungsstadien auch Verhaltensparameter erhoben (RESPONSE WP4.3), um daraus evtl. für Mikro- und Nanoplastikpartikel relevante Bioassays zu entwickeln.

## **3. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Aquatische Ökologie und Toxikologie an der Universität Heidelberg**

Im Rahmen des von JPI Oceans („Joint Programming Initiative Healthy and Productive Seas and Oceans“) vom BMBF geförderten Forschungsprojekt Ephemare („Verbundprojekt: JPI-0 Microplastic - EPHEMARE: Ökotoxikologische Effekte von Mikroplastik in marinen Ökosystemen; Vorhaben: Mikroplastik in einfachen Modell-Nahrungsketten“; FKZ 03F0735A) sowie des ebenfalls vom BMBF innerhalb von RiSKWa („Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“) geförderten Forschungsprojekts MiWa („Mikroplastik im Wasserkreislauf – Probenahme, Probenbehandlung, Analytik, Vorkommen, Entfernung und Bewertung“; FKZ 02WRS1378J) konnte von der Arbeitsgruppe Aquatische Ökologie und Toxikologie an der Universität Heidelberg u.a. gezeigt werden, dass

- (1) Mikroplastikpartikel innerhalb von Nahrungsketten weitergegeben und dabei in der Lage sind, Mikroschadstoffe in Organismen einzutragen (Batel et al. 2016, Batel et al. 2018);
- (2) die Belastung von Organismen durch Mikroschadstoffe durch Mikroplastikpartikel insgesamt aber nicht erhöht wird (Batel et al. 2018), da es im Rahmen der

Einstellung eines Verteilungsgleichgewichts lediglich zu einer Umverteilung der Mikroschadstoffe im System kommt;

- (3) die Aufnahme von Mikroschadstoffen in Zellen auch mit Hilfe von Zellkulturen (aus Fischen) untersucht werden kann (Heinrich and Braunbeck 2018a, c, b);
- (4) in *In vitro*-Verfahren sowie mit Alternativmethoden zu konventionellen Experimenten mit Fischen hochempfindliche Nachweismethoden für die biologischen Wirkungen von Mikroschadstoffen entwickelt werden können (Heinrich et al. 2014, Kais et al. 2015); sowie
- (5) mit Hilfe von *In vitro*-Verfahren der Einfluss diverser Randparameter auf die Aufnahme von Mikroschadstoffen in zelluläre Systeme manipuliert werden kann (Heinrich et al. 2014, Heinrich and Braunbeck 2019).

Der insgesamt wichtigste Befund im Zusammenhang mit dem Forschungsprojekt RESPONSE dürfte damals die Erkenntnis gewesen sein, dass für die Translokation von Mikroplastikpartikeln sowie die Auslösung biologischer Effekte vor allem sehr kleine Mikroplastikpartikel mit einem Durchmesser von  $< 3 - 5 \mu\text{m}$  in Frage kommen (Batel et al. 2016), was auch in einem Review zur Relevanz von Nano- und Mikroplastikpartikeln in limnischen Systemen bestätigt werden konnte (Tribskorn et al. 2019).

## **4. Die wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse des Projekts RESPONSE**

### **4.1 Biologisches Verhalten von Mikroplastikpartikeln und Nanoplastikpartikeln (AP2)**

Das Ziel dieses Arbeitspakets war u.a., die Aufnahme und Verteilung von Schadstoff-assoziierten Nanoplastikpartikeln sowie die Desorption der jeweiligen Verbindungen im Verdauungstrakt von Fischen sowie in Zellkultursystemen näher zu charakterisieren. Die Nanoplastikpartikeln und die Schadstoffe sollen dabei mithilfe geeigneter Mikroskopie-Methoden sichtbar gemacht bzw. indirekt nachgewiesen und intrazellulär lokalisiert werden. Durch den Weggang von Florian Walter kamen diese Arbeiten zunächst ins Stocken, werden aber nun von Lisa Bauer fortgeführt.

#### **4.1.1 Auswahl der verwendeten Mikro- und Nanoplastikpartikel und Chemikalien**

Bei den eingesetzten Nanoplastik-Partikeln handelt es sich um eine Auswahl kommerziell verfügbarer Produkte mit verschiedenen Eigenschaften. Als Substitut für „natürliches“ Nanoplastik wurden Polystyrol-Mikro- und Nanopartikel von Polysciences Inc. in verschiedenen Größenbereichen (1000 nm, 350 nm und 50 nm, Größenvariationskoeffizienten zw. 1 und 15 %) gewählt, die nach ihrer Aufnahme in Zellen und Gewebe durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Nilrot gefärbt und als Aggregate in

Zellorganellen nachgewiesen werden sollten. Da für dieses neuartige Verfahren geeignete Kontrollen benötigt werden, kamen zudem weitere, inhärent fluoreszenzgefärbte Partikel des Anbieters Sigma-Aldrich von vergleichbarer Größe (30 und 1000 nm) zum Einsatz.

Neben diesen industriell hergestellten Partikeln wird im Rahmen des Projekts ebenfalls die Wirkung von im Feld gesammelten Mikroplastikproben untersucht. Diese wurden im Rahmen der europaweiten Projektkooperation von Response durch Dr. Maura Benedetti (Universität Ancona) Ende Mai 2022 zur Verfügung gestellt und lagen in drei Größenkategorien fraktioniert vor: 20 - 50 µm, 100 - 200 µm und 500 - 1000 µm.

Mit eben diesen unter realistischen Bedingungen in der Umwelt gealterten Partikeln wurden unter anderem Sorptionsexperimente mithilfe einer bereits etablierten Methode (Heinrich and Braunbeck, 2019) auf ihre Befähigung hin untersucht, Schadstoffe unterschiedlicher Lipophilie zu binden und diese unter organismennahen Bedingungen *in vitro* wieder abzugeben. Da der verwendete Biotest nur in der Lage ist, Stoffe mit einem bestimmten Wirkmechanismus (Dioxin-ähnliche Wirksamkeit bzw. Arylhydrocarbonrezeptor-Agonisten) nachzuweisen, wurde hier wieder auf eine bereits bewährte Auswahl mit relevanter Lipophilie zurückgegriffen (Tab. 1).

Tab. 1: Modellschadstoffe, die nach Bindung an natürlich gealtertes Mikroplastik auf ihre Bioverfügbarkeit im Zellkultursystem untersucht wurden. Die unterschiedliche Lipophilie (hier ausgedrückt als Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, logK<sub>OW</sub>) deckt den für die postulierte Schadstoffvektorfunktion von Mikroplastik relevanten Bereich ab (vgl. Gouin et al., 2011).

Substanz	CAS-Nummer	logK <sub>OW</sub>
β-Naphthoflavin	6051-87-2	4,68
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthen	207-08-9	6,11
2,3,7,8-Tetrachloro- <i>p</i> -dibenzodioxin (TCDD)	1746-01-6	6,80

#### 4.1.2 Nachweis der zellulären Aufnahme von Mikro- und Nanoplastik-Partikeln

Da sich herausgestellt hat, dass die ursprünglich vorgesehene Mikroskopiermethode über die Autofluoreszenz verschiedener Schadstoffe hohe instrumentelle Anforderungen an das Detektionsequipment sowie daraus abgeleitet höchstwahrscheinlich eine für umweltrelevante Konzentrationsbereiche nicht annähernd ausreichende Empfindlichkeit aufweist, wurde zur Färbung der zellulär aufgenommenen Partikel auf die Nilrot-Methode zurückgegriffen, die sich bereits zur Analyse von Mikroplastik in komplexen Umweltproben (z.B. Sand) bewährt hat. Eine Neuerung bei diesem Ansatz war es, dass die Färbung der Partikel erst nach ihrer (vermuteten) Aufnahme in das Gewebe bzw. einzelne Zellen stattfindet, was – wie sich im Nachhinein herausgestellt hat - zu

Problemen durch die Färbung intrazellulärer Kompartimente (insbesondere Lipidtröpfchen) führte. Bei der Unterscheidung von Plastikpartikeln am dabei die solvatochromatische Eigenschaft des Nilrot-Farbstoffes zum Tragen, dessen Emissionswellenlänge stark von der Polarität seiner Mikroumgebung beeinflusst wird. Teo et al. (2021) konnten mit diesem Ansatz die Lipidverteilung in Nervengewebe erfolgreich bildgebend analysieren, wobei die Polaritätsunterschiede von Membranlipiden deutlich unter denen liegen, die zwischen den meisten Polymeren und intrazellulären Lipiden zu erwarten sind, weshalb dieses Konzept einen vielversprechenden Ansatz für einen Nachweis der zellulären Aufnahme ungefärbter Mikroplastik-Partikel darstellt. Als Kontrollen für diesen Versuch wurden kommerziell verfügbare grün fluoreszierende Partikel verwendet.

Neben der in aller Regel fehlenden Fluoreszenz umweltrelevanter Partikel stellen die bekannten physikalischen Grenzen bildgebender Lichtmikroskopie (Abbe-Limit) ein wesentliches Problem beim Nachweis von Nanoplastik dar. Leider ist es daher unmöglich, mit konventionellen Methoden einzelne Partikel kleiner etwa 400 nm bildgebend aufzulösen. Der Nachweis solcher kleiner Polymerfragmente erfolgte daher nicht auf der Ebene einzelner Partikel, sondern intrazellulärer Aggregate (i.d.R. in Phago(lyso)somen), wie sie bereits in verschiedenen Arbeiten mit Nanoplastik nachgewiesen wurden (z.B. Banerjee et al., 2021). Hierfür kam wiederum die Nilrot-Färbung (s.o.) zum Einsatz (Abb. 1), wobei hier nicht mehr auf die bekannte Partikelgröße zur Identifikation von aufgenommenem Plastik zurückgegriffen werden kann. Dementsprechend wird hierfür eine einfache spektrometrische Analyse durch eine ratiometrische Auswertung konfokalmikroskopischer Aufnahmen mit zwei verschiedenen Emissionsfiltern vorgesehen.

Durch die erheblichen technischen Herausforderungen beim Nachweis der zellulären Aufnahme liegen in diesem Arbeitspaket bisher noch keine abschließenden publikationsfähigen Ergebnisse vor. Bisher wurde die grundsätzliche Eignung des Zellkulturmodells für Partikelstudien mittels der fluoreszierenden Kontrollpartikel belegt, Nilrot-Emissionsspektren in Anwesenheit verschiedener Polymere wurden aufgenommen, und das Ausmaß der zellulären Hintergrundfärbung durch Nilrot wurde evaluiert (Abb. 1), was den Ansatz wenig zielführend erscheinen ließ. Mit einem vorläufigen Protokoll wurde ein erster Satz permanent fixierter Objektträger vorbereitet, dessen (spektral)konfokalmikroskopische Analyse noch aussteht, woraufhin voraussichtlich eine weitere Optimierung des Färbungsverfahrens (v.a. Differenzierung) notwendig sein dürfte, bevor mit der neuen Methode valide Daten produziert werden können.

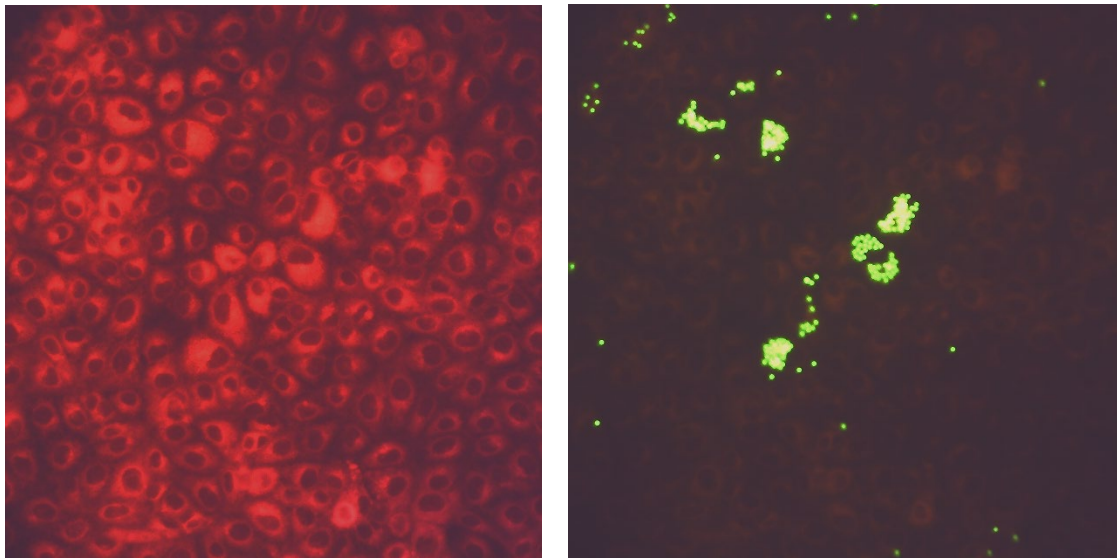


Abb. 1: Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot gefärbte ZF-L-Zellen in Anwesenheit von 2 µm großen, grün fluoreszierenden Polystyrol-Mikropartikeln (links: Ex. 546/12 nm, Em. 590 nm LP, rechts: Ex. 470/20 nm, Em. 515 nm LP). Eine starke Färbung des Zellhintergrunds durch die enthaltenen Lipide ist erkennbar; zudem zeigt sich eine stark heterogene Phagozytosekapazität zumindest einiger in der Kultur enthaltenen Zellen zumindest für die hier verwendeten kommerziellen 2 µm großen Polystyrol-Mikropartikel.

Im Juni 2024 sollen die Experimente zur Verfolgung der Aufnahme und Verteilung einzelner Nanoplastikpartikel kleiner als 400 nm in Zebrafischembryonen weitergeführt werden, vor allem im Hinblick für eine spätere Anwendung in adulten Fischen. Um das Abbe-Limit zu umgehen, soll die STED (*Stimulated Emission Depletion*)-Mikroskopie verwendet werden, mit der sich einzelne Partikel bis herunter zu 20 nm Größe auflösen lassen. Zu diesem Zweck wurde eine Kooperation mit dem EMBL (European Molecular Biology Laboratory) in Heidelberg vereinbart, welches über ein geeignetes Mikroskop verfügt. Ein erstes Experiment hat die prinzipielle Eignung der kommerziell erworbenen NP-Partikel und die Aufnahme der Partikel in den Darm der Zebrafischembryonen gezeigt. Allerdings hat sich auch gezeigt, dass die Embryonen aufgrund ihrer Größe nicht als Ganzes für die STED-Mikroskopie geeignet sind. In zukünftigen Experimenten sollen deshalb Mikrotom-, Kryotom- und Vibratomschnitte des Darms angefertigt und anschließend mit der STED-Mikroskopie auf Nanoplastikpartikel untersucht werden. Die Befunde aus diesen Untersuchungen werden dem Projektträger baldmöglichst nachgereicht werden.

#### **4.2 Biomarker in ökologischen Risikoanalysen von Mikroplastikpartikeln (AP3)**

Hauptaugenmerk in diesem Arbeitspaket lag in der Bewertung des toxischen Potenzials von in der Umwelt vorkommendem Mikroplastik sowie der daran gebundenen Schadstoffe. Da bekannt ist, dass unter realistischen Bedingungen nur ein Bruchteil

der insgesamt gebundenen Schadstoffe für die meisten Organismen bioverfügbar ist, muss hier eine klare Unterscheidung zwischen einem für die meisten Fälle relevanten Szenario und einem absoluten Worst-case-Szenario unterschieden werden. Ersteres wird erreicht, indem die im Verbundprojekt gesammelten und aufbereiteten Umweltproben möglichst nativ mit biologischen Systemen in Kontakt gebracht werden, und zweiteres indem durch organische Extraktion die an diesen Partikeln anhaftenden Schadstoffe vollständig abgelöst und daraufhin auf ihre Wirkung hin untersucht werden. Diese Aspekte werden im Rahmen einer abgeschlossenen Bachelorarbeit von Svenja Meienburg untersucht.

Da die im Feld gesammelten Partikelproben erst Ende Mai 2022 geliefert wurden, wurden die toxikologischen Untersuchungen der Partikel und -extrakte erst zu einem späten Zeitpunkt der Projektlaufzeit durchgeführt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach organischer Extraktion mit Hexan und bei einer maximal messbaren Extraktkonzentration von 50 mg/ml zwar dioxinähnlich wirksame Schadstoffe auf den Partikeln nachweisbar sind, jedoch verglichen mit Sedimenten eher geringen bis mäßigen absoluten Mengen (Tab. 2).

Tab. 2: Menge an dioxinähnlich wirksamen Schadstoffen in Hexan-Extrakten der von den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellten, im Feld gesammelten Partikelproben, bestimmt mit dem hochsensitiven in vitro EROD-Assay mit RTL-W1-Zellen und ausgedrückt als Benzo(k)fluoranthren-Äquivalent pro mg Plastikmaterial (n = 3)

	<b>Kleine MPs</b> (20 - 50 µm)	<b>Mittlere MPs</b> (100 - 200 µm)	<b>Große MPs</b> (500 - 1000 µm)
<b>Benzo(k)fluoranthren-Äquivalente (pg/mg MP)</b>	322.77 ± 92.6	112.84 ± 16.11	248.23 ± 11.41

Da die Analyse der organischen Extrakte nur ein „Worst-case“-Szenario abbildet und nicht in der Lage ist, die Desorption unter umweltrelevanten Bedingungen nachzustellen, wurden weitere Zellkulturexperimente durchgeführt, in deren Rahmen die Partikel unverändert ohne vorherige Behandlung in das Zellkultur-System eingebracht wurden und mithilfe der zuvor bestimmten Menge an insgesamt anhaftenden Induktoren (Tab. 2) wurde eine prozentuale Bioverfügbarkeit der Kontaminanten berechnet (Tab. 3).

Die Ergebnisse belegen, dass die Größe der Partikel einen maßgeblichen negativen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der anhaftenden Substanzen besitzt; die an die kleinste Partikelfraktion (20 - 50 µm) anhaftenden Schadstoffe waren mit einem theoretischen Wert von 129 % praktisch vollständig bioverfügbar, während diejenigen der größten Fraktion (500 - 1000 µm) nur zu etwa 6 % verfügbar waren. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich vorwiegend um ein klassisches Oberflächensorp-

tionsphänomen handelt. Dennoch sollte betont werden, dass auch die Extraktionseffizienz der kleinen Partikel höher war, was belegt, dass auch Sorption in die und aus der Partikelmatrix eine wesentliche Rolle spielen.

Tab. 3: Relative Bioverfügbarkeit (%) der an den Referenzpartikeln anhaftenden dioxin-ähnlich wirksamen Schadstoffe im *in vitro* System, bestimmt über die EROD-Induktion in RTL-W1 Zellen. Die in nativer Form bioverfügbaren Schadstoffmengen wurden ins Verhältnis mit den insgesamt enthaltenen (bzw. mit Hexan extrahierbaren, vgl. Tab. 1) Schadstoffmengen gesetzt.

	Im Feld gesammelte RESPONSE Referenzpartikel (native Exposition <i>in vitro</i> )		
	Klein	Mittel	Grob
	20 – 50 µm	100 – 200 µm	500 – 1000 µm
Bioverfügbarkeit dioxinähnlich wirksamer Schadstoffe (korrigiert für Extraktionseffizienz)	128.8 ± 37.0 %	77.0 ± 11.0 %	5.9 ± 0.3 %

Bei früheren vergleichbaren Experimenten mit frisch synthetisierten, kommerziellen und unter kontrollierten Bedingungen mit stark lipophilen Induktoren beladenen HDPE-Partikeln hatte sich herausgestellt, dass nur ein geringer Bruchteil (ca. 2 - 5 %, Heinrich 2019) der gebundenen Schadstoffe im Testsystem bioverfügbar ist; im direkten Vergleich mit diesen Daten waren die bioverfügbaren Anteile der im Feld gesammelten Partikel durchgehend höher. Zwar ist der Grund für diese Beobachtung nicht abschließend geklärt, jedoch lässt sich vermuten, dass sich die Komplexität und Zusammensetzung der anhaftenden, in der Umwelt akkumulierten Schadstoffe deutlich von dem einfachen ein-Substanz-Modell mit Benzo(k)fluoranthen unterscheidet, sodass modulierende Misch- und Sorptionseffekte auftreten, die nur mit hoch-aufwändigen kombinatorischen Experimenten nachgestellt werden könnten.

Einen bisher nur rudimentär untersuchten Aspekt stellt die natürliche Alterung des Mikroplastiks unter natürlichen Umweltbedingungen und deren Auswirkung auf die Vektorfunktion dar. Chemische Analysen haben gezeigt, dass es v.a. durch Oxidation, Carboxy- und Hydroxylierung der Polymerketten (Brandon et al., 2016) zu einer Zunahme der Polarität kommt, was der Theorie nach einen erheblichen Einfluss auf die Vektorfunktion für Schadstoffe haben sollte. Um dies näher zu untersuchen, werden die oben beschriebenen, zuvor mit Hexan extrahierten Partikel mit dem Modellschadstoff Benzo(k)fluoranthen beladen und anschließend auf ihre native Bioverfügbarkeit hin untersucht und mit älteren Daten mit fabrikneuen Polyethylenpartikeln verglichen (Tab. 4).

Tab. 4: Bioverfügbarkeit von Benzo(k)fluoranthen (10 pg BkF pro g MP) nach Beladung der in der Umwelt gealterten und mit Hexan extrahierten Referenzpartikel des Projekts bzw. von fabrikneuen HDPE-Partikeln, quantifiziert mit dem hochsensitiven *In vitro*-EROD Assay mit RTL-W1 Zellen

	Typ	Größe (µm)	Bioverfügbarkeit
Im Feld gesammelte <b>RESPONSE Referenzpartikel</b> (native Exposition <i>in vitro</i> )	Klein	20 – 50	7.0 ± 1.5 %
	Mittel	100 – 200	1.8 ± 0.8 %
	Grob	500 – 1000	0.9 ± 0.8 %
Fabrikneue <b>kommerzielle HD-Polyethylen-Partikel</b>	Unbehandelt	20 – 25	2.0 ± 0.6 %
	Hexan-behandelt (vor BkF-Beladung)	20 – 25	3.1 ± 0.9 %

Auch in diesem Experiment bestätigte sich in erster Linie die Abhängigkeit der Bioverfügbarkeit von der Größe der Partikel, wenngleich die absoluten Werte der BkF-Bioverfügbarkeit deutlich unter den Werten der komplexen, in der Umwelt akkumulierten Schadstoffmatrix lagen (1 - 7 %) und mit denen von fabrikneuen Polyethylen-Partikeln vergleichbar waren (2 - 3 %). Dies lässt den Schluss zu, dass die Alterung der Partikel (unter bei den hier im Feld gesammelten zugegebenermaßen unkontrollierten und unbekanntem Bedingungen) keine erhebliche Auswirkung auf das Sorptionsverhalten hat, und die Partikelgröße einen bei weitem größeren Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der anhaftenden Substanzen hat.

Bei der Interpretation ist zu beachten, dass es sich beim hier verwendeten Modellschadstoff BkF um einen hoch-lipophilen Stoff handelt, der in früheren Experimenten eine nur (mit den vorliegenden Daten vergleichbar) geringe Bioverfügbarkeit aufgewiesen hat und sich hierin mit hoher Wahrscheinlichkeit in seinem Sorptionsverhalten von der komplexen Zusammensetzung der in der Umwelt akkumulieren Substanzen unterscheidet.

Deutliche zytotoxische Effekte wurden bei Exposition der Partikelextrakte in den bis hierhin durchgeführten Versuchen mit Forellenzellen nicht beobachtet (Details nicht gezeigt); dennoch schien es auf Grundlage der vorliegenden Daten sinnvoll, weitere toxikologische Endpunkte (Induktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie Gentoxizität) zumindest in den organischen Extrakten zu untersuchen, was im Rahmen einer weiteren Bachelorarbeit durch Jule Baum erfolgt ist.

Aufgrund der unzureichenden Menge an Probenmaterial konnte die Zytotoxizität gegenüber Zebrafisch-Leberzellen (ZF-L) nur in einem Durchgang bestimmt werden. (Tab. 5). Auch hier war wieder eine deutliche negative Korrelation zwischen Toxizität

und Partikelgröße erkennbar; die Zytotoxizität kann als schwach bis mäßig klassifiziert werden.

Tab. 5: Zytotoxizität von Hexan-Extrakten der Projekt-Referenzpartikel. Angegeben sind Konzentrationen (Mikroplastik-Äquivalente, MPEQ), die die Viabilität der Zellen auf 80 bzw. 50 % (NR<sub>80/50</sub>) der Negativkontroll-Werte verringern. Aufgrund der geringen Menge an zur Verfügung stehendem Testmaterial konnte der Test nur einmal durchgeführt werden (n = 1).

	<b>Kleine MP</b> (20-50 µm)	<b>Mittlere MP</b> (100 – 200 µm)	<b>Grobe MP</b> (500 – 1000 µm)
NR <sub>50</sub>	27.73 mg MPEQ/ml	> 50 mg MPEQ/ml	> 50 mg MPEQ/ml
NR <sub>80</sub>	9.04 mg MPEQ/ml	40.92 mg MPEQ/ml	> 50 mg MPEQ/ml

Eine Induktion von oxidativem Stress in Leberzellen aus dem Zebrafisch konnte durch die Extrakte nicht nachgewiesen werden; im Gegenteil verursachten die verschiedenen Proben praktisch durchgehend eine Reduktion Signals und damit des oxidativen Stresses im DHR123-Assay bei mehreren Konzentrationen und Belastungsdauern (Abb. 2).

Mit Hilfe des alkalischen Comet-Assays mit ZF-L-Zellen konnte in Abhängigkeit von der Größe der extrahierten Partikel eine meist hoch signifikante Induktion von DNA-Schäden nachgewiesen werden (Abb. 3).

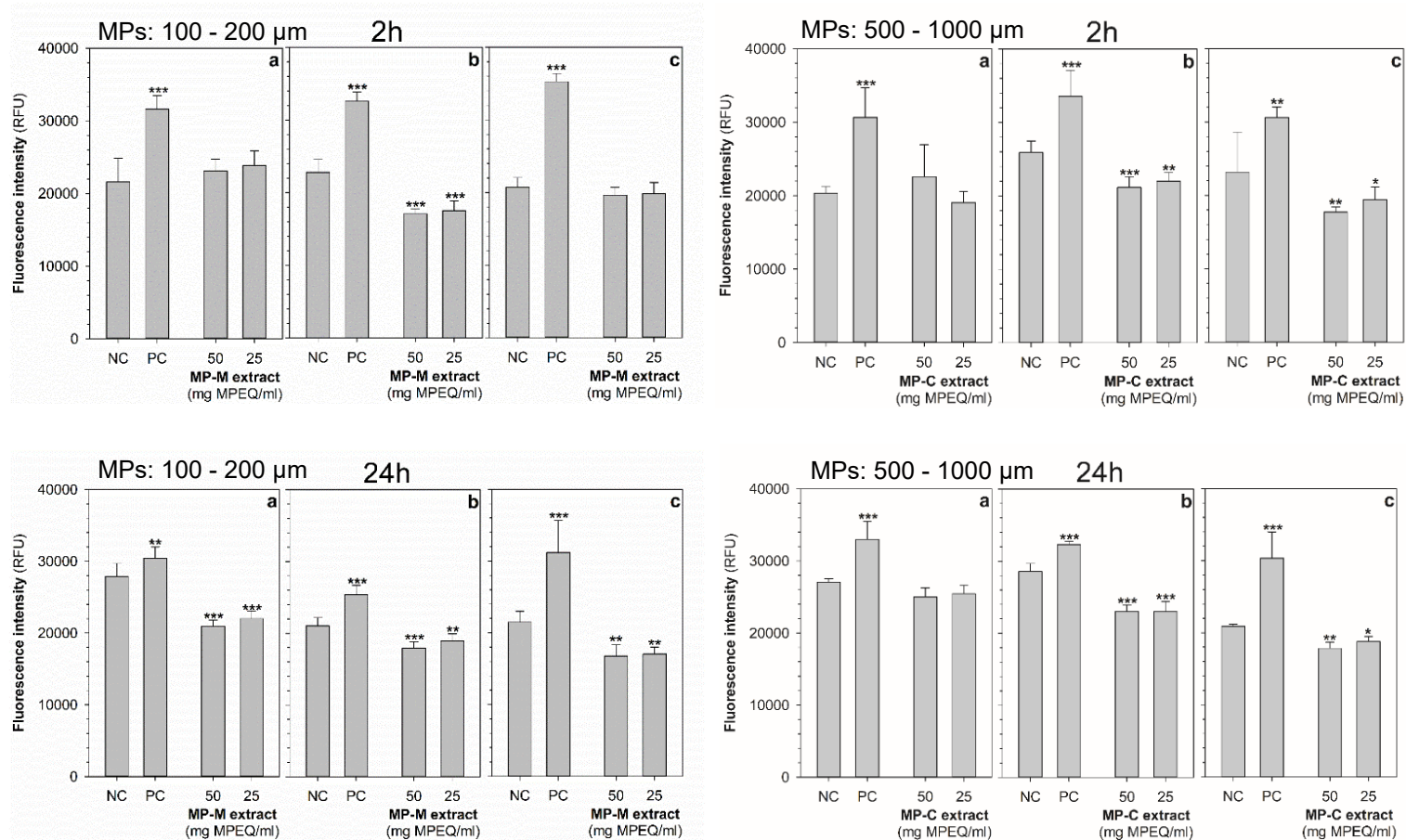


Abb. 2: Wirkung von He-xan-Extrakten der Projekt-Referenzpartikel auf den oxidativen Stress in Zebra-fisch-Leberzellen (ZF-L) nach 2 und 24h Inkubation, bestimmt durch den DHR123-Assay in  $n = 3$  Durchläufen (a-c). Alle Proben zeigen in mindestens einem Replikat eine statistisch signifikante (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; One-Way-Anova) Verringerung des oxidativen Stresses, während die Positivkontrolle (PC, 30 bzw. 200  $\mu\text{M}$  Antimycin-A) eine durchgehend signifikante Erhöhung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (NC) aufwies.

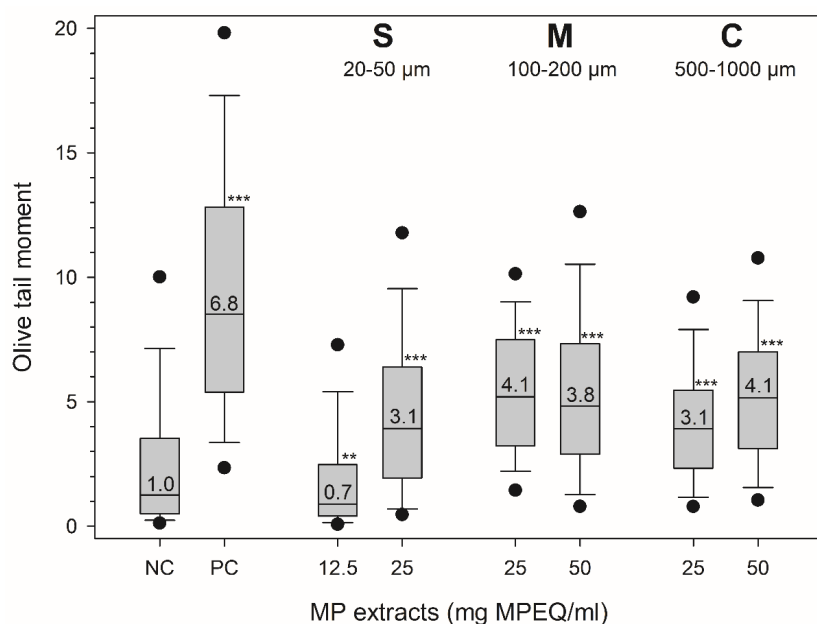


Abb. 3: Gentoxizität der Hexanextrakte der Mikroplastikpartikel in ZF-L-Zellen im alkalischen Comet-Assay nach einer Belastungsdauer von 24 h. Die Extrakte erhöhten die Menge an DNA-Brüchen statistisch signifikant (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ANOVA-on-Ranks) auf das ca. 3 - 4fache der Negativkontrolle (NC), während die Positivkontrolle (PC, 30 µg/ml Methylmethansulfonat) die DNA-Brüche um das 6,8fach erhöhte.

Zur realistischen Bewertung des gentoxischen Potenzials der Partikel ist es nötig, die Daten in einen realistischen Kontext zu setzen. Im vorliegenden Expositionsszenario wurde eine Zellmasse von ca. 170 µg mit dem organischen Extrakt von 12,5 bis 50 mg Mikroplastik in Kontakt gebracht, was grob umgerechnet und unter Vernachlässigung der im Medium gelöst verbleibenden Schadstoffmenge einer Einzeldosis von 74 bis 294 kg Mikroplastik pro kg Körpergewicht (also dem 74- bis 294-fachen Körpergewicht !!!) entspricht. Auf einen Menschen von 70 kg umgerechnet würde dies einer Einzeldosis von 5,2 bis 21 Tonnen entsprechen, was offensichtlich ein grob unrealistisches Szenario darstellt. Die Tatsache, dass derart hohe Mengen an belastetem Material nötig sind, um eindeutig schädliche Effekte nachzuweisen, spricht eher gegen die toxikologische Relevanz von Mikro- und Nanoplastik beim Transfer von Schadstoffen in aquatischen Organismen, zumal diese ohnehin nicht nur durch MP/NP-vermittelt, sondern auch auf direktem Weg mit diesen in Kontakt kommen.

In Ergänzung zu den *In vitro*-Experimenten mit Zellkulturen wurden die im Rahmen des Verbundprojekts gesammelten und aufbereiteten Umweltproben einer weiteren (verlängerten) organischen Extraktion mit Hexan unterzogen, um die an diesen Partikeln anhaftenden Schadstoffe vollständig zu lösen und anschließend *in vivo* auf ihre Wirkung auf Embryonen von Zebrafärblingen zu untersuchen. Für diesen Teil des Projekts wurden ausschließlich die Umweltproben mit einer Größe von 100 - 200 µm genutzt. Die organische Extraktion erfolgte mit Hexan, welches anschließend verdampft wurde. Die gelösten Schadstoffe wurden anschließend in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Die Konzentration der gelösten Schadstoffe entsprach dabei der Extraktion von 5 g Mikroplastik-Äquivalenten/ml DMSO, in folgendem als MPEQ/ml bezeichnet.

Im Rahmen eines Vorversuchs wurde zunächst im Fischembryotest die Wirksamkeit des Extrakts untersucht, woraufhin der Konzentrationsbereich von 0 - 25 mg MPEQ/ml

für die weiteren Experimente festgelegt wurde. Die Testkonzentrationen wurden in 5 mg MPEQ/ml-Schritte unterteilt. Die Bestimmung der akuten Toxizität erfolgte mittels des Fischembryotests (FET). Aufgrund der geringen Verfügbarkeit der Proben erfolgte die Exposition über 120 Stunden statisch. Nach 120 h wurden die jeweils letale Konzentration (LC) sowie die Effektkonzentration (EC) bestimmt und die mittleren LC- und EC-Werte für 10 und 50 % der betroffenen Embryonen berechnet (vgl. Abb. 4).

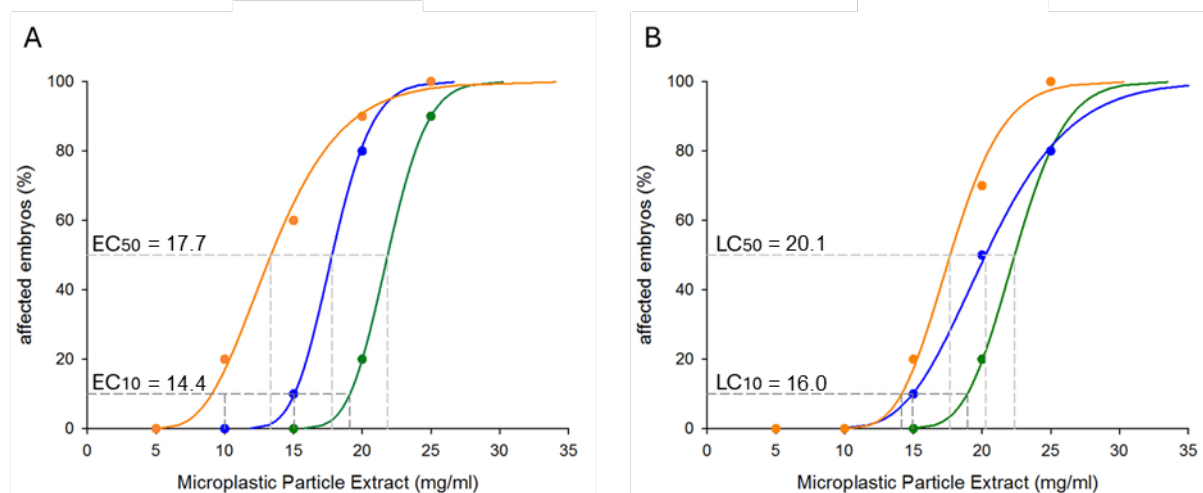


Abb. 4: Subletale und letale Wirkung von Hexanextrakten der im Freiland gesammelten Mikroplastikproben auf Embryonen des Zebrafisch (*Danio rerio*) im Fischembryotest, welche bis 120 Stunden nach Befruchtung Mikroplastikpartikelextrakt ausgesetzt waren. Die Abbildung zeigt drei unabhängige Replikate. Die subletalen (A) und letalen (B) Wirkungen sind als Prozentanteil der Gesamtzahl der verwendeten Embryonen ausgedrückt. Die EC/LC<sub>10</sub> und EC/LC<sub>50</sub> Werte der einzelnen Replikate sind durch Linien hervorgehoben, sowie die Mittelwerte gegeben. Die Anzahl der verwendeten Embryonen pro Konzentration und Replikat betrug n = 10.

Als weiterer sublethaler Parameter wurde die Körperlänge der Embryonen nach Beendigung des FETs gemessen (vgl. Abb. 5). Die Körperlänge der Embryonen war bei einer Exposition von 15 und 20 mg MPEQ/ml statistisch signifikant verkürzt. In Kombination mit der Beobachtung eines vergrößerten Dotters bei den meisten dieser Embryonen kommt die Vermutung auf, dass das Extrakt die Absorption des Dotters und somit die Nährstoffaufnahme beeinflusst, was sich negativ auf die Entwicklung der Embryonen auswirkt.

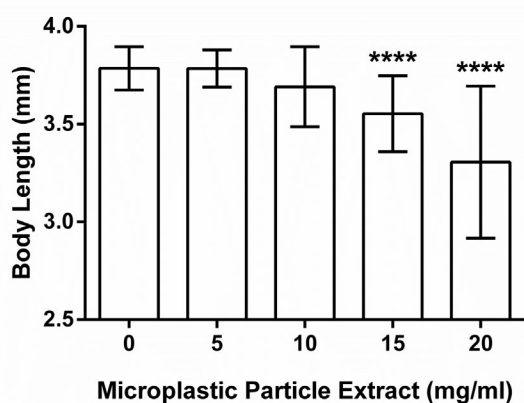


Abb. 5: Körperlänge von Zebrafischembryonen nach 120 h Belastung Mikroplastikpartikelextrakten (n = 3 unabhängige Replikaten mit jeweils n = 7 – 10 Individuen). Bei den 15 und 20 mg MPEQ/ml ist eine signifikant geringere Körperlänge der Embryonen feststellbar (\*\*\*\* p > 0.0001; Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunns *Post-hoc*-Test).

Die Untersuchung der Acetylcholinesterase-Aktivität nach Belastung mit dem Hexanextrakt erfolgte mittels Acetylcholinesterase-Assay (Abb. 6). Hierbei konnte eine Verminderung der Acetylcholinesterase-Aktivität bei Embryonen, die EC<sub>10</sub> und geringeren Konzentrationen ausgesetzt wurden, festgestellt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass das Extrakt für Zebrafischembryonen neurotoxische Eigenschaften aufweist.

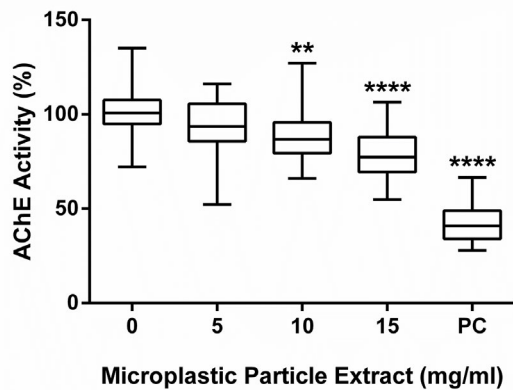


Abb. 6: Acetylcholinesterase-Aktivität von Embryonen des Zebrafisch (Danio rerio) nach 120 h Belastung mit dem Hexanextrakt der Mikroplastikpartikel aus dem Freiland (n = 3 unabhängige Replikate mit jeweils 7 – 10 technischen Wiederholungen). Bei 10 und 15 mg MPEQ/ml exponierte Embryonen zeigen eine signifikant geringere Acetylcholinesterase-Aktivität (\*\*p > 0.01; \*\*\*\* p > 0.0001; Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunns *Post-hoc*-Test). Positivkontrolle: 8 mg/L Paraoxon-methyl.

Zusätzlich zum *In vitro*-EROD wurde *in vivo* in Embryonen des Zebrafisch die Induktion der Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) nach Belastung mit dem Hexanextrakt der Mikroplastikproben aus dem Freiland ermittelt. Hierbei konnte für alle eingesetzten Konzentrationen eine erhöhte CYP1A-Induktion nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse des *In vitro* EROD bezüglich der Nachweisbarkeit von dioxin-ähnlich wirksamen Schadstoffen auf den Partikeln.

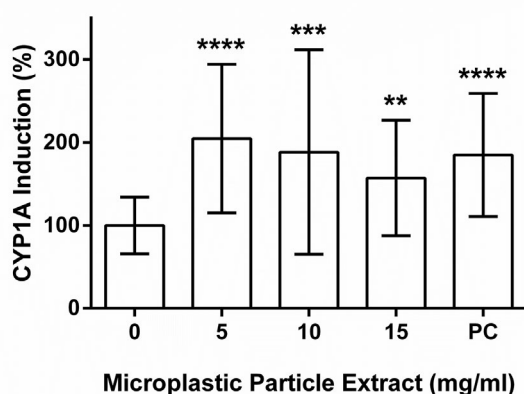


Abb. 7: Induktion von Cytochrom P4501A (CYP1A) in Embryonen des Zebrafisch (Danio rerio) nach 120 h Belastung mit Mikroplastikpartikelextrakt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Replikaten mit jeweils 8 – 10 technischen Wiederholungen. Alle dem Extrakt exponierten Embryonen zeigen eine signifikante CYP1A-Induktion (\*\* p > 0.01; \*\*\* p > 0.001; \*\*\*\* p > 0.0001; Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunns *Post-hoc*-Test). Positivkontrolle 75 µg/L β-NF.

Um die Frage der Umweltrelevanz der Befunde aus den *In vivo*-Untersuchungen zu klären, ist es erforderlich, die Daten ebenso wie bei den *In vitro*-Tests in einen realistischen Kontext zu setzen. Das zugesetzte Extrakt, um einen Embryo einer Konzentration von 5 mg MPEQ/ml auszusetzen, entspricht etwa 2.600 extrahierten Partikeln. Die Aufnahme von mindestens 2.600 100-200 µm großen Partikeln von einem maximal 4 mm großen Embryo des Zebrafischblings ist ein grob unrealistisches Szenario, zumal der Faktor Bioverfügbarkeit hierbei bisher vernachlässigt wurde. Die *in vivo* gewonnenen Daten legen daher, genau wie die *in vitro* gewonnene Daten, nahe, dass die toxikologische Relevanz von Mikroplastik beim Transfer von Schadstoffen in aquatische Organismen vernachlässigt werden kann.

#### 4.3 Bioassays in ökologischen Risikoanalysen von Mikroplastikpartikeln und Nanoplastikpartikeln (AP 4)

Neben der oben (Abschnitt 2.2) diskutierten Vektorfunktion für Schadstoffe wird eine potenzielle direkte toxische Wirkung aufgenommener Mikro- und insbesondere Nanoplastikpartikeln zunehmend diskutiert. Zwar konnten bereits zahlreiche *In vitro*-Experimente derartige toxische Effekte (v.a. die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies) nachweisen, jedoch ist zumeist nicht eindeutig geklärt, ob sich diese auf die Partikel selbst oder auf die in den i.d.R. kommerziell bezogenen Suspensionen zumeist enthaltenen Zusatzstoffe (insbesondere dem Biozid Natriumazid) zurückführen lassen. Dementsprechend wurden die in Tab. 6 genannten kommerziellen Mikro- und Nanoplastiksuspensionen auf ihre zytotoxische Wirkung in Zebrafischblings-Leberzellen (ZF-L) untersucht.

Tab. 6: Auswahl und Eigenschaften (nach Produktdatenblatt) der in Zytotoxizitätstests untersuchten kommerziellen Mikro- und Nanoplastik-Präparationen

Hersteller	Produkt	Nenngröße(n)	Eigenschaften
Polysciences	Polybead	0.05 µm 1.06 µm	2.5 % Feststoffanteil, unmodifiziert, nicht-fluoreszierend, nicht näher definiertes „minimales Detergens“
Becton-Dickinson	Flow-check Fluorospheres	10 µm	fluoreszierend, mit nicht-definierten Detergenzien und Konservierungsstoffen
Sigma-Aldrich	Latex-Beads	0.03 µm 1 µm 2 µm	2.5 % Feststoffanteil, carboxyliert, fluoreszierend, für Phagozytose-Studien

Um die schädlichen Effekte in den untersuchten Präparationen klar den jeweiligen Partikel- (Mikro/Nanoplastik) und Flüssigphasen (zuge setzte Supplemente, Biozide, ...) zuordnen zu können, wurden die Proben sowohl in nativer Form (wie vom Hersteller geliefert) als auch in ihre Fest- und Flüssigphasen getrennt getestet. Um dies zu erreichen, wurden die Präparationen auf 200,000 MWCO Ultrafiltrations-Zentrifugenkartuschen (Millipore) aufgetragen, die nur die festen Bestandteile zurückhalten. Der Durchlauf wurde als Flüssigphasen-Probe aufgefangen, die zurückgehaltenen Partikel mithilfe einer nicht-zytotoxischen Konzentration (10 % w/v) des biokompatiblen Detergens Pluronic F-127 rückgespült, aufgefangen und ebenfalls auf ihre Zytotoxizität mithilfe den Neutralrot-Retentions-Assays mit RTL-W1-Zellen getestet (Abb. 8).

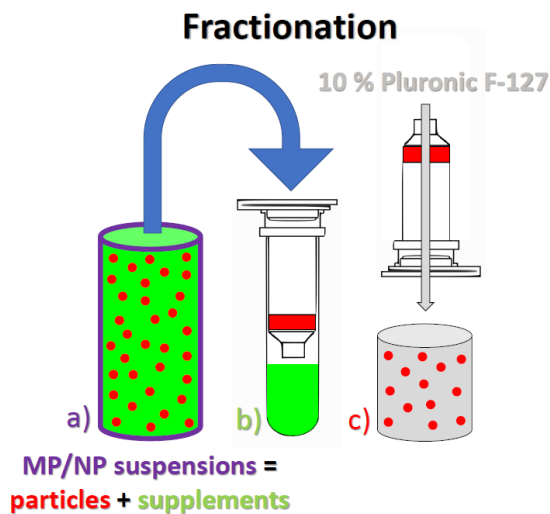


Abb. 8: Auftrennung der kommerziellen MP/NP-Suspensionen (lila) in ihre löslichen (grün) und suspendierten (rot) Bestandteile mithilfe von Ultrafiltrationsmembraneinsätzen (200.000 MWCO).

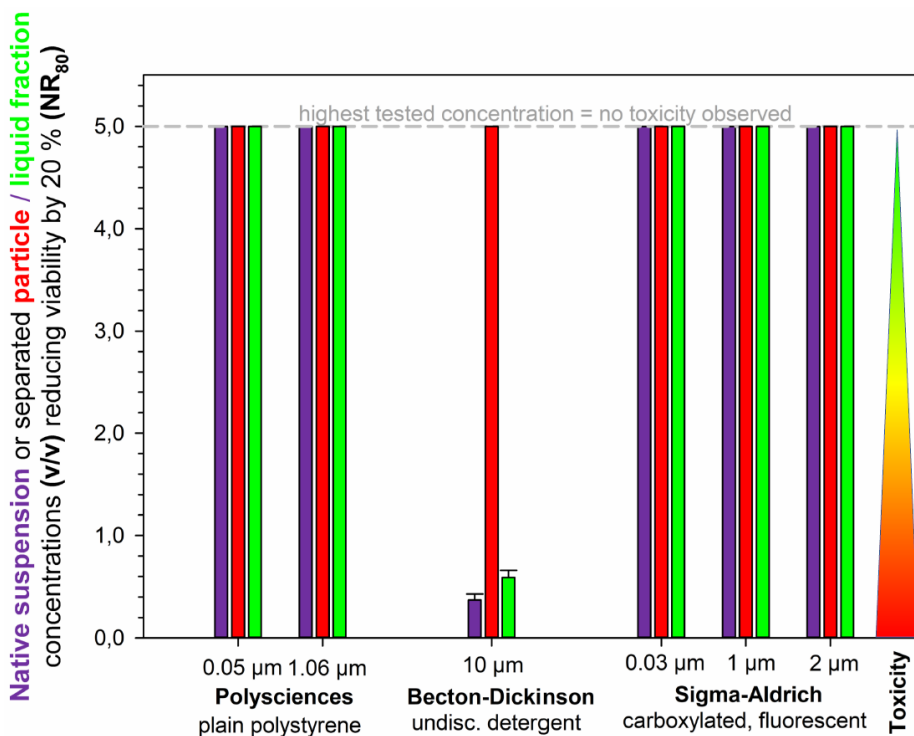


Abb. 9: Zytotoxizität von kommerziellen Mikro- und Nanoplastik-Präparationen in nativem Zustand (violett) und nach Auftrennung in ihre festen (rot) und flüssigen (grün) Phasen.

Deutliche Effekte (> 20 % Reduktion der Vitalität) wurden nur bei den Becton-Dickinson-Partikeln beobachtet (Abb. 9), und diese konnten klar der flüssigen Phase und damit den darin enthaltenen Supplementen zugeordnet werden. Darüber hinaus wurden bei den Polysciences-Partikeln marginale Reduktionen (15 - 19 %) bei der höchsten getesteten Konzentration von 5 % (v/v) in den nativen und Flüssigphasen beobachtet, die möglicherweise auf das laut dem Hersteller zugesetzte Detergens zurückzuführen sind. Die für den Einsatz in Phagocytose-Assays entwickelten Partikel von Sigma wiesen durchgehend keine unter diesen Bedingungen messbare Zytotoxizität auf.

Zusätzlich zu den *In vitro*-Untersuchungen mit Zellkulturen wurde eine Fraktion der oben verwendeten Partikelpräparationen mit Hilfe des Fischembryotests die Toxizität gegenüber sich entwickelnden Zebrafischen bestimmt. Um auch hier die eine Aussage über den Einfluss der Partikel auf die Aufnahme und Wirkung von lipophilen Schadstoffen treffen zu können, wurden bei einem Teil der Experimente die embryotoxischen Modellsubstanzen Triclosan und Pyren alleine und in Kombination mit 50 nm großen Polyethylen-Partikeln in einer Endkonzentration von 1 mg/L eingesetzt und die Wirkung auf das Überleben und die Entwicklung der Embryonen über 96 h beobachtet (Abb. 10, 11).

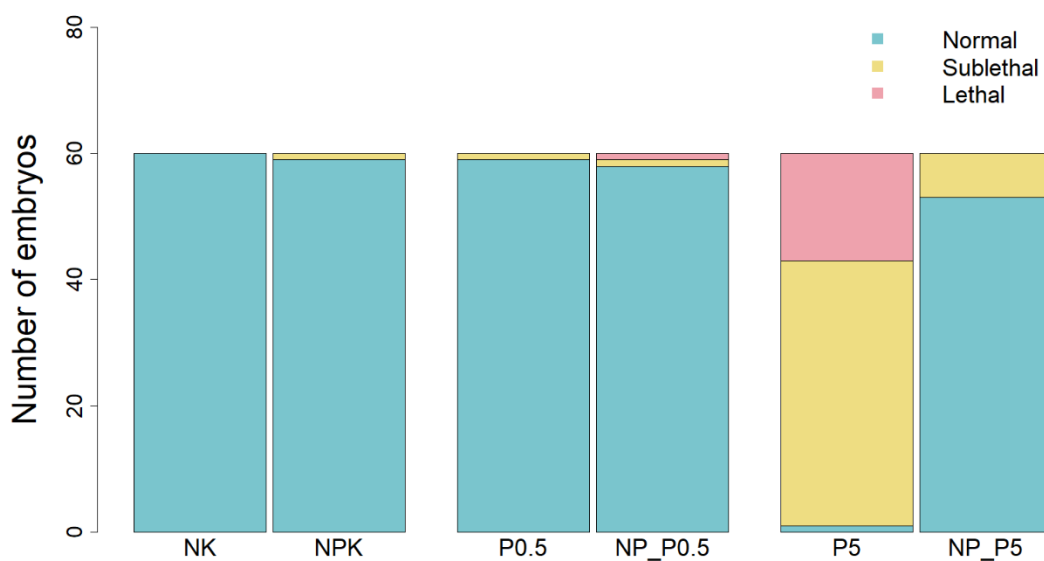


Abb. 10: Auswirkungen von 50 nm Polystyrol-Nanopartikeln (NP, 1 mg/L) auf das Überleben und die Normalentwicklung von Embryonen des Zebrafischlings (*Danio rerio*) nach 96 h Exposition allein (NPK - Nanoplastik-Kontrolle) und in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von 0,5 und 5 nM Pyren. Während die Partikel allein keine nachteiligen Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen hatten, verringerten sie die Effekte der gleichzeitig verabreichten Modellschadstoffe zumindest bei den höheren Konzentrationen, was darauf hindeutet, dass die Schadstoffe an die Partikel adsorbiert werden und somit für die Aufnahme durch die Embryonen nicht mehr verfügbar sind

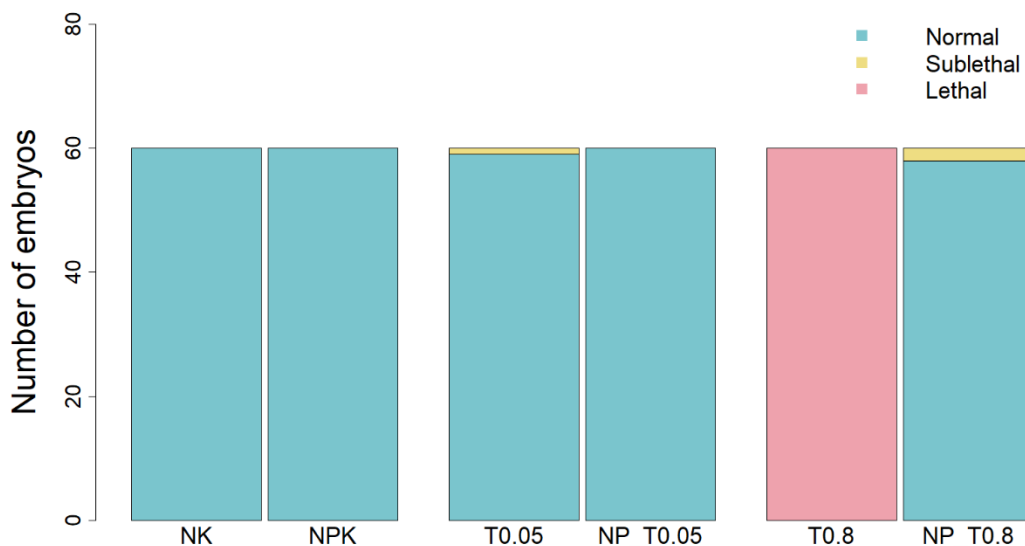


Abb. 11: Auswirkungen von 50 nm Polystyrol-Nanopartikeln (NP, 1 mg/L) auf das Überleben und die Normalentwicklung von Embryonen des Zebraabärlings (*Danio rerio*) nach 96 h Exposition allein (NPK - Nanoplastik-Kontrolle) und in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von 0,05 und 0,8 mg/L Triclosan. Während die Partikel allein keine nachteiligen Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen hatten, verringerten sie die Effekte der gleichzeitig verabreichten Modellschadstoffe zumindest bei den höheren Konzentrationen, was darauf hindeutet, dass die Schadstoffe an die Partikel adsorbiert werden und somit für die Aufnahme durch die Embryonen nicht mehr verfügbar sind.

Während die Partikel selbst keine offensichtlichen schädlichen Auswirkungen auf die Embryonen hatten, verringerten sie die toxische Wirkung von lipophilen Modellschadstoffen auf die Embryonen, wenn sie zusammen mit den NP verabreicht wurden. Dieser häufig beobachtete Entgiftungsmechanismus wird in der Regel auf die Bindung der Schadstoffe an die Oberfläche der Partikel zurückgeführt, sodass sie für die Aufnahme durch das biologische System nicht mehr zur Verfügung stehen, was darauf hindeutet, dass Mikro- bzw. Nanoplastikpartikel zumindest mechanistisch eine positive Wirkung auf Organismen in Gegenwart hoher Konzentrationen lipophiler Schadstoffe haben können, indem sie als Senke für Schadstoffe wirken.

Insgesamt lassen die gewonnenen Daten den Schluss zu, dass von den Mikro- und Nanoplastik-Partikeln selbst im gewählten Testsystem kein wesentliches Zytotoxisches Potenzial ausgeht und die teilweise in den getesteten Präparationen beobachtete Toxizität auf in der Flüssigphase gelöste Supplemente zurückgeht. Zugleich unterstreichen diese Erkenntnisse die Notwendigkeit, beim Einsatz von kommerziellen Mikro- und Nanoplastik-Präparationen zwischen den Effekten der Partikel und eben dieser Supplemente zu unterscheiden, damit schädliche Effekte nicht fälschlicherweise den Partikeln, die i.d.R. im Zentrum der wissenschaftlichen Fragestellung stehen, zugeordnet werden.

In Kombination mit lipophilen Schadstoffen verabreicht sind die Partikel auch unter *In vivo*-Bedingungen in der Lage, deren Verfügbarkeit und damit schädliche Wirkung auf Organismen zu verringern, was durch die Bindungskonkurrenz der Partikel mit dem biologischen Material zu erklären ist.

## 5. Schlussfolgerungen aus den gewonnenen Ergebnissen

Auf der Grundlage der Daten, die im Rahmen der vorgestellten Experimente gewonnen wurden, gibt es daher trotz des eindeutigen Nachweises des Vorhandenseins toxischer Schadstoffe auf bzw. in den in der Umwelt vorkommenden Partikeln wenig bis gar keine Hinweise auf eine Toxizitätsgefahr unter umweltrelevanten, natürlichen Bedingungen, weder für im Freiland gesammelte Partikel; ebenso betrifft dies kommerzielle Mikro- und Nanoplastik-Präparationen, soweit zwischen den Effekten der Partikel selbst und sekundär zugesetzten Hilfs- und Konservierungsstoffen unterschieden wird.

Mit stark angereicherten Extrakten sowohl aus experimentell schadstoffbeladenen Mikroplastikpräparaten als auch aus Mikroplastikproben aus dem Freiland in mehreren Bioassays mit Zellkulturen und Embryonen des Zebrafisches konnten durchaus Effekte auf z.B. die Ethoxyresorufin-O-Deethylase und die Acetylcholinesterase oder auch genotoxische Effekte gezeigt werden; rechnet man jedoch auf die realen Umweltkonzentrationen zurück, kommt man zu dem Schluss, dass es sowohl für die in der Umwelt gesammelten und damit nativ mit lipophilen Schadstoffen beladenen Mikro- bzw. Nanoplastikpartikel als auch für die kommerziellen Zubereitungen wenige bis keine Hinweise auf ein in der realen Umwelt relevantes toxisches Gefährdungspotenzial gibt.

In den Bioverfügbarkeitsexperimenten wurde deutlich, dass die Schadstoffvektorfunktion in feldgesammelten Kunststoffen deutlich größer ist als in früheren Experimenten mit definierten, im Labor beladenen Polyethylenpartikeln, wobei dieser Effekt stark von der Größe der Partikel abhängig ist. Die kleine Fraktion setzte ihre adsorbierten Schadstoffe vollständig frei (theoretisch 128 %), während bei den großen Partikeln nur ein Bruchteil der anhaftenden Verunreinigungen (~6 %) für die darunter liegenden Zellen verfügbar war. Dies beweist zwar nur das mechanistische Vorhandensein eines Schadstofftransfers auf die Zellen, doch muss man das Massenverhältnis von zugegebenen MP und Zellmasse berücksichtigen, das in der gleichen Größenordnung liegt (~ 276 µg MP auf der Oberfläche des Mediums, wie durch geometrische Modellierung geschätzt, gegenüber ~ 170 µg Zellmasse pro Well). Für Organismen würde dies, um zu einem ähnlichen Expositionsszenario zu gelangen, in etwa bedeuten, dass etwa das zweifache Körpergewicht an Kunststoffpartikeln als Einzeldosis aufgenommen werden müsste, was alles andere als realistisch ist.

Diese Problematik wird sogar noch deutlicher, wenn organische Extrakte verwendet werden, wie oben bereits im Kontext der in diesem Projekt durchgeführten einzelnen Versuche eingehend diskutiert wurde, da dieser Ansatz die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe nicht nur unzureichend berücksichtigt, sondern auch die Belastung mit grob unrealistischen Partikelmengen erlaubt und nur unter derartigen Bedingungen deutliche toxische Wirkungen beobachtet werden können. Dennoch wurde das Vorhandensein einer Schadstoff-Vektor-Funktion in den vorliegenden und vielen früheren Experimenten qualitativ schlüssig nachgewiesen; allerdings muss man bedenken, dass dieser Transfer das Vorhandensein eines Konzentrationsgradienten voraussetzt. Bei Laborstudien, bei denen schadstofffreie Organismen schadstoffbeladenen Partikeln ausgesetzt werden, wird ein Transfer von Adsorbaten erwartet, aber auch dies ist nicht relevant für die Umwelt, wo Organismen, Schadstoffe und MP/NPs gleichzeitig vorhanden sind und miteinander interagieren.

In früheren<sup>5</sup> *In vitro*- und den jetzigen *In vivo*-Experimenten führte die gleichzeitige Exposition von Mikro- und Nanopartikeln mit lipophilen Schadstoffen zu einer geringeren Toxizität, höchstwahrscheinlich durch die Sorption der Verunreinigungen an die Mikro- und Nanopartikel, die mit dem biologischen Gewebe um die Verbindungen konkurrieren, was darauf hindeutet, dass das Vorhandensein von Mikro- und Nanopartikeln die verfügbare Schadstoffkonzentration in aquatischen Systemen tatsächlich verringern und damit zumindest theoretisch die Bedingungen für die Organismen verbessern kann. Zwar sind Ausmaß und Umweltrelevanz dieses Reinigungseffekts noch unbekannt, doch wurde das Vorhandensein eines solchen Mechanismus in zahlreichen anderen Studien nachgewiesen.

---

<sup>5</sup> JPI Oceans-Projekt **EPHEMARE** (Ecotoxicological Effects Of Microplastics In Marine Ecosystems; FKZ 03F0735A)

BMBF-Projekt **MiWa** – Mikroplastik im Wasserkreislauf. Probennahme, Probenaufbereitung, Analytik, Vorkommen und Bewertung (FKZ 02WRS1378J). Jekel, M., Anger, P., Bannick, C.G., Barthel, A.-K., Braun, U., Braunbeck, T., Dittmar, S., Eisentraut, P., Elsner, M., Gnirß, R., Grummt, R., Hanslik, L., Huppertsberg, S., Ivleva, N.P., Klöckner, P., Knepper, T.P., Köhler, H.-R., Kraus, S., Kuckelkorn, J., May, E., Müller, Y.K., Nießner, R., Obermaier, N., Oehlmann, J., Pittroff, M., Reemtsma, T., Schmiege, H., Schmitt, T., Schür, C., Storck, F.R., Strobel, C., Triebkorn, R., Wagner, S., Wagner, M., Witzig, C.S., Zumbülte, N., Ruhl, A.S.: (2020) Mikroplastik im Wasserkreislauf. Universitätsverlag der TU Berlin, ISBN 978-3-7983-3162-4 (print), ISBN 978-3-7983-3163-1 (online). 216 S.

## **6. Arbeiten, die ausstehen bzw. zu keiner Lösung geführt haben**

Aufgrund von Problemen bei der Rekrutierung eines geeigneten Doktoranden und der Kündigung von Florian Walter nach wenigen Monaten sowie der Covid-Pandemie kam es in der ersten Hälfte des Projekts zu erheblichen Verzögerungen beim Beginn und Durchführung der Arbeiten. Aus diesen Gründen konnten vor allem die Untersuchungen zur Wirkung von Nanoplastikpartikeln nicht im Projektzeitraum abgeschlossen werden. Am 1.5.2023 konnte jedoch mit Frau Lisa Bauer eine weitere Doktorandin gewonnen werden, die die Nanoplastik-Untersuchungen weiterführt. Frau Bauer wird aus Eigenmitteln finanziert. Die Befunde aus ihren Arbeiten werden dem Projekt zu geeigneter Zeit nachgereicht.

Nicht erfolgreich waren die Bemühungen, transgene Zelllinien zu erzeugen, die die endokrine oder neurotoxische Wirkung mikroplastik-vermittelter Schadstoffe über Fluoreszenzmarkierung anzeigen würden. Die erzeugten Zelllinien erweisen sich entweder als zu unempfindlich oder die Fluoreszenz war nicht ausreichend oder stabil genug.

## **7. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Die Wirkung von Mikro- bzw. Nanoplastikpartikeln ist in den letzten 10 Jahren sehr stark in den Fokus sowohl der Forschung als auch der Öffentlichkeit getreten. Es entstand geradezu eine Flut von Publikationen, von denen jedoch viele aufgrund ihrer Konzeption oder hinsichtlich der Interpretation ihrer Befunde in Frage zu stellen sind. Wie sich aus den Schlussfolgerungen aus den Arbeiten der Arbeitsgruppe Aquatische Ökologie und Toxikologie an der Universität Heidelberg (siehe oben) und einer immer größer werdenden Zahl von Publikationen anderer Arbeitsgruppen ergibt, sind Mikro- und Nanoplastikpartikel *per se* aus ökotoxikologischer Sicht nur in Bezug auf Zusatzstoffe wie Weichmacher interessant. Auch ihre Vektorfunktion wurde zunächst eher einseitig gesehen, also aus der Umwelt in den Organismus. Schon aus theoretischen Überlegungen heraus war jedoch immer davon auszugehen, dass sich unter natürlichen Bedingungen in der Umwelt ein Gleichgewicht zwischen Schadstoffen im Wasser, in bzw. auf den Organismen und an bzw. auf der Oberfläche von Mikro- und Nanoplastikpartikeln einstellen wird. Plastikpartikel können also als Vektor dienen, aber nicht nur in Organismen hinein, sondern auch aus Organismen heraus. Es wird also in Zukunft weiterhin um die Nutzung und Freisetzung der Schadstoffe selbst gehen müssen.

Da Fische nicht nur der ökotoxikologischen Forschung, sondern auch in der öffentlichen Wahrnehmung eine bedeutende Rolle spielen, war es sicher gerechtfertigt, die Wirkung von Mikro- bzw. Nanoplastikpartikeln zu untersuchen. Aus der Sicht des Tierschutzes ist der Einsatz von Fischen als Wirbeltiere, die rechtlich einen besonderen Schutz genießen, in der ökotoxikologischen Routine natürlich grundsätzlich problematisch; daraus rechtfertigen sich *In vitro*-Untersuchungen an z.B. Zellkulturen bzw. *In vivo*-Studien mit wirbellosen Tieren oder nicht geschützten Entwicklungsstadien wie

frühen Embryonalstadien von Fischen als „alternative“ Testsysteme. Wie im Rahmen der BMBF-Projekte EPHEMARE, MiWa und RESPONSE gezeigt werden konnte, lassen sich tatsächlich Erkenntnisse zur Wirkung von Mikro- bzw. Nanoplastikpartikeln mit solchen Systemen erfassen – allerdings sind nicht alle Fragen mit Alternativsystemen beantwortbar.

## 8. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während des Verlaufs des Projekts sind zwar zahlreiche Aktivitäten oder viele wichtige Publikationen bekannt geworden, die jedoch in den meisten Fällen mit den Beobachtungen im Rahmen des Projekts RESPONSE in Einklang zu bringen waren. Wie oben ausgeführt, wird die Wirkung von Mikro- bzw. Nanoplastikpartikeln mittlerweile deutlich differenzierter betrachtet, was ja der grundsätzlichen Schlussfolgerung aus den Arbeiten im Rahmen des BMBF-Projekts RESPONSE entspricht.

## 9. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Aufgrund der oben genannten Probleme bei der Rekrutierung von geeignetem Personal und im Zuge der Covid-Pandemie liegen bisher außer den genannten Bachelor- und Staatsexamensarbeiten noch keine Publikationen aus dem Projekt RESPONSE vor. Auch von den Projektpartnern befinden sich zahlreiche Publikationen noch in Vorbereitung. Diese werden jedoch folgen und dem Projektträger unmittelbar nach Erscheinen nachgereicht. Die **spezifische wissenschaftliche Verwertung** der Erkenntnisse aus dem Projekt ist also noch nicht abgeschlossen.

Die **technische Verwertung** des Teilprojekts besteht vor allem in der Erarbeitung von standardisierten Methoden für den Nachweis der Effekte von Mikro- bzw. Nanoplastikpartikeln bei Fischen. Sollten adverse Wirkungen von Mikro- bzw. Nanoplastikpartikeln nachweisbar sein, fließen diese in die toxikologische und ökotoxikologische Bewertung ein. Hierin besteht letztendlich auch die **wirtschaftliche Bedeutung** der Untersuchungen: Die langfristige Vermeidung von Schäden durch Mikro- bzw. Nanoplastikpartikel ist für ein nachhaltiges Management aquatischer Ökosysteme und Ressourcen von größter ökologischer und wirtschaftlicher Bedeutung.

## 10. Bezug zu den förderpolitischen Zielen des BMBF

Die Erfassung und Bewertung von anthropogenen Spurenstoffen als Grundlage für die Minimierung von Schadstoffen im Wasserkreislauf war eines der zentralen Ziele des aktuellen Projekts. Das Projekt entsprach in seiner Fragestellung als Anschlussprojekt von EPHEMARE in der JPI Oceans-Fördermaßnahme sowie MiWa den förderpolitischen Zielen des BMBF. In dem hier beschriebenen Teilprojekt wurden weitere Methoden zur Detektion von Effekten durch Mikro- bzw. Nanoplastikpartikel entwickelt.

Die gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse sind sowohl aus wissenschaftlicher als auch aus regulatorischer Sicht von Bedeutung.

## **11. Liste der Bachelorarbeiten und Dissertationen, die bisher im Rahmen von RESPONSE entstanden sind**

- (1) Bauer, L. (2025) Wirkung von Mikro- und Nanoplastikpartikeln auf Fischzellen und verschiedene Embryonalstadien des Zebraäbrlings (*Danio rerio*). Dissertation, Universität Heidelberg.
- (2) Baum, J. (2023) Genotoxicity and oxidative stress induced by extracts of field-collected microplastic particles in zebrafish liver cells. Bachelorarbeit, Universität Heidelberg.
- (3) Drescher, D. (2021) Untersuchung der Effekte von Triclosan in Kombination mit Nanoplastikpartikeln auf Embryonen des Zebrafisches *Danio rerio*. Bachelorarbeit, Universität Heidelberg.
- (4) Meienburg, S. (2022) Bioavailability of pollutants bound to weathered microplastic particles collected in the field and characterization of sorption properties towards lipophilic pollutants in a cell culture system. Bachelorarbeit, Universität Heidelberg.
- (5) Nuttall, L. (2020) Microplastic as vector for the insecticide cy-permethrin and potential effects on the model organism *Danio rerio*. Staatsexamensarbeit, Universität Heidelberg.
- (6) Richter, L. (2024) Aquatic ecotoxicology of microplastics: Elucidating effects using zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model system. Bachelorarbeit, Universität Heidelberg.
- (7) Sommer, C. (2020) Mikroplastik-assoziiertes Transfer von Benz(k)fluoranthren auf den Zebraäbrling (*Danio rerio*) in einer einfachen Modellnahrungskette. Staatsexamensarbeit, Universität Heidelberg.

## 12. Liste der Publikationen der AG Aquatische Ökologie und Toxikologie an der Universität Heidelberg zum Thema Mikroplastik

- (1) Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., Braunbeck, T. (2016) Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment – CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 35: 1656-1666.
- (2) Batel, A., Borchert, F., Reinwald, H., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2018. Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo[a]pyrene to adult zebrafish (*Danio rerio*) gills and zebrafish embryos. *Environ. Poll.* 235: 918-930.
- (3) Batel, A., Baumann, L., Carteny, C.C., Cormier, B., Keiter, S.H., Braunbeck, T., 2020. Histological, enzymatic and chemical analyses of the potential effects of differently sized microplastic particles upon long-term ingestion in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Pollut. Bull.* April 2020, 111022.
- (4) Cormier, B., Batel, A., Cachot, J., Bégout, M.-L., Braunbeck, T., Cousin, X., Keiter, S.H., 2019. Multi-laboratory hazard assessment of contaminated microplastic particles by means of enhanced fish embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*). *Front. Environ. Sci.* 7:135, 121-134.
- (5) Cousin, X., Batel, A., Bringer, A., Hess, S., Bégout, M.-L., Braunbeck, T., 2020. Microplastics and sorbed contaminants – Trophic exposure in fish sensitive early life stages. *Mar. Environ. Res.* 161. 105126.
- (6) Hanslik, L., Sommer, C., Huppertsberg, S., Dittmar, S., Knepper, T.P., Braunbeck, T., 2020. Microplastic-associated trophic transfer of benzo(k)fluoranthene in a limnic food web: Effects in two freshwater invertebrates (*Daphnia magna*, *Chironomus riparius*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol.* 237 C:108849.
- (7) Hanslik, L., Huppertsberg, S., Kämmer, N., Knepper, T.P. and Braunbeck, T. (2022) Rethinking the relevance of microplastics as vector for anthropogenic contaminants: Adsorption of toxicants to microplastics during exposure in a highly polluted stream - Analytical quantification and assessment of toxic effects in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 816: 151640.
- (8) Hanslik, L., Seiwert, B., Huppertsberg, S., Knepper, T.P., Reemtsma, T. and Braunbeck, T. (2022) Biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) following long-term exposure to microplastic-associated chlorpyrifos and benzo(k)fluoranthene. *Aquat. Toxicol.* 245: 106120.
- (9) Heinrich, P., Diehl, U., Förster, F. and Braunbeck, T. (2014) Improving the in vitro ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay with RTL-W1 by metabolic normalization and use of  $\beta$ -naphthoflavone as the reference substance. *Comp. Biochem. Phys.* 164C: 27-34.

- (10) Heinrich, P., Petschick, L.L., Northcott, G.L., Tremblay, L.A., Ataria, J.A., Braunbeck, T. (2017) Assessment of cytotoxicity, genotoxicity and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) induction in sediment extracts from New Zealand urban estuaries. *Ecotoxicology*, 26: 211-226.
- (11) Heinrich, P., Braunbeck, T. (2018) Genetically engineered zebrafish liver (ZF-L) cells as an *in vitro* source for zebrafish acetylcholinesterase (zfAChE) for the use in AChE inhibition assays. *Toxicol. in Vitro* 52, 52-59.
- (12) Heinrich, P., Braunbeck, T. 2019a Microplastic testing in vitro: Realistic loading of pollutants, surfactant-free solid surface-dosing and bioanalytical detection using a sensitivity-optimized EROD assay. *Toxicol. in vitro* 54: 194-201.
- (13) Heinrich, P., Braunbeck, T. 2019b Bioavailability of microplastic-bound pollutants *in vitro*: The role of adsorbate lipophilicity and surfactants. *Comp. Biochem. Physiol.* 221C: 59-67.
- (14) Heinrich, P., Braunbeck, T. (2020) Microplastic particles reduce EROD-induction specifically by highly lipophilic compounds in RTL-W1 cells. *Ecotox. Environ. Safety* 189, 110041.
- (15) Heinrich, P., Hanslik, L., Kämmer, N., Braunbeck, T., 2020. The tox is in the detail: technical fundamentals for designing, performing, and interpreting experiments on toxicity of microplastics and associated substances. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 22292-22318.
- (16) Jekel, M., Anger, P., Bannick, C.G., Barthel, A.-K., Braun, U., Braunbeck, T., Dittmar, S., Eisentraut, P., Elsner, M., Gnir, R., Grummt, T., Hanslik, L., Huppertsberg, S., Ivleva, N.P., Klöckner, P., Knepper, T.P., Köhler, H.-R., Kraus, S., Kuckelkorn, J., May, E., Müller, Y.K., Nießner, R., Obermaier, N., Oehlmann, J., Pittroff, M., Reemtsma, T., Schmiege, H., Schmitt, T., Schür, C., Storck, F.R., Strobel, C., Triebkorn, R., Wagner, S., Wagner, M., Witzig, C.S., Zumbülte, N., Ruhl, A.S., 2020. Mikroplastik im Wasserkreislauf - Probennahme, Probenaufbereitung, Analytik, Vorkommen und Bewertung (MiWa). Universitätsverlag TU Berlin, <https://depositonce.tu-berlin.de/handle/11303/11522>.
- (17) Regoli, F., Albentosa, M., Avio, C.G., Batel, A., Bebianno, M.J., Begout, M.-L., Beiras, R., Bellas, J., Blust, R., Bour, A., Braunbeck, T., Cachot, J., Carteny, C.C., Cormier, B., Cousin, X., Cuesta, A., Angeles Esteban, M., Faimali, M., Gambardella, C., Garaventa, F., Gorbi, S., Guilhermino, L., Hylland, K., Keiter, S., Kopke, K., Morin, B., Pacheco, A., Pittura, L., Town, R., Vieira, L.R. 2020. Insights on ecotoxicological effects of microplastics in marine ecosystems: the EPHEMARE project. In: Cocca, M., DiPace, E., Errico, M.E., Gentile, G., Montarsolo, A., Mossotti, R., Avella, M. (eds.) *Proceedings of the 2nd International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea*. Springer Water Series.

- (18) Triebskorn, R., Braunbeck, T., Grummt, T., Hanslik, L., Huppertsberg, S., Jekel, M., Knepper, T.P., Kraus, S., Müller, Y.K., Pittroff, M., Ruhl, A.S., Schmiege, H., Schür, C., Strobel, C., Wagner, M., Zumbülte, N., Köhler, H.-R., 2019. Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: a critical review. *Trends Anal. Chem.* 110, 375-392.

### 13. Zitierte Literatur

Banerjee, A., Billey, L.O., Shelver, W.L., 2021. Uptake and toxicity of polystyrene micro/nanoplastics in gastric cells: Effects of particle size and surface functionalization. *PLoS One* 16, 1-25.

Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2016. Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1656–1666.

Batel, A., Borchert, F., Reinwald, H., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2018. Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo[a]pyrene to adult zebrafish (*Danio rerio*) gills and zebrafish embryos. *Environ. Pollut.* 235, 918-930.

Boettcher, M., Grund, S., Keiter, S., Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Seitz, N., Rocha, P.S., Hollert, H., Braunbeck, T. (2010) Comparison of *in vitro* and *in situ* genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutat. Res.* 17: 11-17.

Boettcher, M., Kosmehl, T., Braunbeck, T. (2011) Low-dose effects and biphasic effect profiles: is trenbolone a genotoxicant? *Mutat. Res.* 723: 152-157.

Brandon, J., Goldstein, M., Ohman, M.D., 2016. Long-term aging and degradation of microplastic particles: Comparing *in situ* oceanic and experimental weathering patterns. *Mar. Pollut. Bull.* 110, 299-308.

Diekmann, M., Waldmann, P., Schnurstein, A., Grummt, T., Braunbeck, T., Nagel, R. (2004) On the relevance of genotoxicity for fish populations II: Genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquat. Toxicol.* 68: 27-37.

Dürr, M., Hollert, H., Braunbeck, T., Erdinger, L., Sonntag, H.-G. (1996) Untersuchungen zur Cyto- und Genotoxizität verschiedener Kompartimente des Neckars bei Hochwasser. *Hyg. Med.* 21: 16.

Faßbender, C., Braunbeck, T. (2013a) Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after *in vivo* exposure to methyl methanesulfonate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91: 89-95.

Faßbender, C., Braunbeck, T. (2013b) Reproductive and genotoxic effects in zebrafish after chronic exposure to methyl methanesulfonate in a multigeneration study. *Ecotoxicology* 22: 825-837.

Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., Hodges, G., 2011. A Thermodynamic Approach for Assessing the Environmental Exposure of Chemicals Absorbed to Microplastic. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1466–1472.

Hanslik, L., Sommer, C., Huppertsberg, S., Dittmar, S., Knepper, T., Braunbeck, T., 2020. Microplastic-associated trophic transfer of benzo(k)fluoranthene in a limnic food web: Effects in two freshwater invertebrates (*Daphnia magna*, *Chironomus riparius*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 237:108849.

Heinrich, P., Braunbeck, T., 2019. Microplastic testing in vitro: Realistic loading of pollutants, surfactant-free solid surface-dosing and bioanalytical detection using a sensitivity-optimized EROD assay. *Toxicol. in vitro* 54, 194–201.

Heinrich, P., Hanslik, L., Kämmer, N., Braunbeck, T., 2020. The tox is in the detail: technical fundamentals for designing, performing, and interpreting experiments on toxicity of microplastics and associated substances. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 22292–22318.

Heinrich, P., Petschick, L.L., Northcott, G.L., Tremblay, L.A., Ataria, J.A., Braunbeck, T. (2017) Assessment of cytotoxicity, genotoxicity and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) induction in sediment extracts from New Zealand urban estuaries. *Ecotoxicology*, 26: 211–226.

Incardona, J., Carls, M., Teraoka, H., Sloan, C., Collier, T., Scholz, N., 2005. Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ. Health Perspect.* 113 (12), 1755-1762.

Klee, N., Gustavsson, L., Kosmehl, T., Engwall, M., Erdinger, L. Braunbeck, T., Hollert, H. (2004) Changes in toxicity and genotoxicity of industrial sewage sludge samples containing nitro- and amino-aromatic compounds following treatment in bioreactors with different oxygen regimes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11: 313-320.

Kosmehl, T., Krebs, F., Manz, W., Erdinger, L., Braunbeck, T., Hollert, H. (2004) Comparative genotoxicity testing of Rhine River sediment extracts using the comet assay with permanent fish cell lines (RTG-2 and RTL-W1) and the Ames test. *J. Soils Sed.* 4: 84-94.

Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Manz, W., Braunbeck, T., Hollert, H. (2006): A novel contact assay to assess genotoxic burden of sediments using the comet assay with zebrafish larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 2097-2106.

Kosmehl, T., Hallare, A.V., Braunbeck, T., Hollert, H. (2008) DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutat. Res.* 650: 1-14.

Li, J., Zhang, K., Zhang, H., 2018. Adsorption of antibiotics on microplastics. *Environ. Pollut.* 237, 460-467.

Nguyen, B., Tufenkji, N., 2020. Single particle-resolution fluorescence microscopy of nanoplastics. PPR206505.

Osterauer, M., Faßbender, C., Braunbeck, T., Köhler, H.-R. (2011) Genotoxicity of platinum in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*). *Sci. Total Environ.* 409: 2114-2119.

Rocha, P., Luvizotto, G.L., Kosmehl, T., Böttcher, M. Storch, V., Braunbeck, T., Hollert, H. (2009) Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): *In vitro* comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 72: 1842-1848.

Schnurstein, A., Braunbeck, T. (2001) Tail moment versus tail length - application of an *in vitro* version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotox. Environ. Safety* 49: 187-196.

Teo, W., Caprariello, A. V., Morgan, M.L., Luchicchi, A., Schenk, G.J., Joseph, J.T., Geurts, J.J.G., Stys, P.K., 2021. Nile Red fluorescence spectroscopy reports early physicochemical changes in myelin with high sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, 1–11.

Zhang, Y., Wang, C., Huang, L., Chen, R., Chen, Y., Zuo, Z., 2012. Low-level pyrene exposure causes cardiac toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 114-115, 119-124.

## 14. ANLAGEN

Annex 1:	Berichtsblatt zu Projekt RESPONSE Heidelberg		Berichtsblatt RESPONSE Heidelberg
Annex 2:	Document Control Sheet zu Projekt RESPONSE Heidelberg		Control sheet RESPONSE Heidelberg
Annex 3:	Erklärung Quersubventionierung zu Projekt RESPONSE		Erklärung Quersubventionierung
Annex 4:	Abschlussbericht Gesamtprojekt RESPONSE		Final report RESPONSE Gesamtprc
Annex 5:	Annex II zu Abschlussbericht Gesamtprojekt RESPONSE		Annex II.pdf
Annex 6:	 Deliverable 1.1.pdf	Annex 29:	 Deliverable 4.8.pdf
Annex 7:	 Deliverable 1.2.pdf	Annex 30:	 Deliverable 5.1.pdf
Annex 8:	 Deliverable 1.3.pdf	Annex 31:	 Deliverable 5.2.pdf
Annex 9:	 Deliverable 1.4.pdf	Annex 32:	 Deliverable 5.3.pdf
Annex 10:	 Deliverable 1.5.pdf	Annex 33:	 Deliverable 5.4.pdf
Annex 11:	 Deliverable 2.1.pdf	Annex 34:	 Deliverable 5.5.pdf
Annex 12:	 Deliverable 2.2.pdf	Annex 35:	 Deliverable 5.7.pdf

Annex 13:



Deliverable 2.3.pdf

Annex 14:



Deliverable 2.4.pdf

Annex 15:



Deliverable 2.5.pdf

Annex 16:



Deliverable 2.5.pdf

Annex 17:



Deliverable 2.7.pdf

Annex 18:



Deliverable 2.9.pdf

Annex 19:



Deliverable 3.1.pdf

Annex 20:



Deliverable 3.2.pdf

Annex 21:



Deliverable 3.3.pdf

Annex 22:



Deliverable 3.4.pdf

Annex 23:



Deliverable 3.5.pdf

Annex 24:



Deliverable 4.1.pdf

Annex 24:



Deliverable 4.3.pdf

Annex 36:



Deliverable 5.8.pdf

Annex 37:



Deliverable 6.1.pdf

Annex 38:



Deliverable 6.2.pdf

Annex 39:



Deliverable 6.3.pdf

Annex 40:



Deliverable 7.1.pdf

Annex 41:



Deliverable 7.2.pdf

Annex 42:



Deliverable 7.3.pdf

Annex 43:



Deliverable 7.4.pdf

Annex 44:



Deliverable 7.5.pdf

Annex 45:



Deliverable 7.6.pdf

Annex 46:



Deliverable 8.1.pdf

Annex 47:



Deliverable 8.2.pdf

Annex 48:



Deliverable 8.3.pdf

Annex 26:



Deliverable 4.4.pdf

Annex 27:



Deliverable 4.5.pdf

Annex 28:



Deliverable 4.6.pdf

Annex 49:



Deliverable 8.4.pdf

Annex 50:



Deliverable 8.5.pdf