



Verbundprojekt:

“Abschätzung der Umweltgefährdung durch Silber-Nanomaterialien: vom chemischen Partikel zum technischen Produkt“

Förderkennzeichen: 03X0091A

Laufzeit: 01.05.2010 bis 30.04.2013

Abschlussbericht der ausführenden Stelle mit Partnerkürzeln:

Universität Bremen

- 1. ÖKO, Allgemeine und theoretische Ökologie, FB2**
- 2. VdW, Verfahrenstechnik der Wertstoffrückgewinnung, FB4**

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 03X0091A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren:

Dr. rer. nat. Jan Köser, Dr. rer. nat. Maria Engelke, Dipl. Ing. Andrea Kück, Dipl.-Biol. Elena Lesnikov, Dr. rer. nat. Jürgen Arning, Prof. Dr. Jorg Thöming, Prof. Dr. Juliane Filser

Universität Bremen
Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologie (UFT)
Leobener Straße - UFT
28359 Bremen
Büro : 0421/218-63374
Fax : 0421/218-63302
Email : koeser@uni-bremen.de, m.engelke@uni-bremen.de
Web : www.uft.uni-bremen.de

Bremen, im Oktober 2013

Inhaltsverzeichnis

1	Kurzdarstellung des Projektes	5
1.1	Aufgabenstellung.....	5
1.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	6
1.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	8
1.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	9
1.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	10
2	Eingehende Darstellung	11
2.1	Darstellung der Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele	11
2.1.1	Arbeitspaket 1.1.1: Herstellung spezifischer Nanomaterialien	11
2.1.2	Arbeitspaket 1.2.2: Begleitanalytik zu den Arbeitspaketen 1.2.3 und 2.3.1 – 2.3.2	22
2.1.3	Arbeitspaket 1.2.3: Wirkungsuntersuchungen mit Screening-Tests.....	49
2.1.4	Arbeitspaket 2.3.1: Erfassung der Wirkung – Terrestrische Systeme, Sediment und Akkumulation.....	54
2.1.5	Arbeitspaket 2.3.2: Erfassung der Wirkung – Aquatische Systeme	67
2.1.6	Arbeitspaket 3.1: Lebenszyklusanalyse.....	73
2.1.7	Arbeitspaket 3.2: Risikobewertung	84
2.1.8	Arbeitspaket 4: Koordination	86
	Literatur.....	87
2.2	Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises Fehler! Textmarke nicht definiert.	
2.3	Notwendigkeit und Angemessenheit..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
2.4	Nutzen und Verwertbarkeit..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
2.5	Während des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt.. Fehler! Textmarke nicht definiert.	
2.6	Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
3	Erfolgskontrollbericht..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	

3.1	Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.2	Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.3	Fortschreibung des Verwertungsplans	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.4	Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.5	Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.6	Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Anhang.....		92
1	In diesem Projekt etablierte Versuchsvorschriften (SOP)	92
1.1	SOP zur Durchführung der Größenbestimmung mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS)	92
1.2	SOP zur Durchführung der Zetapotentialbestimmung mit der Methode der elektrophoretischen Lichtstreuung (ELS) nach Vorschlägen des NCL [Clogston et al. 2009, NCL Method PCC-2].....	93
1.3	SOP zur Bestimmung der Silber-Konzentration mittels Atomabsorptionsspektroskopie.....	94
1.4	SOP zur Reinigung von Glasgefäßen.....	98
2	Geräte, Verbrauchsmittel und Chemikalien	94
2.1	Geräte.....	94
2.2	Verbrauchsmittel	94
2.3	Chemikalien	94
3	Weitere Arbeitsvorschriften	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.1	Ansetzen der Ag-Stamm, bzw. Standardlösungen nach DIN 38 406 Teil 18.....	94
3.2	Ansetzen der Ag-Eichstandards im Medium	95
3.3	Veraschung (um alle Rückstände aus Medium o.ä. zu entfernen)	96
3.4	Verdünnung für AAS Messbereich	96
3.5	Durchführung der Messungen am AAS Unicam 989QZ.....	96
3.6	Auswertung der Daten.....	97
4	Berichtsblatt / Document Control Sheet.....	98

1 Kurzdarstellung des Projektes

1.1 Aufgabenstellung

Ziel des Verbundvorhabens war es, für Silbernanopartikel (AgNP) grundlegende Daten zu Verhalten, Verbleib und Wirkung in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen zu erarbeiten sowie unter Berücksichtigung der Vorgehensweise nach REACH eine exemplarische Risikoabschätzung durchzuführen. AgNP werden aufgrund ihrer bakteriziden Eigenschaften in zahlreichen Produkten des täglichen Lebens eingesetzt, wobei steigender Verbrauch zu erwarten war. In einem interdisziplinären Ansatz sollte eine Brücke zwischen Grundlagenerarbeitung und Praxisrelevanz geschlagen werden. Hierzu sollten parallel freie AgNP mit klar definierten Eigenschaften und reale AgNP enthaltende Produkte am Beispiel Textilien in exemplarischen Nutzungsszenarien untersucht werden, um später in einer Risikoanalyse zusammengeführt zu werden. Im Rahmen des Vorhabens sollten zudem Methoden entwickelt werden, die den Nachweis von AgNP sowie die Beurteilung ihres ökotoxikologischen Gefährdungspotenzials in relevanten Umweltmedien bzw. –kompartimenten ermöglichen.

Das Projekt verfolgte drei Teilziele:

1. Das erste Teilziel war die Identifikation von Zusammenhängen zwischen spezifischen Nanomaterialeigenschaften und dem Verhalten und der Wirkung von AgNP zur Erarbeitung von generellen Aussagen. Teilaufgaben hierzu waren zum einen die Herstellung und die chemische Charakterisierung von AgNP mit spezifischen Eigenschaften und zum anderen die Bestimmung des Verhaltens und der Wirkung von diesen AgNP.
2. Das zweite Teilziel war die Untersuchung des Verbleibs, der Exposition und Wirkung von Silber in Verbrauchsprodukten anhand von produktspezifischen Silbernanomaterialien. Teilaufgaben hierzu waren die Simulation nutzungsrelevanter Szenarien, die Charakterisierung der Exposition und die Charakterisierung von biologischen Effekten.
3. Das dritte Teilziel war die Gefährdungs- und Risikoabschätzung für Silbernanomaterialien. Hier sollte die Gefährdungs- und Risikoabschätzung an spezifischen, idealisierten Szenarien unter Berücksichtigung der Variabilität von AgNP und Produkten durchgeführt werden. Dies sollte basierend auf den Ergebnissen der Teilziele 1 und 2 geschehen.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Es war Ziel der Bekanntmachung des BMBF vom 18.07.2008, auf der dieses Vorhaben beruht, den Eintrag, die Verteilung, den Verbleib und die Wirkung von synthetisierten Nanopartikeln und Nanomaterialien in der Umwelt zu erforschen. Das Vorhaben wählte das Thema „Silber-Nanopartikel“ aufgrund einer Literaturstudie (UBA, FKZ 360 04 020, K. Hund-Rinke et al. 2008). Danach wurden zu dem Zeitpunkt der Studie bereits jährlich 1.100 kg Nanosilber in umweltrelevanten Bereichen eingesetzt. Es wurde prognostiziert, dass bis zum Jahr 2015 die Einsatzmenge signifikant steigen würde, wobei die wesentlichen Zuwächse für Anwendungen mit AgNP erwartet wurden. Die Kenntnisse bezüglich Wirkung, Verhalten und Verbleib von AgNP in der Umwelt waren zum Zeitpunkt der Antragstellung äußerst gering.

In dem von der Universität Bremen koordinierten Verbund waren die Partner VdW und ÖKO mit Partnern aus Industrie, Forschung und Regulierungsbehörden beteiligt:

<i>Kürzel</i>	<i>Partner</i>	<i>Beteiligung an AP VDW</i>
ÖKO	Ökologie, FB 2, Universität Bremen , UFT Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologien	1.2.3 2.3.1 2.3.2 3.1
HI	BPI Hohenstein e.V. , Abteilung Textile Dienstleistungen und Innovationen	3.1
IME	Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie	2.3.1 2.3.2 3.1
UBA	Umweltbundesamt, FG IV 2.1	2.3.2
TuDr	TU Dresden , Institut für Verfahrenstechnik und Umwelttechnik	1.1.2 1.2.2
UM	Universität Marburg , FB Physik, AG Biophotonik	1.1.1 1.2.2 1.2.3
IWT	Stiftung Institut für Werkstofftechnik (IWT) , Abteilung Verfahrenstechnik	1.1.1 1.2.2
VdW	Verfahrenstechnik der Wertstoffrückgewinnung, FB 4, Universität Bremen	1.1.1 1.2.2 1.2.3 3.1
BUI	Bremer Umweltinstitut GmbH	3.1
BGR	Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Fachbereich Boden als Ressource – Stoffeigenschaften und Dynamik	1.2.4 2.2.2
JRC	Europäische Kommission: Joint Research Centre (JRC), Institute for Health and Consumer Protection (IHCP), Institute for Environment and Sustainability (IES)	3.2
CHT	CHT R. Beitlich GmbH,	2.1.1
RAS	rent a scientist GmbH	2.1.1
OMPG	Ostthüringische Materialprüfungsgesellschaft für Textil- und Kunststoffe mbH (smartfiber AG)	2.1.1

Das Projekt gliederte sich in zwei Gruppen gemäß der Teilziele und der geplanten APs. Die erste Gruppe beschäftigte sich vor allem mit der Herstellung und der Charakterisierung von Nanomaterialien. Die zweite Gruppe untersuchte den Verbleib, die Exposition und die Wirkung von Silber in Verbrauchsprodukten. Die Gefährdungs- und Risikoabschätzung für Silbernanomaterialien wurde von Teilen beider Gruppen bearbeitet.

Dieser Bericht stellt die Ergebnisse der Arbeitspakete vor, an denen die Partner VdW und ÖKO der Universität Bremen beteiligt waren. Da die bearbeiteten Arbeitspakete in Zusammenarbeit mit anderen Projektpartnern durchgeführt wurden, werden, soweit erforderlich, zum Teil auch Ergebnisse anderer Projektpartner mit aufgeführt.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Der Partner VdW war in die Arbeitspakete eingebunden zur Herstellung spezifischer Nanomaterialien (AP 1.1.1) und zur Begleitanalytik (AP 1.2.2), zu der Erfassung der Wirkung von NM in den Screeningversuchen (AP 1.2.3), der Erfassung der Wirkung in terrestrischen Systemen (AP 2.3.1) und in aquatischen Systemen (AP 2.3.2). Zudem war der Partner VdW federführend beteiligt am Arbeitspaket zur Lebenszyklusanalyse (AP 3.1).

Im Rahmen des Arbeitspaketes 1.2.2 zur Begleitanalytik wurde mit den Partnern TUDr, UM, BGR und IME zusammengearbeitet bei der Erstellung der *standard operation procedures* (SOP) für die Dynamische Lichtstreuung und die Messungen des Zetapotentials. Ringversuche hierzu sowie zur Bestimmung des Silbergehalts wurden mit den Partnern BGR und TUDr durchgeführt. Bei der Charakterisierung der TiO₂/Ag₂O-Kompositpartikel in Dispersion wurde mit dem Partner IWT zusammengearbeitet. Für den Partner UBA wurde im Auftrag die Charakterisierung der Partikel NM300K in den Medien für die aquatischen toxikologischen Tests durchgeführt.

Der Gesamtverbund wurde vom Partner ÖKO koordiniert (AP 4). Partner ÖKO war federführend in den Arbeitspaketen 1.2.3: Wirkungsuntersuchungen mit Screening-Tests und AP 2.3.1: Erfassung der Wirkung - Terrestrische Systeme, Sediment, Akkumulation. Weiterhin war er beteiligt an den Arbeitspaketen 2.3.2: Erfassung der Wirkung - aquatische Systeme; 3.1 Lebenszyklusanalyse und 3.2 Gefährdungs- und Risikobewertung.

Tabelle K-1: Zeitlicher Verlauf der Arbeitspakete der Partner ÖKO & VdW

Nr.	Arbeitspaket	2010	2011	2012	2013
AP 1.1.1	Herstellung spezifischer Nanomaterialien				
AP 1.2.2	Begleitanalytik zu AP 1.2.3, 2.3.1-2.3.2				
AP 1.2.3	Wirkungsuntersuchungen mit Screening Tests				
AP 2.3.1	Erfassung der Wirkung- Terrestrische Systeme				
AP 2.3.2	Erfassung der Wirkung - aquatische Systeme				
AP 3.1	Lebenszyklusanalyse				
AP 3.2	Gefährdungs- und Risikobewertung				
AP 4	Koordination				

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Partner VdW: Bezüglich der Partikelherstellung wird in einzelnen Veröffentlichungen die Mikroreakorteknik zur Verbesserung der Partikelqualität beschrieben (Zhao et al. 2011). Vorrangig wird hier der Volumenstrom zur Steigerung der Mischgüte als zusätzlicher Stellparameter genutzt. Verschiedene, synthese-spezifische Mikromischer-Konstruktionen können aus der Literatur entnommen werden. Werden Nanopartikelsynthesen in Kombination mit der Mikroreaktionstechnik publiziert, handelt es sich in den meisten Fällen um Fällungsreaktionen, welche durch die erhöhte Mischeffizienz optimiert werden können. Da die Art des Mikromischers und der Verweilstrecke von der jeweiligen Synthese abhängen, müssen der konkrete Versuchsaufbau sowie die dazugehörigen Bedingungen für jede Herstellung einzeln ermittelt werden. Zudem konnte durch die Zusammenarbeit mit dem Partner ÖKO und die Mitarbeit in dem Promotionskolleg „nanoToxcom“ aufgebaut werden auf die Erfahrungen zur Charakterisierung von Nanopartikeln mit der Dynamischen Lichtstreuung zur Bestimmung der hydrodynamischen Durchmesser und der elektrophoretischen Lichtstreuung zur Bestimmung des Zetapotentials.

Fokus des Partners ÖKO ist die prospektive Abschätzung neuer Umweltrisiken mit dem Schwerpunkt auf Böden, Nanopartikel und Wechselwirkungen der Substanzen mit der Umgebungsmatrix. Ein breites Spektrum an standardisierten ökotoxikologischen Testsystemen reicht von marinen Bakterien über Algen und Wasserpflanzen bis hin zu terrestrischen Pflanzen und Bodenorganismen. Der Partner ÖKO forscht seit 2006 zu Risiken von Nanopartikeln und war u.a. Partner und Koordinator des interdisziplinären Promotionskollegs „nano-Toxcom“. Hier wurden diverse Ansätze entwickelt, Standardtests für Anforderungen an den Einsatz mit Nanomaterialien in puncto Zeit- und Materialaufwand, Aussagekraft und ökologischer Relevanz zu optimieren (Filser et al. 2013).

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Um einen kontinuierlichen Informationsaustausch zu gewährleisten, fanden fünf Treffen aller Partner im Verbund statt, bei denen die Verbundpartner den Stand ihrer Arbeiten präsentierten, diskutierten und den weiteren Ablauf vereinbarten. Darüber hinaus gab es drei Treffen des Gesamtverbundes im Rahmen der DaNa-Clustertreffen der BMBF-Fördermaßnahmen NanoCare und NanoNature in Frankfurt, bei denen sich die Partner miteinander austauschen konnten. Zudem fand ein kleines Arbeitstreffen zur Absprache der Vorgehensweise bei der Charakterisierung von Dispersionen mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung statt:

10. Juni 2010	Kickoff-Meeting an der Universität Bremen
10.-11. Februar 2011	Projekttreffen beim Partner UM an der Universität Marburg
22. Februar 2011	DLS-Treffen beim Partner TUDr an der Technischen Universität Dresden
10. Mai 2011	DaNa Clustertreffen bei der DECHEMA in Frankfurt a. M.
28.-29. September 2011	Projekttreffen beim Partner BGR in Hannover
12. März 2012	DaNa Clustertreffen bei der DECHEMA in Frankfurt a. M.
27.-28. September 2012	Projekttreffen beim Partner TUDr an der Technischen Universität Dresden
14.-15. Januar 2013	DaNa Clustertreffen bei der DECHEMA in Frankfurt a. M.
14.-15. März 2013	abschließendes Treffen beim Partner UBA in Berlin

2 Eingehende Darstellung

2.1 Darstellung der Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

2.1.1 Arbeitspaket 1.1.1: Herstellung spezifischer Nanomaterialien

Ziel dieses AP war die kontrollierte Synthese von silberbasierten Referenzmaterialien zur Untersuchung der grundlegenden Mechanismen bei deren Wirkung auf biologische Modellsysteme in Abhängigkeit definierter Umweltmatrices. Dabei kamen zwei grundsätzlich verschiedenen Arten von silberbasierten NM zum Einsatz, die zum Zeitpunkt der Antragstellung in Anwendungen zu finden waren: Silber auf einer Metalloxid-Trägermatrix (Ag/TiO₂-NP) und reine Silbernanopartikel (AgNP). Dafür wurden zwei verschiedene Synthesemethoden verwendet (Flammensynthese, Kolloidsynthese). Das Verhalten von silberbasierten NP (Ag/TiO₂-NP und AgNP) wird wesentlich durch ihre Oberflächenmodifikation beeinflusst (lyophobic, lyophil). Dieser Aspekt sollte durch gezielte Modifikation der NP-Oberfläche ebenfalls untersucht werden. Gleichzeitig sollten Fluoreszenzmethoden zur Detektion der NP im biologischen Gewebe zum Einsatz kommen.

Der Projektpartner VdW sollte, basierend auf den Erfahrungen in der Mikroreaktionstechnik zur Prozessintensivierung beispielweise in der Synthese von ionischen Flüssigkeiten und der Herstellung nanopartikulärer Stoffe, in diesem Arbeitspaket ein Mikroreaktorsystem zur kontinuierlichen Nanopartikelsynthese aufbauen. Ziel dabei war, die kontinuierliche und durch eine genaue Parameterwahl reproduzierbare Produktion von Silber-Nanopartikeln mit scharfer Größenverteilung zu ermöglichen. Dies war vor allem wichtig für vergleichbare Aussagen aus den toxikologischen und ökotoxikologischen Tests. Zunächst sollten mit Vorversuchen die groben Eckdaten (wie Volumenstrom, Temperatur, Druck, Edukt-Konzentrationen) zur Auslegung der Anlagen-Komponenten bestimmt werden. Mit den ermittelten optimalen Parametern sollte darauf folgend eine Anlage zur kontinuierlichen Synthese von Nanopartikeln entworfen werden. Die Auswertung der Versuche mit den jeweiligen Prozessparametern sollte unter Einbeziehung der Ergebnisse der Partikelcharakterisierung AP 1.1.2 bewertet werden.

Herstellung spezifischer Nanomaterialien in einem Mikroreaktorsystem

Es wurden zwei unterschiedliche Synthesen untersucht, eine basierend auf organischem Lösungsmittel und eine wässrige, umweltfreundliche Synthese mit wenig toxischen Komponenten. Mit dem in Abbildung 1 gezeigten System ließ sich letztere erfolgreich auf die kontinuierliche Prozessführung übertragen. Durchsätze von 78 L/d (bei 6h Produktion/d und 2h Reinigung/d) an Partikeldispersion sind möglich, so dass der Prozess für die industrielle Produktion geeignet erscheint. Die dazugehörigen (Öko-)Toxizitätstests finden sich in den weiteren Arbeitspaketen (Kap. 2.1.3, S. 51 und 2.1.5, S. 72).

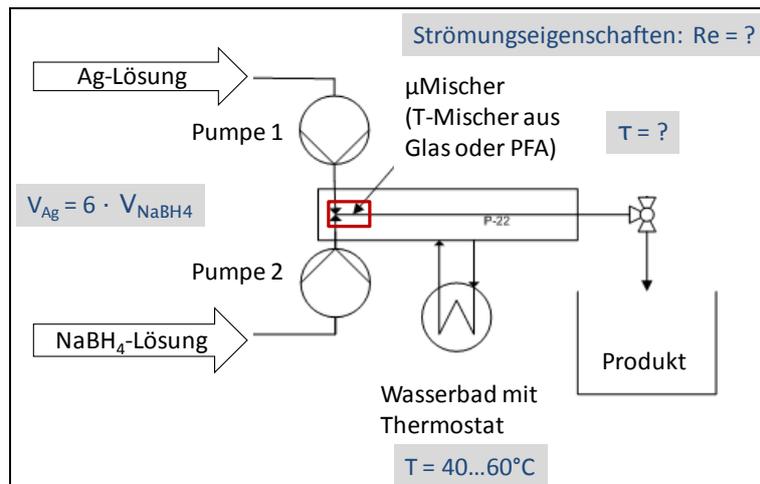


Abbildung 1: Fließbild der Mikroreaktoranlage mit den am Anfang zu ermittelnden Parametern (grau unterlegt).

Zur Konstruktion des Mikromischers wurden verschiedene Aspekte wie Dimension, Kanalquerschnitt, Werkstoff, Wechselwirkung Lösungsmittel/Partikel-Reaktorwand betrachtet. Die Anforderungen an den Reaktorwerkstoff sind groß, da nicht nur die Herstellung kostengünstig sein soll. Insbesondere sollte der Werkstoff die Partikelsynthese z.B. durch sekundäre Keimstellen nicht beeinflussen und auch mit den Partikeln selbst möglichst wenig wechselwirken, um Verblockungen zu vermeiden.

Bei der Herstellung von Silber-Nanopartikeln war weiterhin der Aspekt der Chemikalienbeständigkeit vor allem im Hinblick auf die Reinigungslösungen (hochprozentige Salpetersäure) zu beachten. Für die Werkstoffversuche zur Materialbeständigkeit wurden drei Mikromischer mit identischer Struktur (T-Mischer, quadratischer Querschnitt 400µm x 400µm Kantenlänge, gleiche Länge des Verweilers 55mm) gefertigt, siehe Abbildung 2. Es wurden ein Glas-, ein Kunststoff (PEEK)- und ein Edelmischler getestet. Der Kunststoffmischer stellte sich als bevorzugtes Material heraus, da dieser Werkstoff bei der Synthese selbst und dem anschließenden Reinigungsschritt am unempfindlichsten in der Handhabung war und die Partikeleigenschaften konstant gehalten werden konnten. Aufgrund der großen Neigung der Nanopartikel, an der Reaktorwand zu haften (Fouling), wurden hinreichend große Querschnitte ge-

wählt, um einer Verblockung vorzubeugen. Es ist, je nach Verweilzeit und Kanalquerschnittsgeometrie, ein Mindestdurchmesser von 500 μm zu empfehlen. Als am besten passende Kanalquerschnittsgeometrie stellte sich die kreisrunde Form heraus. Durch die fehlenden Ecken im Querschnittsprofil konnte die Partikelanlagerung deutlich reduziert werden.

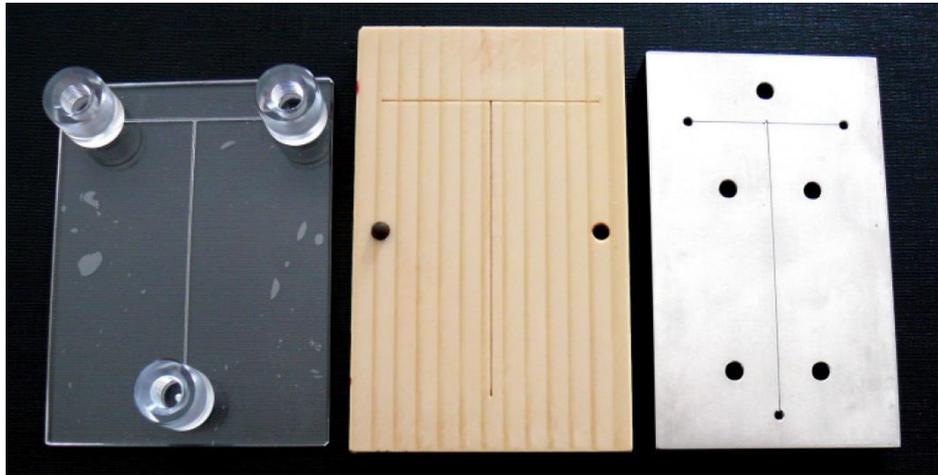


Abbildung 2: T- μ Mischer aus unterschiedlichen Werkstoffen mit identischen Dimensionen, von links Borosilikatglas (Fa. Little Things Factory), PEEK und Edelstahl (Eigenproduktion).

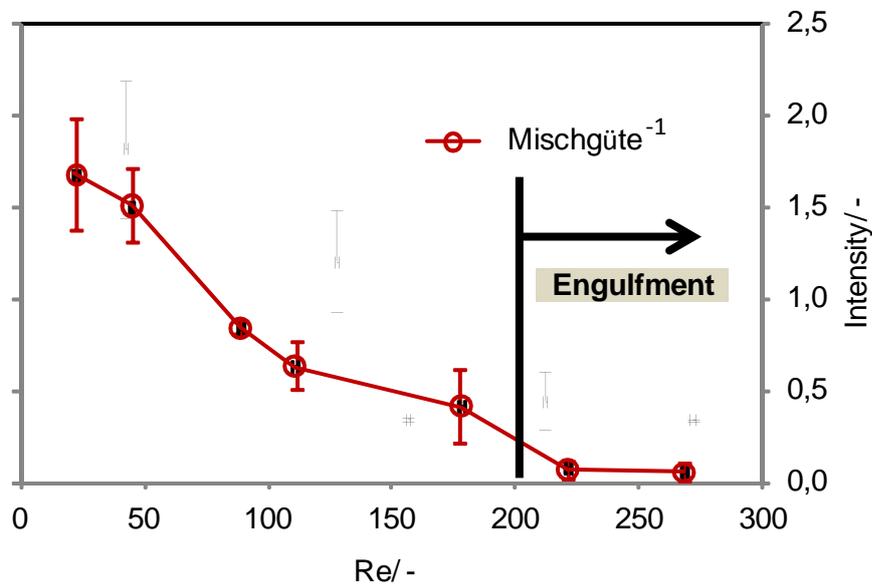


Abbildung 3: Verringerung der inversen relativen Mischgüte (gemessen als Farbintensität der Villermaux/Dushman-Produktlösung) in Abhängigkeit von der Reynoldszahl Re . Je effizienter die Durchmischung, desto geringer die Farbintensität der Produktlösung. Der gewählte Reynoldsbereich stellte den Übergang vom streng laminaren Strömungsprofil zum Engulfmentbereich dar ($MW \pm SD$).

Eine entscheidende Größe bei der Auslegung des Mikromischers ist die Mischgüte, welche mit Hilfe der Villermaux/Dushman-Reaktion ermittelt wurde. Im Allgemeinen liegt in einem Mikromischer eine laminare Strömung vor, welche oft mit Hilfe von konstruktiven Elementen durchbrochen oder z. B. mit Segmented Flow umgangen wird. Für eine enge Partikelgrößenverteilung ist es wichtig, dass die Keimbildung homogen erfolgt, da bei heterogener Nukleation das Partikelwachstum zeitlich versetzt eintritt. Neben den konstruktiven Möglichkeiten, der Keimbildung entgegenzuwirken, ist es auch möglich, bei einem einfachen T-Mischer die Mischgüte deutlich zu erhöhen.

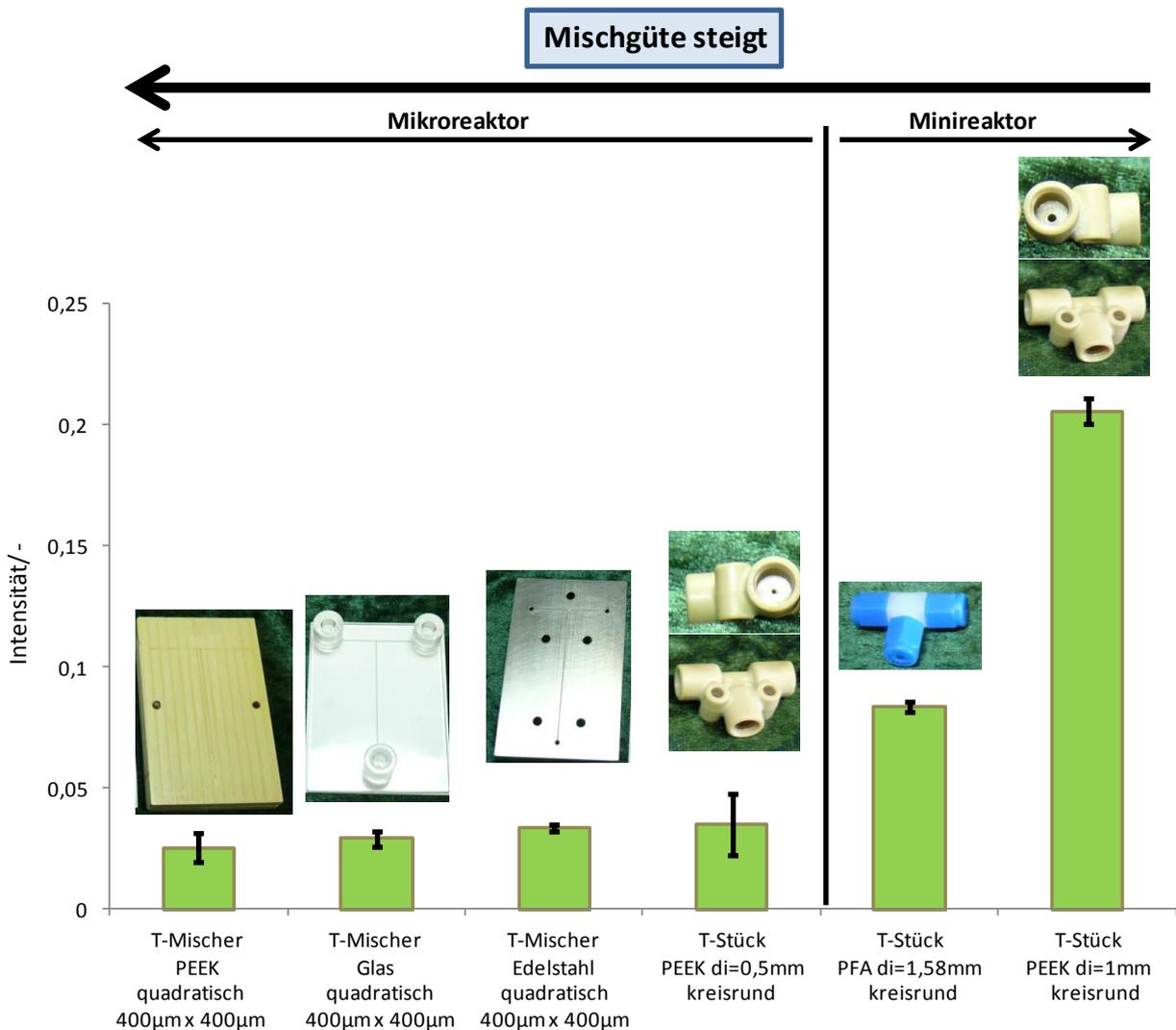


Abbildung 4: Relative Mischgüte (gemessen als Farb-Intensität der Villermaux/Dushman-Produktlösung) für unterschiedliche Mischertypen, Re-Zahl = 227

Zunächst wurden verschiedene Volumenströme getestet, um den Übergang vom streng laminaren Strömungsprofil zum Engulfmentbereich aufzuzeigen. Ab einer Reynoldszahl von ca. 180-200 setzt das sogenannte Engulfment ein. Hierbei „kreuzen“ sich die Strömungsla-

mellen, wodurch die Mischgüte erhöht wird (siehe Abbildung 3). Aus diesem Grund sind alle Volumenströme so zu wählen, dass eine Reynolds-Zahl von mindestens 200 erreicht wird.

Eine signifikante Steigerung der Mischgüte durch die Ecken im quadratischen Querschnittsprofil konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 4). Jedoch wird deutlich, dass bei „echten Mikroreaktoren“ (innere Dimension beträgt maximal 1 mm) eine bessere Durchmischung als bei Mini-Reaktoren (innere Dimensionen wenige Millimeter) vorliegt. Dem entgegen steht die zuvor erwähnte Verblockungsneigung. Ferner galt es bei der Wahl der Querschnittsgeometrie darauf zu achten, dass die Anlagerungen bereits aus elementarem Silber bestehen oder nanopartikulär sind. Im letzteren Fall ließen sich die Anlagerungen unter Umständen durch genügend hohe Abrasion wieder lösen.

Die Ermittlung der optimalen Versuchsparameter für die kontinuierliche Synthese im Mikroreaktor erfolgte mittels des in Abbildung 1 dargestellten Versuchsaufbaus. Wie wichtig die Beachtung des Reaktor-Fouling ist, zeigte ein Vorversuch mit einer wässrigen Silber-Nanopartikelsynthese. Innerhalb von Sekunden änderte sich der mittlere Partikeldurchmesser, wie in Abbildung 5 dargestellt.

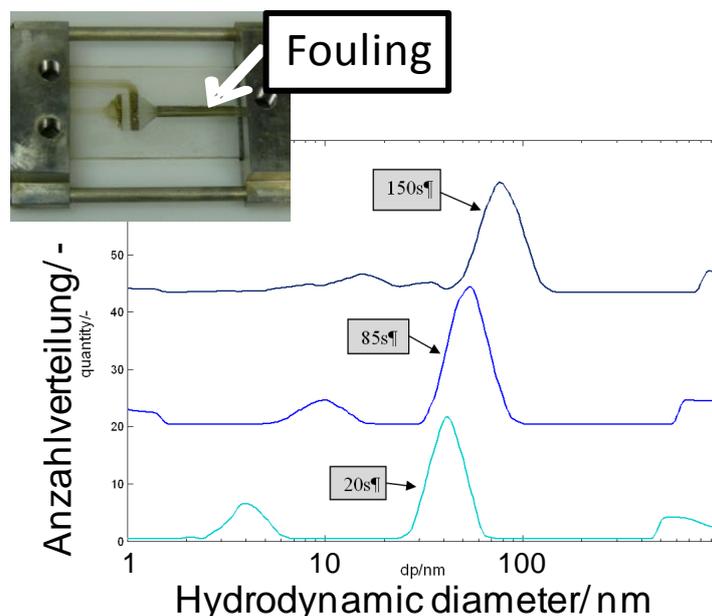


Abbildung 5: Veränderung des Nanopartikeldurchmessers über die Zeit bei steigendem Foulingbelag an der Reaktorinnenfläche. Hier gezeigt bei der Synthese von AgNP in einem Interdigital-Glas-Mischer.

Unter diesen Bedingungen wären reproduzierbare Partikeleigenschaften im großen Herstellungsmaßstab nicht möglich. Sind jedoch die geeigneten synthese-spezifischen Systemparameter gefunden, können gut reproduzierbare Eigenschaften gewährleistet werden. Ergebnisse für eine geeignete Kombination von Systemparametern sind zu ermitteln. Es zeigte

sich, dass die Erhöhung der Reynoldszahl das Reaktorfouling minimierte, vermutlich lösen sich nanopartikuläre Ansammlungen an der Oberfläche durch die Abriebskräfte der Strömung wieder.

Herstellung von AgNP–Dispersionen mit Gluconat-Coating oder Glutathion-Coating

Synthese von AgNP mit weniger toxischen Edukten („grüne“ Nanopartikelsynthesen) benutzen z.B. Glucose als Reduktionsmittel. Die oxidierte Form der Glucose, das Gluconat, liegt dann als stabilisierender Ligand auf der Oberfläche der AgNP vor. Die Herstellung der Gluconat-stabilisierten AgNP-Dispersionen erfolgte im Mikroreaktor. Es wurde mit der Variation der Systemparameter gezeigt, dass mit steigender Reynoldszahl, d.h. mit steigender Mischgüte, die Partikeldurchmesser kleiner werden und die Breite der Größenverteilung schmaler wird (Abbildung 6). Derselbe Effekt fiel bei der Referenz-Synthese von Bariumsulfat noch deutlicher aus, d. h. der hydrodynamische Partikeldurchmesser verringerte sich zügiger.

Im Vergleich der Mini- und Mikromischer (Abbildung 4) ist zwar die Mischgüte bei Mikroreaktoren besser, jedoch zeichnet sich ein Unterschied in der Partikelgröße nur tendenziell ab und ist nicht signifikant (Abbildung 7). Die Reproduzierbarkeit der durchgeführten Synthese war sehr gut. Schon bei nur drei wiederholten Synthesen ergab sich bei einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser $d_m = 72$ nm eine Standardabweichung der mittleren Durchmesser von nur 4 nm (CUMU Algorithmus). Zudem wird aus dem Vergleich der TEM Bilder von AgNP aus Batchsynthesen mit AgNP aus Mikroreaktorsynthesen deutlich, dass mit der Mikroreaktionstechnik schmalere Größenverteilungen erreicht werden können (siehe Abbildung 8). Des Weiteren waren die Partikelformen bei der Mikroreaktionstechnik näher an der idealen Kugelform.

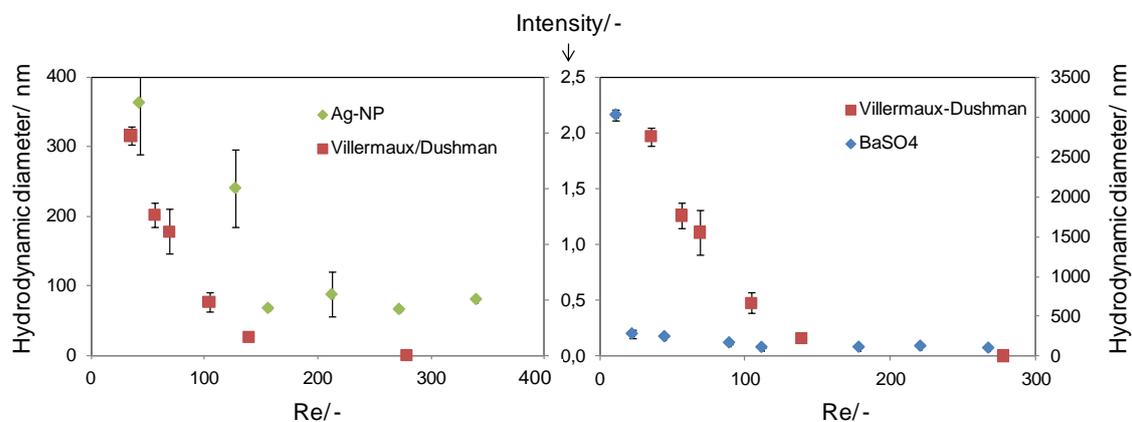


Abbildung 6: Charakterisierung der AgNP (Gluconat-Coating) mit DLS in Abhängigkeit von der Reynoldszahl bei der Synthese (CUMU Algorithmus). Die Mischgüte ist hier dargestellt mit Hilfe der Villermaux/Dushman-Reaktion.

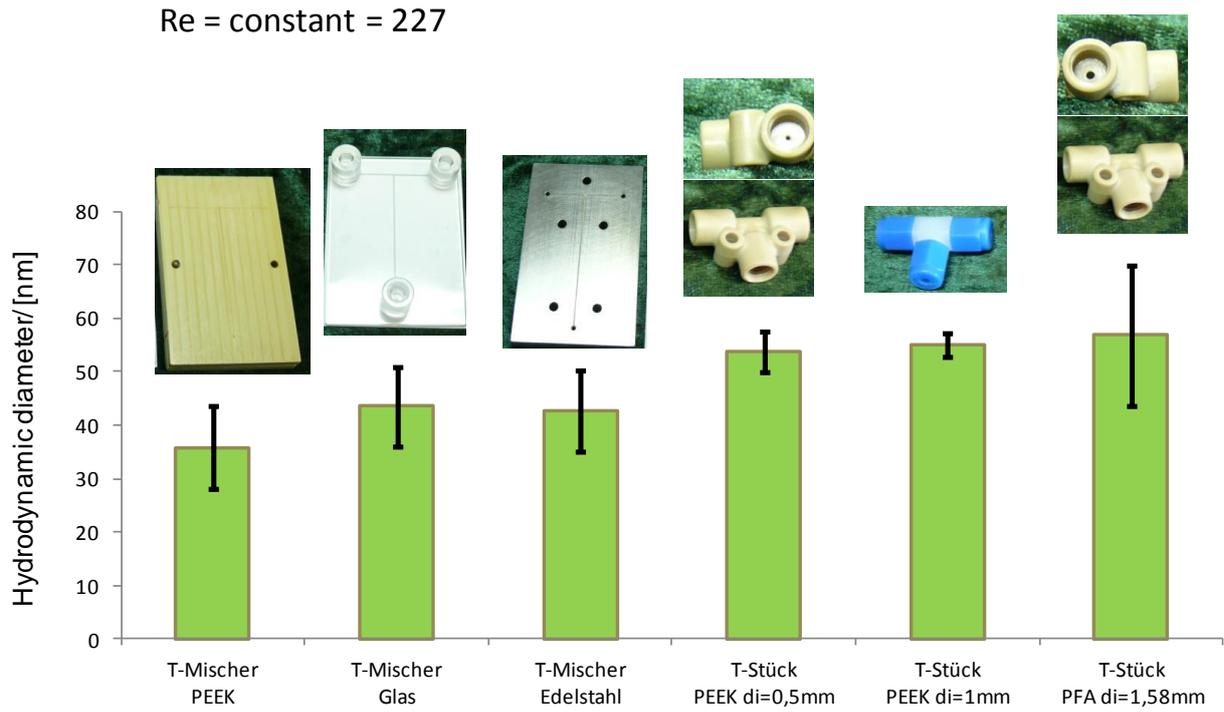


Abbildung 7: Partikelgrößen und deren Verteilungsbreite synthetisiert in verschiedenen Mischern.

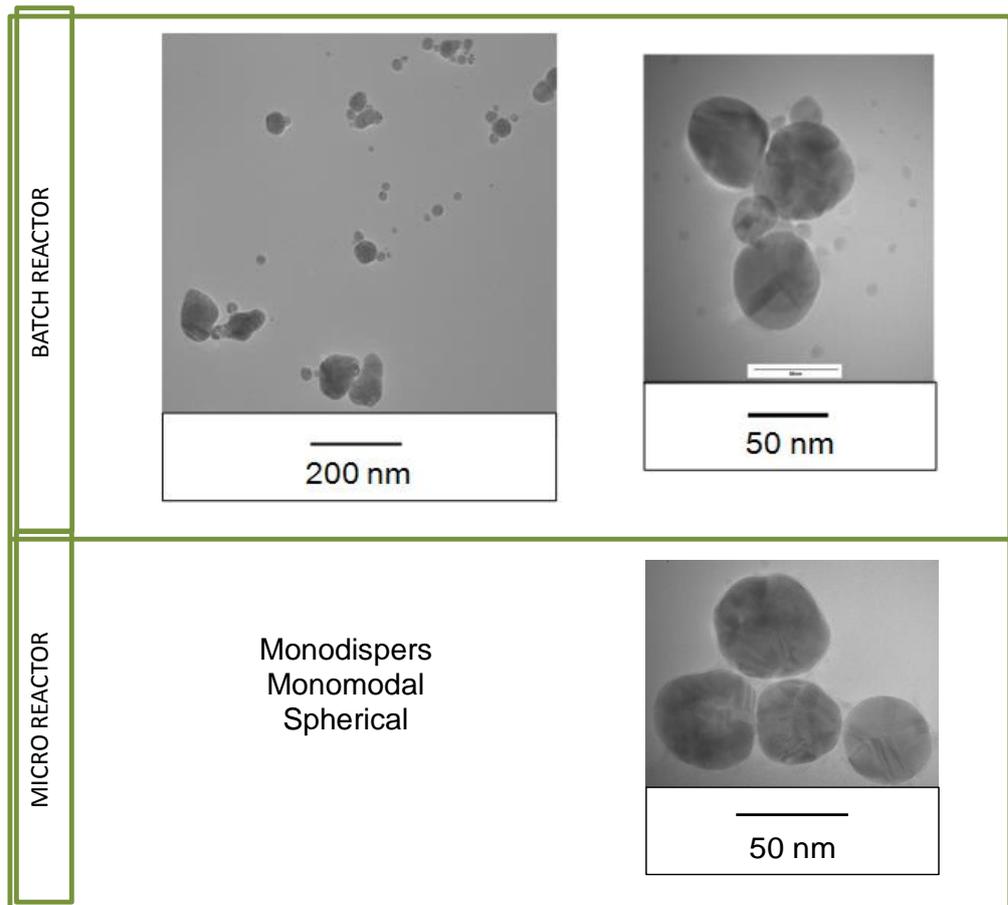


Abbildung 8: Auswirkung der Reaktionsführungen als Batch- und als Mikroreaktor auf die Partikelgrößenverteilung und die Partikelform.

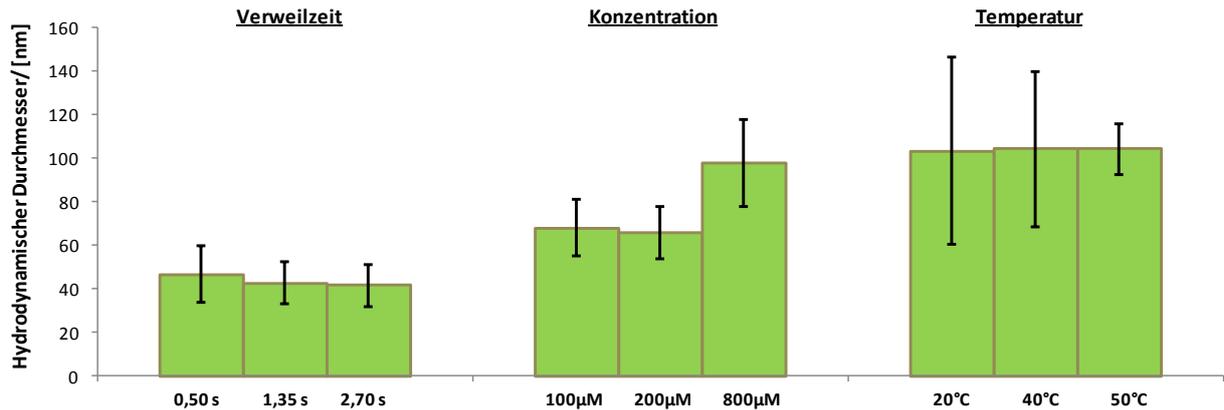


Abbildung 9: Die Partikelgröße zeigt keine signifikanten Abhängigkeiten von der Verweilzeit, der Konzentration und der Temperatur. Allerdings nimmt die Streuung der Größenverteilung mit ansteigender Temperatur deutlich ab.

Syntheseroute und Umfunktionalisierung

Eine alkalische Glucoselösung, deren Glucosekonzentration 42,32 mM (mit NaOH 2,82 mM) ist, wurde mittels einer Mikrozahnringpumpe (110 mL/min) und einer Silbernitrat-Lösung (AgNO_3 4,64 mM) mittels einer Spritzenpumpe (7,81 mL/min) zum Mischer gefördert. Beide Lösungen wurden zuvor mit MilliQ-Wasser angesetzt. Als Mischer diente ein Kunststoff T-Stück (Perfluoralkoxylalkan, PFA) mit einem Innendurchmesser von 1,58 mm. Die fertige Reaktionslösung durchfloss dann eine 2700 mm lange PFA-Kapillare mit 1,58 mm Innendurchmesser, die mit Hilfe eines Wasserbades auf 40 °C temperiert wurde (Versuchsaufbau analog zu Abbildung 1), wobei bei einer Reynolds-Zahl von 2404 die mittlere Verweilzeit der Reaktionslösung 2,7 s betrug.

Als „grünes“ Coating von AgNP und stabilisierender Ligand wurde das Tripeptidmolekül Glutathion eingesetzt. Das Glutathion-Coating erfolgte mit 50% der AgNO_3 der ursprünglichen Synthese Konzentrationsmenge. Für die Umfunktionalisierung wurden 50 mL einer 0,3% Glutathion-Lösung (w/w) in einem Kolben vorgelegt und mit 450 mL der frisch synthetisierten AgNP-Dispersion aufgefüllt. Die Verweilzeit bis zum Aufbereitungsschritt betrug 5 min. Die Aufbereitung der Dispersionen mittels Dialyse gegen Milli-Q-Wasser (entionisiertes, staub- und keimfreies Wasser, MQ- H_2O) diente der Entfernung überschüssiger Edukte. Nach der erfolgreichen Dialyse liegen die AgNP im wässrigen Lösungsmittel vor. Zur Vorbereitung und Konservierung der Proben für die Bestimmung des tatsächlichen Silbergehalts (und damit der Ausbeute) mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) wurden 10 µL einer 1%- HNO_3 -Lösung zu 100 µL der dialysierten AgNP-Dispersionen gegeben.

Die gemessenen Silberkonzentrationen betragen etwa 50% der Nominalkonzentration für beide Lösungen, d.h. 11,8 mg/L ($\pm 0,1$ mg/L) für die Gluconat- und 4,6 mg/L ($\pm 0,1$ mg/L) für die Glutathion-gecoateten AgNP. Die Ergebnisse der Charakterisierung der synthetisierten AgNP sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Das Aufbringen des Liganden 11-Mercaptoundecansäure erfolgte ebenso wie die Synthese bei einer Temperatur von 40 °C. Es wurden von einer 5,7 mM Mercaptoundecansäure-Lösung 20 mL in einem temperierten Kolben vorgelegt. Die frisch synthetisierte AgNP-Dispersion wurde über eine Schlauchpumpe hinzu dosiert (100mL, 7mL/min). Die vermengten Eduktlösungen wurden bei 40 °C über einen Zeitraum von 90min gerührt. Die enge Größenverteilung der AgNP änderte sich durch diese Prozedur nicht.

Tabelle 1: Charakterisierung der synthetisierten AgNP mit Lichtstreuungsmethoden (DLS & ELS; MW \pm SD)

Synthese	Stufe	Hydrodyn. Durchmesser (CUMU) [nm]	Zetapotential [mV]	pH
AgNP + Gluconat	Rohprodukt dialysiert	69 \pm 6 72 \pm 4	-42 \pm 12 -30 \pm 3	10,9 \pm 0,2 5,4 \pm 0,2
AgNP + Glutathion	Rohprodukt dialysiert	67 \pm 7 64 \pm 5	-48 \pm 4 -34 \pm 5	9,6 \pm 0,4 5,1 \pm 0,1
AgNP + Mercapto- undecansäure	Rohprodukt dialysiert	80 \pm 5 79 \pm 7	-45 \pm 2 -50 \pm 7	9,9 \pm 0,1 6,2 \pm 0,1

Herstellung von AgNP nach der Methode des Partners UM

Die Synthese von AgNP in Ethanol nach der Vorschrift von Mari et al. (2010) ließ sich nur anteilig auf kontinuierliche Mikroreaktionstechnik umstellen. Denn nur der eigentliche Syntheseschritt konnte im Mikroreaktor durchgeführt werden (Abbildung 10), während sich für die folgenden Aufarbeitungsschritte (Reinigung, Trocknung, Polymer-Coating) aufgrund ihrer Komplexität nur Batch-Verfahren als sinnvoll erwiesen. Dieses bedeutete vor allem im großen Herstellungsmaßstab einen erhöhten Zeitaufwand und wurde nicht weiter verfolgt. Die Synthesevorschrift wurde soweit wie möglich bei der Prozessübertragung auf den Mikroreaktor übernommen, d.h. Verweilzeit, Temperatur und Konzentrationen wurden konstant gehalten, da Nanopartikel-Synthesen meist sensibel gegenüber Parameteränderungen reagieren.

Vor der Übertragung der AgNP-Synthese auf den Mikroreaktor ist vorab der Ligand Natrium S-Dodecylthiosulfate (SDTS) zu synthetisieren (Mari et al. 2010). Der erste Synthese-Schritt wird bei dem Transfer auf den kontinuierlichen Prozess unterteilt in die Fällung und die anschließende Verweilzeit von 3 Stunden. Während die Fällung auf den Mikroreaktor übertragen wurde, wurde der folgende Schritt aufgrund der für Mikroreaktoren sehr langen Verweilzeit von 3 h weiterhin im Batch-Prozess durchgeführt (siehe Abbildung 10).

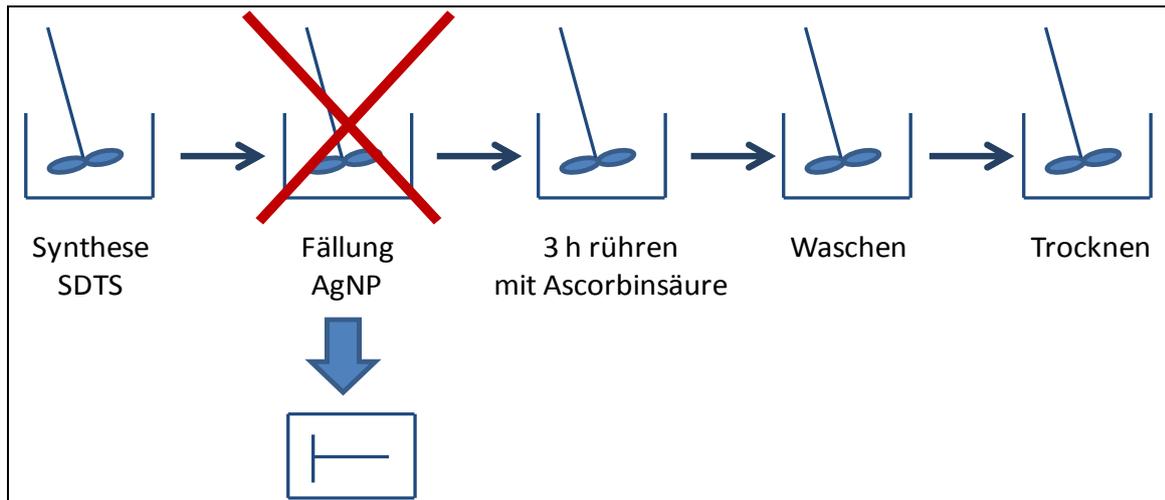


Abbildung 10: Verfahrensschritte bis zum Vorliegen der getrockneten AgNP, inklusive der Synthese des Liganden SDTS. Die Fällung wurde im Mikroreaktor durchgeführt, die übrigen Schritte als Batch-Prozesse durchgeführt.

Zunächst wurden Fällungsversuche bei unterschiedlichen Mischgüten bzw. Mischzeiten durchgeführt, welche stets inhomogene Ergebnisse zur Folge hatten. Daher wurde vermutet, dass der entscheidende Schritt zur Festlegung der Partikelgröße die lange Verweilzeit im Anschluss an die Fällung ist. Die Einstellung stets reproduzierbarer, konstanter Ausgangseigenschaften vor der langen Verweilzeit schien hier nicht erforderlich zu sein. Dies bedeutete, dass es sich hier um ein „Top down“-Prinzip handelte, bei dem die Nanopartikel bzw. Agglomerate „klein gekocht“ werden.

Die Partikeleigenschaften nach unterschiedlichen Zeiträumen im Verweilzeit-Schritt wurden zur Bestätigung des „Top down“-Prinzips untersucht. Für die Auswertung wurden nicht aufgereinigte Proben (nicht befreit von größeren Agglomeraten) herangezogen, da die Agglomerate hier ebenso von Interesse waren. Bei der Auswertung der DLS-Messungen kam die NNLS-Methode zur Bestimmung der Größenverteilungen der AgNP-Dispersionen zum Einsatz, da bei der Auswertung mit der Kumulanten Methode bei multimodalen Verteilungen nicht zwischen den unterschiedlichen Größenklassen differenziert werden konnte.

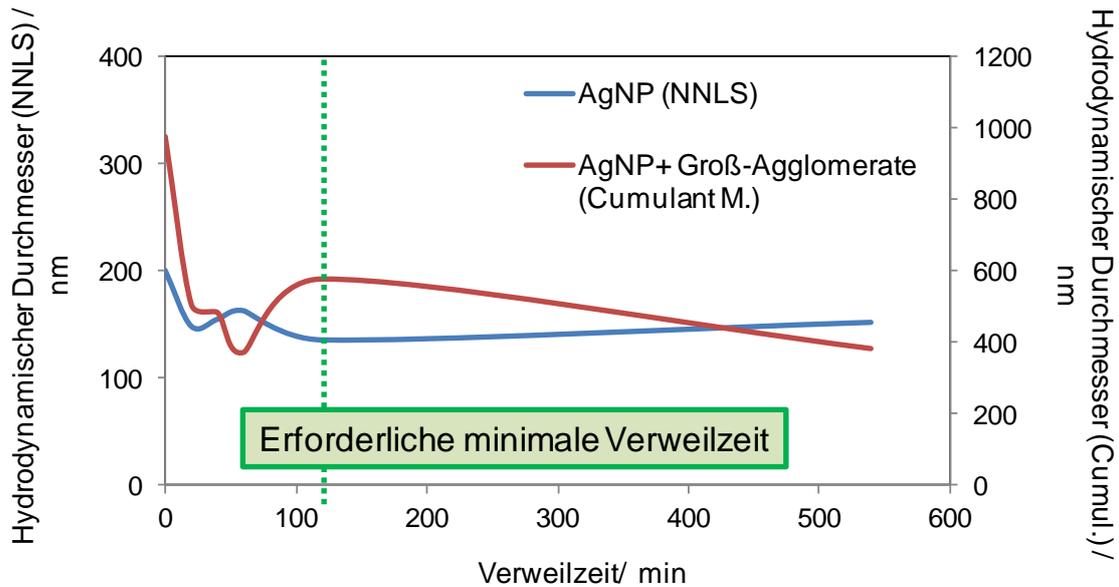


Abbildung 11: Veränderung des mittleren Partikeldurchmessers nach unterschiedlichen Verweilzeiten. Blau: AgNP-Durchmesser bestimmt mittels NNLS-Methode. Rot: Partikeldurchmesser über alle Größenverteilungen inklusive Mikro-Agglomerate (Cumulant Method). Grün: Mindest-Verweilzeit bis zum Erreichen des minimalen Durchmessers

In Abbildung 11 ist das „Top down“-Prinzip klar zu erkennen, mit zunehmender Verweilzeit verminderte sich die Partikelgröße bis sie schließlich konstant blieb (AgNP-NNLS). Daraus folgte eine benötigte minimale Verweilzeit von 120 min, welche allerdings für einen Einsatz des Mikroreaktors noch deutlich zu hoch ist. Im darauffolgenden Schritt folgte dann das Up-Scaling der AgNP-Synthese. Auch hatte es sich gezeigt, dass der Einsatz eines Mikroreaktors bei dieser Synthese auf die Qualität der gefällten Partikel keinen maßgeblichen Einfluss hat.

Das Up-Scaling der Liganden-Synthese von Natrium S-Dodecylthiosulfat (SDTS) um den Faktor 10 auf 1L Gesamtvolumen im diskontinuierlichen Prozess wurde erfolgreich im Kolben durchgeführt. Die mit dem in unterschiedlichen Maßstäben hergestellten SDTS synthetisierten AgNP besitzen in der DLS jeweils ähnliche mittlere Partikelgrößen und Standardabweichungen, d.h. ein Up-Scaling ist trotz der langen Verweilzeiten im Kolben durchführbar.

2.1.2 Arbeitspaket 1.2.2: Begleitanalytik zu den Arbeitspaketen 1.2.3 und 2.3.1 – 2.3.2

Ziel dieses Arbeitspaketes war die genaue Charakterisierung und quantitative Analytik aller untersuchten Silber-Nanopartikel über die gesamte Projektlaufzeit. Dabei standen folgende Aspekte im Mittelpunkt der analytischen Fragestellungen: (1) Charakterisierung der NP in den Testmedien bevor diese mit den biologischen Testsystemen in Kontakt kommen, (2) Charakterisierung der NP aus den verschiedenen Testmatrizes, nachdem die NP mit biologischen Systemen in Kontakt waren, (3) Entwicklung von geeigneten Methoden, um NP in komplexen Umweltmedien (z.B. Klärschlamm, Waschabwasser, Boden) nachweisen und charakterisieren zu können.

Der Projektpartner VdW koordinierte dieses Arbeitspaket. Dazu gehörten insbesondere die Zusammenführung und die Kommunikation der erzielten Ergebnisse an die anderen Projektpartner. Zusätzlich wurden Fragestellungen hinsichtlich der Analytik aus anderen Arbeitspaketen, besonders aus denen der Herstellung der Partikel und denen der toxikologischen/ökotoxikologischen Testung, gesammelt und bearbeitet. Des Weiteren wurde die Entwicklung, Betreuung und Durchführung der Charakterisierung und Quantifizierung von NP sowohl in biologischen Medien (vor der Testung) als auch von Proben aus der Mikroreaktorsynthese (siehe AP 1.1.1) vom Projektpartner übernommen. Als Methoden kamen dabei Atomabsorptionsspektroskopie (AAS), Dynamische Lichtstreuung (DLS) und die Messung des Zetapotentials zum Einsatz, mit denen gezielt die Parameter Agglomerationsgrad, Größe/Form und der Silbergehalt der NP bestimmt wurden. Der Projektpartner sorgte für eine enge Rückkopplung zum Arbeitspaket 1.1.1 zur kontinuierlichen Verbesserung und Qualitätssicherung der hergestellten Nanopartikel. Die Methoden Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und die Dichtegradientenzentrifugation (DCS) kamen nicht über den weiter oben beschriebenen Umfang zum Einsatz. Die DCS wurde zunächst für die Messung der Partikelgrößenverteilung der zu Beginn des Projektes verabredeten Standardpartikel benutzt, wobei sich aber zeigte, dass eine große systematische Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der DLS- und der DCS-Methode bestanden hat. Zudem wurde festgestellt, dass die Dauer der DCS-Messung der Partikelgrößenverteilung im unteren Nanometerbereich sehr lang wurde. Daher wurde unter Berücksichtigung der großen Anzahl von zu charakterisierenden Proben auf diese Methode verzichtet und sich auf die Dynamische Lichtstreuung mit der Unterstützung der UV/VIS-Spektroskopie beschränkt.

Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zetapotentialmessungen

Zu Beginn des Projektes wurde verabredet, dass zur Abstimmung der Charakterisierungsmethoden und der *standard operation procedures* (SOP) für die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers d_H (DLS) und des Zetapotentials ζ in einem ersten Schritt von der Arbeitsgruppe Parak (UM) synthetisierte und charakterisierte Goldnanopartikel in den drei Arbeitsgruppen UM, TUDr und VdW untersucht werden sollten. Dem sollten dann die als Standard verabredeten Silbernanopartikel folgen. Außerdem wurde die Methode der Sedimentationsanalyse benutzt zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers $d_{H,S}$ (Partner TUDr und IWT). Die ersten Ergebnisse dienten zur Festlegung der SOP für diese Methoden auf dem Projekttreffen im Februar 2011 in Marburg. Die verschiedenen Methoden zeigten unterschiedlich stark voneinander abweichende Ergebnisse. Zusätzlich dazu hatte die Auswahl der Auswertungsmethode der DLS-Messungen einen starken Einfluss auf die Ergebnisse. Die einfache und robuste Auswertung mit der Kumulanten-Methode (CUMU) wertet die Korrelationsfunktionen der DLS unter Annahme einer monomodalen Größenverteilung (mit Mittelwert, d.h. kumulativ, und Polydispersitätsindex PI) aus, wohingegen die *non-negative-least-square*- (NNLS)-Methode polymodale Größenverteilungen bei der Auswertung der Korrelationsfunktionen zulässt und dadurch weniger robust ist.

Zudem gab es große Abweichungen der Ergebnisse der Sedimentationsanalyse von denen der Dynamischen Lichtstreuung. Hier sei als Beispiel die Tabelle 2 mit den Ergebnissen für die verabredeten Goldnanopartikel des Partners UM aufgeführt.

Tabelle 2: Daten der Charakterisierung der Goldnanopartikel UM (TEM, DLS, Sedimentation, Zetapotential)

Methode / Partner	UM	TUDr	VdW
TEM <d>	4.6 nm	-	-
DLS <i>cumulants</i> $d_{H,CUMU}$	-	20 ± 1 nm	42 ± 9 nm
DLS <i>cumulants</i> PI	-	0.36	0.24 ± 0.12
DLS NNLS <i>intensity</i> $d_{H,I,max}$	≈ 22 nm	≈ 20 nm	≈ 16 nm
DLS NNLS <i>number</i> $d_{H,N}$	12 nm	-	12 ± 2 nm
Sedimentationsanalyse $d_{H,S}$	-	≈ 3 nm	3.1 ± 0.8 nm
ζ in H ₂ O	-34.5 mV	-	-118 ± 12 mV
ζ in 1mM NaCl	-	-	-45 ± 2 mV

Da die im Projekt vorhandenen Geräte zur Dynamischen Lichtstreuung nur bei einem Streuwinkel messen, wurden als ergänzendes Experiment die JRC-Standardpartikel NM300K in einem MALS Aufbau charakterisiert. Die intensitätsgewichteten Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Winkel waren bimodal bis trimodal.

Die winkelmittelten Ergebnisse dieses Experiments für die jeweils stärksten Moden der Verteilungen ergaben für den hydrodynamischen Durchmesser 72 ± 44 nm. Im Vergleich dazu ergab sich (siehe auch weiter unten) mit der später etablierten DLS-SOP der Standardpartikel NM300K ein hydrodynamischer Durchmesser von 43 ± 10 nm in Wasser (10 mg Ag/L, NNLS-Algorithmus).

Um einen Entwurf für eine DLS-SOP auszuarbeiten, wurden drei Standardpartikeldispersio-nen ausgewählt (NanoXact 10 nm, Nanosphere 40 nm, Nanosphere 100 nm) und von den Partnern VdW, TUDr, UM und IME charakterisiert. Als Hintergrundelektrolyt wurde 10 mM NaCl gewählt nach der Empfehlung des NIST (Hackley et al. 2010, NIST-NCL PCC 1). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefasst, wobei der Standard NanoXact nicht über den Zeitraum der Experimente stabil war und aus diesem Grund nicht berücksichtigt wurde.

Die Ergebnisse für die hydrodynamischen Durchmesser lagen alle leicht über den Werten der Herstellerangabe der Durchmesser. Sämtliche gemessenen Durchmesser der jeweiligen Proben zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Projektpartnern. Das gleiche galt für die Werte des Polydispersitätsindex. Mit diesen Ergebnissen konnte die im 2. Zwischenbericht dargestellte DLS-SOP als etabliert betrachtet werden. Die DLS-SOP ist im Anhang aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammenfassung der DLS-Ergebnisse zu den Standardpartikeln von drei unabhängigen Messreihen der Projektpartner (Hintergrundelektrolyt 10 mM NaCl). Aufgeführt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Kumulantenbewertung, d.h. der *z-average* des hydrodyn. Durchmessers d und die Polydispersität PI.

Standard		VdW	TUDr	UM	IME
Nanosphere 40 nm P1	d [nm]	40.9 ± 1.5	43.4 ± 2.9	41.1 ± 0.7	43.6 ± 2.5
	PI	0.13 ± 0.04	0.13 ± 0.04	0.07 ± 0.03	0.15 ± 0.06
Nanosphere 40 nm P2	d [nm]	44.8 ± 5.1	46.9 ± 4.7	41.8 ± 1.2	44.6 ± 2.0
	PI	0.17 ± 0.09	0.15 ± 0.07	0.08 ± 0.04	0.17 ± 0.04
Nanosphere 100 nm	d [nm]	112.4 ± 7.6	108.5 ± 3.9	104.9 ± 1.1	108.8 ± 3.7
	PI	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.06	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.03

Aufbauend auf der SOP für die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mit der Dynamischen Lichtstreuung und den Vorschlägen des NCL (Clogston et al. 2009, NCL Method PCC-2) wurde vom Partner VdW die SOP für die Messung des Zetapotentials formuliert. Zur Überprüfung der SOP wurde eine Standardpartikeldispersion (PS-Latex in 10 mM Hintergrundelektrolyt gepuffert bei pH 9.1) von den Partner TUDr, UM und BGR analysiert (Tabelle 4). Die Werte liegen alle bei ungefähr -50 mV ohne signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Partner. Die somit etablierte Zetapotential-SOP ist im Anhang aufgeführt.

Tabelle 4: Ergebnisse des Ringversuchs zur Messung des Zetapotentials.

Partner	Methode	Probe (Nominal Konz.)	Zetapotential [mV]	pH
VdW	ELS	PS-Latex (50 µg/L)	-50.5 ± 3.2	9.1
TUDr	LSM	PS-Latex (50 ng/L)	-51.2 ± 6.7	9.1
BGR	ELS	PS-Latex (50 µg/L)	-50.1 ± 1.3	8.8
UM	ELS	PS-Latex (50 µg/L)	-49.4 ± 6.6	8.5

Numerische Speziierung der biologischen Testmedien

Zur Vorbereitung der Charakterisierung der Silbernanopartikel in den biologischen Testmedien wurden den Arbeiten von Liu et al. (2010) und Jin et al. (2010) folgend numerische Berechnungen der chemischen Gleichgewichtslage und der Konzentrationen der unterschiedlichen Silberspezies in den Medien mit der Software PHREEQCi [v. 2.18, USGS] durchgeführt. Zunächst wurde die Speziierung der Testmedien mit PHREEQCi ohne Silber berechnet. Erste Berechnungen konnten einige organische Bestandteile der Testmedien noch nicht berücksichtigen. Die wichtigsten redoxwirksamen Komponenten wie Glucose, Acetat und Ascorbinsäure wurden in einem späteren Schritt in die verwendete Datenbank minteqv4.dat der PHREEQCi eingearbeitet. Die im Gesamtverbund verwendeten Testmedien sind in der Tabelle 5 zusammen mit ihren wichtigsten Komponenten und der berechneten Ionenstärke aufgeführt. Die gewonnenen Daten für die Ionenstärken erlaubten der DLVO-Theorie folgend die kolloidale Stabilität von Nanopartikeln in den Medien abzuschätzen (Filser et al. 2013a). Zusätzlich dazu erlaubte die numerische Berechnung der Testmedien auch die Abschätzung der chemischen Stabilität von Silbernanopartikeln gegen Auflösung durch Oxidation und die Abschätzung der gelösten Silberionenkonzentrationen im Gleichgewicht und deren unterschiedlichen Spezies (z. B. lösliche höhere Silberchloridkomplexe). Zudem konnte mit dieser Methode abgeschätzt werden, ob in einem Medium zuvor in Stammlösungen gelöste Silberionen mit Medienkomponenten im Test ausfallen (z.B schwerlösliches Silberchlorid; Abb. 12; s.a. Filser & Köser 2013).

Tabelle 5: Auflistung der Testmedien mit ihren Hauptkomponenten und Ionenstärken. Die Berechnung erfolgte mit PHREEQCi (v2.18). Nicht berücksichtigt wurden (da sie nicht in der Datenbank enthalten waren): Aminosäuren, Proteine, Harnstoff, Saccharose und Vitamine. Komponenten, die potentiell oxidierend wirken, sind rot eingefärbt, potentiell reduzierend wirkende Komponenten grün.

Test	Hauptkomponenten	Ionenstärke [mM]
<i>Anabaena flosaquae</i> (Cyanobakterium)	NaNO ₃ , NaHCO ₃ , MgCl ₂ , MgSO ₄	1.0
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Grünalge)	NaHCO ₃ , NH ₄ Cl, CaCl ₂ , MgSO ₄	1.7
<i>Pseudokirchneriella S. UBA mod.</i>	NaHCO ₃ , NH ₄ Cl, CaCl ₂ , MgSO ₄	4.6
<i>Myriophyllum s.</i> (Tausendblatt)	Saccharose, KNO ₃ , Ca(NO ₃) ₂ , MgSO ₄	5.0
<i>Elendt M7</i> (Daphnien)	CaCl ₂ , NaHCO ₃ , MgSO ₄ , NaNO ₃	8.3
<i>Danio rerio</i> (Fischembryo)	CaCl ₂ , NaHCO ₃ , MgSO ₄ , KCl	8.4
<i>Elendt M4 chronisch</i> (Daphnien)	CaCl ₂ , NaHCO ₃ , MgSO ₄ , NaNO ₃	8.6
<i>Lemna minor</i> (kl. Wasserlinse)	KNO ₃ , Kaliumphosphat-Puffer, Ca(NO ₃) ₂	9.3
<i>Arthrobacter globiformis</i> (Bodenbakterium)	NaCl, Glucose, Proteine	11.4
<i>Scenedesmus vacuolatus</i> (Grünalge)	NaCl, KNO ₃ , Natriumphosphat-Puffer	25.4
Enzyminhibition von Acetylcholinesterase AchE	Natriumphosphat-Puffer, NaHCO ₃	52.3
Klärschlammmedium	Proteine, Harnstoff, Kaliumphosphat-Puffer, NaCl	71.1
RPMI Zellkulturmedium (IPC-81 Zellen)	NaCl, Natriumphosphat-Puffer, NaHCO ₃ , Glucose, KCl, Aminosäuren, Proteine	144.4
Enzyminhibition von Glutathionreduktase GR	Kaliumphosphat-Puffer	205.9
Belebtschlamm	Natriumacetat, Kalium-Natriumphosphat-Puffer, NaNO ₃ , Ascorbinsäure	207.8
<i>Vibrio fischeri</i> (marines Bakterium)	NaCl, Kalium-Natriumphosphat-Puffer	385.9

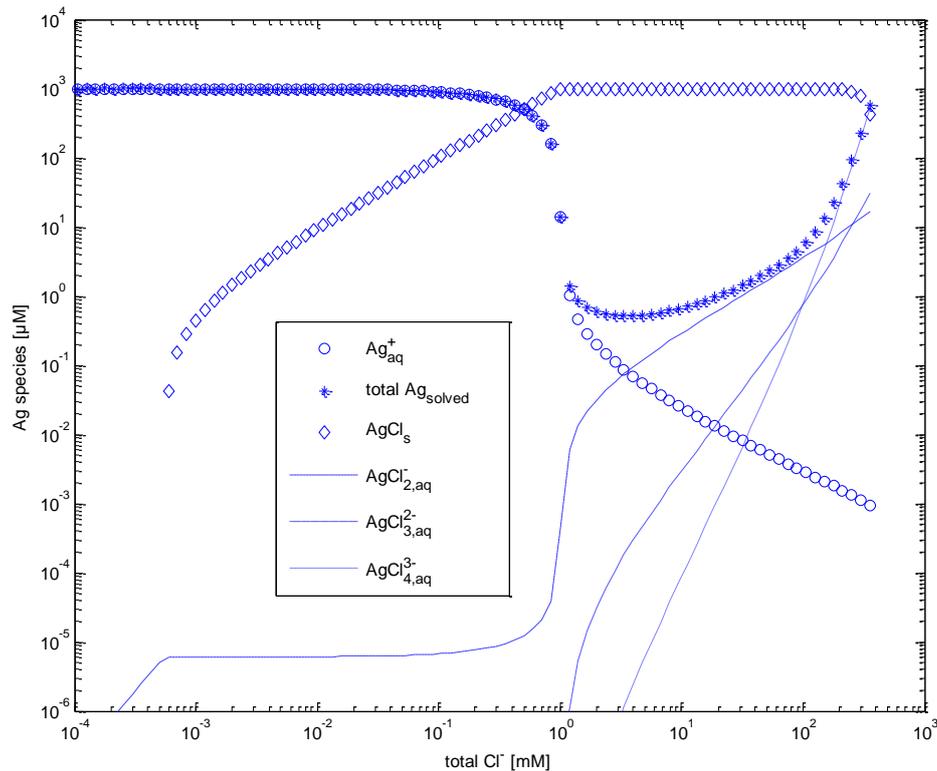


Abbildung 12: Numerische Spezierung einer 1 mM Silbernitratlösung als Funktion der Chlorid-Konzentration.

Ähnlich wie bei Liu et al. (2010) wurden die Silberspezies numerisch berechnet für eine 1 mM Silberlösung mit unterschiedlichen Chlorid-Konzentrationen (dargestellt in Abbildung 12). Für die meisten Testmedien im Projekt liegen die Chlorid-Konzentrationen in dem Bereich, wo ein Großteil des Silbers im Gleichgewicht ausfällt als Silberchlorid. Erst bei größeren Chlorid-Konzentrationen ab 0,3 mol/L liegt der Großteil des Silbers im Gleichgewicht als gelöste höhere Silberchlorid-Komplexe vor. Erst die Auftragung mit der Variation der Silbernitrat-Konzentration bei sonst gleichbleibender Medienzusammensetzung machte klar, wie stark das Löslichkeitsgleichgewicht Einfluss haben konnte auf die wirksame Dosis in den toxikologischen Untersuchungen. Bei der Bestimmung der EC_{50} -Werte wird im Allgemeinen die Konzentration des zu testenden Stoffes variiert und dann die Wirkung auf die Testorganismen bestimmt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Einwaage des Stoffes in die Testlösung der Konzentration entspricht. Fällt aber, wie für Silbernitrat gezeigt in Abbildung 12, ein Großteil der wirksamen Substanz (hier gelöste Ag^+) aus und ist den Testorganismen nicht mehr zugänglich, ist die etablierte Methodik der EC_{50} -Werte Bestimmung auf Basis der Nominalkonzentrationen in Frage gestellt.

Aufbauend auf diese Feststellungen wurde für unterschiedliche Zugaben von metallischem Silber (als Modell für Silbernanopartikel) zu den Testmedien die Spezierung numerisch abgeschätzt. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse für metallisches Silber im Testmedium für die Grünalgen *Scenedesmus vacuolatus* dargestellt. Die Berechnungen ergaben, dass für Silberzugaben unterhalb von 3 mM (ca. 300 mg/L) das Silber chemisch nicht stabil ist und im Gleichgewicht vollständig oxidiert vorliegt. Zudem liegt im Gleichgewicht ein Großteil des oxidierten Silbers als schwerlösliches Silberchlorid vor (bis ca. 2 μM herunter). Als wichtigste Reaktionspartner dienen im Medium im Wesentlichen das vorhandene Nitrat (8 mM) und das Chlorid (8,2 mM). Nur in Konzentrationen oberhalb von 3 mM ist das metallische Silber im Medium auf das Gleichgewicht bezogen chemisch stabil. Wie schnell die Oxidationsreaktion für die Auflösung des metallischen Silbers und wieviel gelöstes Silber neben den zu testenden Silbernanopartikeln in den Testmedien vorliegt, war eine wichtige Fragestellung für die Bewertung der Ergebnisse der toxikologischen Tests.

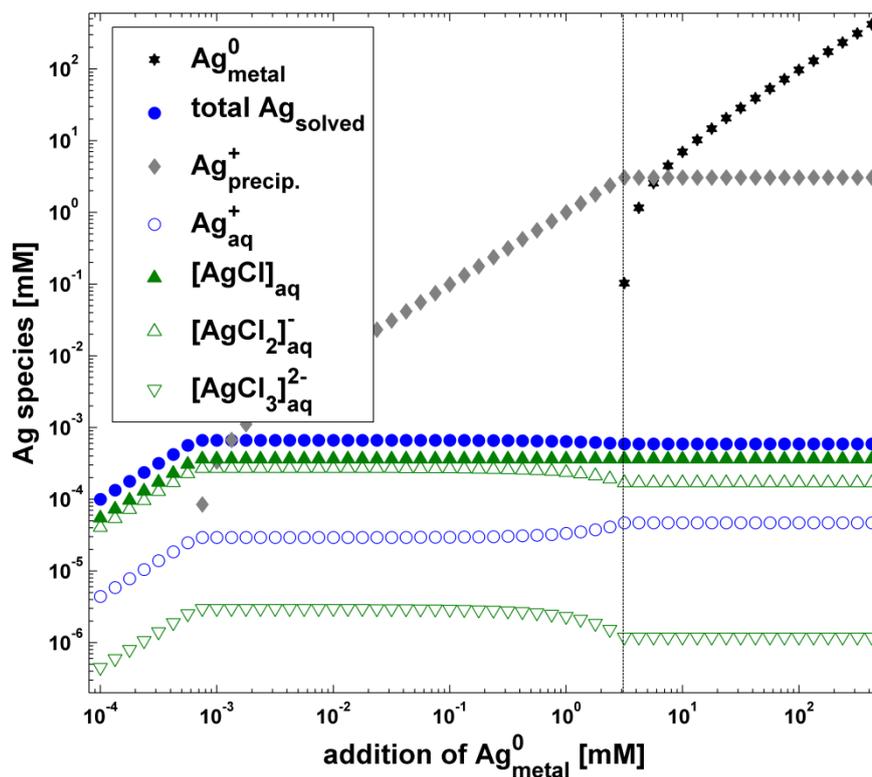


Abbildung 13: Numerische Spezierung von unterschiedlichen Zugaben von metallischem Silber (aufgetragen auf der x-Achse) zu dem Testmedium für *Scenedesmus vacuolatus*. Auf der y-Achse sind die Konzentrationen der unterschiedlichen Silberspezies.

Die in Abbildung 13 dargestellten Konzentrationen der Silberspezies entsprechen unterhalb von 0,5 mM (ca. 50 mg/L) sehr gut den Ergebnissen für Zugaben von Silbernitrat zu diesem Testmedium. Anhand dieses Teils der Abbildung kann das Gleichgewichtsverhalten von Silbernitrat in diesem Testmedium diskutiert werden. Unterhalb von 1 μ M (ca. 100 μ g/L) entspricht die abgeschätzte gelöste Silber-Konzentration den Einwaagen. Oberhalb der Zugabe von 1 μ M Silbernitrat ist das Löslichkeitsprodukt von Silberchlorid erreicht und weitere Zugaben von Silbernitrat können die gelöste Silber-Konzentration nicht erhöhen. Dies Verhalten der Plateaubildung konnte ähnlich bei vielen anderen Chlorid enthaltenden Medien bei der numerischen Spezierung beobachtet werden, wobei die Lage des Plateaus von der Chloridkonzentration abhing. In anderen Testmedien sind Komponenten vorhanden, die Silberionen reduzieren könnten. Die numerische Berechnung der Zugabe von Silbernitrat zum *Arthrobacter*-Medium nach dem gleichen Schema wie in Abbildung 13 zeigte den Einfluss von Glucose auf die chemische Stabilität von gelösten Silberionen.

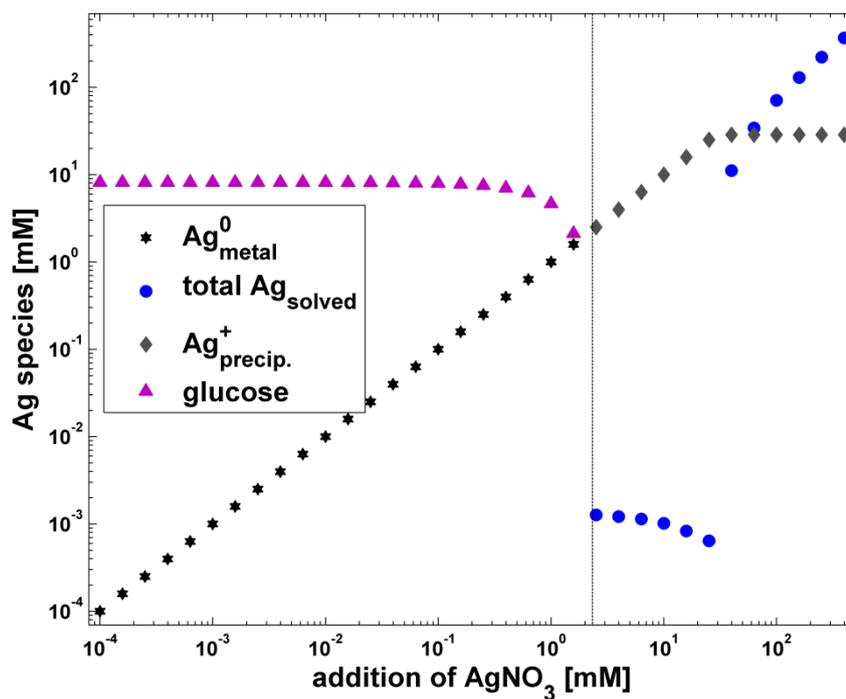


Abbildung 14: Numerische Spezierung von unterschiedlichen Zugaben von Silbernitrat (aufgetragen auf der x-Achse) zu dem Testmedium für *Arthrobacter globiformis*. Auf der y-Achse sind die Konzentrationen der unterschiedlichen Silberspezies.

In Abbildung 14 werden die Gleichgewichtsspezies für zunehmende Silbernitratzugaben zum *Arthrobacter*-Medium dargestellt. Für die Zugabe von Silbernitrat unterhalb von ca. 2 mM (dargestellt als senkrechte Linie) ist die Glucose bestimmend für das Redoxpotential des

Systems. Die Silberionen und Nitrationen werden von der Glucose nahezu vollständig zu Ammoniumionen (NH_4^+) und zu metallischem Silber Ag^0 reduziert. Ab ca. 2 mM AgNO_3 -Zugabe ist das Nitrat des Silbernitrat bestimmend. Die Glucose wird nahezu vollständig zu Gluconat oxidiert und das Silber liegt anfänglich fast vollständig als gefälltes Silberchlorid (AgCl_s) vor. Für höhere Silbernitratzugaben ab ca. 30 mM nimmt die Konzentration von gefälltem Silberchlorid nicht mehr zu (Abknicken der Datenpunkte $\text{Ag}^+_{\text{precip.}}$), weil das Chlorid fast komplett aus dem Medium gefällt wird, und es liegen zunehmend höhere Konzentrationen der gelösten Silberspezies vor, dies vor allem als Ag^+_{aq} .

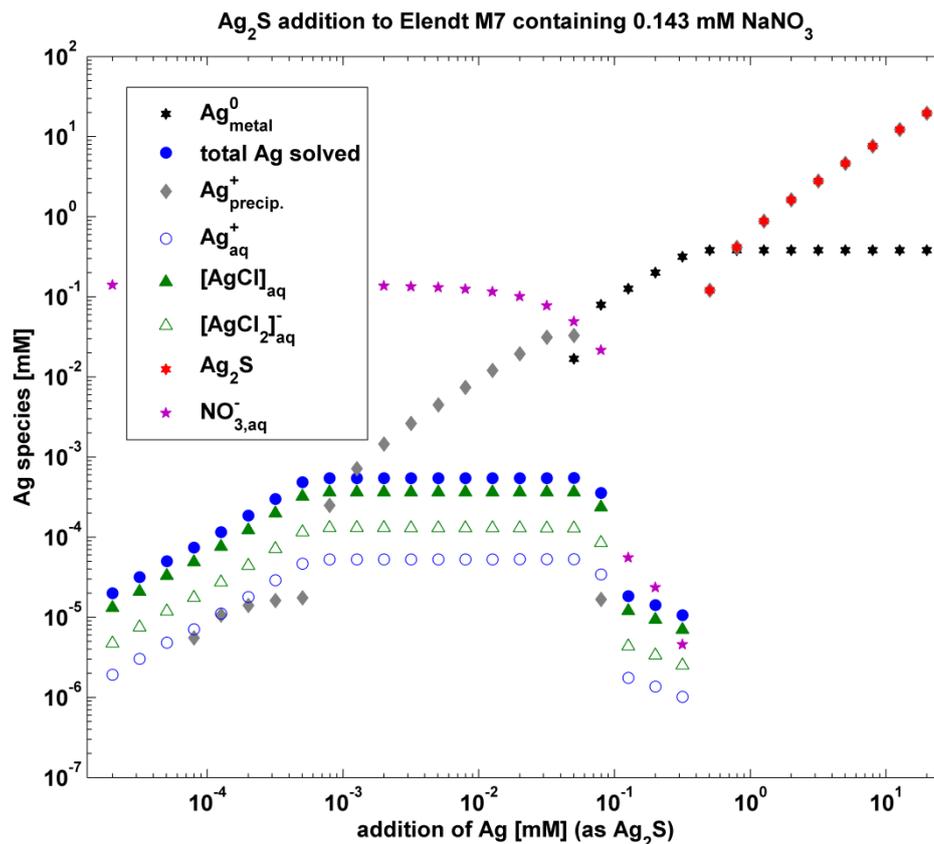


Abbildung 15: Silber-Gleichgewichtsspezies bei Zugabe von Silbersulfid zu Elendt M7 Medium, das 0.143 mM Natriumnitrat enthält.

Den Überlegungen von Hund-Rinke et al. (2008) und Kim et al. (2010) folgend ist anzunehmen, dass unter den stark anoxischen Bedingungen im Klärschlamm aus aus Silbernanopartikeln freigesetzten Silberionen schwerlösliches Silbersulfid entsteht. Nach Ausbringung von Klärschlamm, der Silbersulfid enthält, auf Felder können wieder oxische Bedingungen vorliegen; zudem wird über Düngung häufig Nitrat zugesetzt. Bei Niederschlägen kann beides über Erosion oder Seitenabfluss wieder in Gewässer ausgetragen werden. Daher wurde auch das chemische Gleichgewicht von Silbersulfid in Algen- und Daphnien-Medium für unterschiedliche Dosen von Silbersulfid mit PHREEQCi numerisch abgeschätzt. Hier sei als

Beispiel die Abschätzung für das Daphnien-Medium Elendt M7 mit einer zusätzlichen Natriumnitrat-Konzentration von 0,14 mM (entspricht 2 mg Stickstoff /L) aufgeführt (siehe Abbildung 15). Unterhalb einer Silberzugabe von 0,4 mM (ca. 50 mg/L, als Silbersulfid) neigt das Silbersulfid dazu sich aufzulösen, da Sulfidionen langsam durch das Nitrat zu Sulfat oxidiert werden. Bei größeren Zugaben von Silbersulfid (oberhalb von 0,4 mM) bestimmt das Sulfid das Redoxverhalten der Mischung und das enthaltende Silber liegt hauptsächlich als Silbersulfid vor. Dies bedeutet, dass schon bei geringen Einträgen von Silbersulfid toxisch wirksame Silberionen freigesetzt werden können. Bei hohen Ag_2S Konzentrationen darf allerdings eine Depot-Wirkung nicht vernachlässigt werden.

Alle diese Berechnungen zeigten, dass die numerische Spezierung von Silber in den Testmedien ein überaus wichtiges Werkzeug ist für die Abschätzung des Verhaltens von Silbernanopartikeln in den Tests und in Umweltmedien.

Silbergehaltsbestimmung mit Atom-Absorptions-Spektroskopie

Erste Experimente für die Bestimmung des Silbergehaltes mittels GF-AAS in den Proben für die biologischen Tests ergaben zufriedenstellende Wiederfindungsraten mit der bisher benutzten AAS-Methode, die zur Veraschung Salpetersäure und Wasserstoffperoxid und zur Verdünnung 1% Salpetersäure verwendete. Die Standardadditionsmethode wurde vorgeschlagen, um Störungen durch Matrixeffekte durch die Komponenten der Testmedien zu vermeiden. Diese ersten Experimente wurden mit Phosphatpuffer (verwendet im Test der Acetylcholinesterase-Inhibition) und mit dem Medium für den Test mit *Arthrobacter*, das als Elektrolyt nur Kochsalz enthält, durchgeführt.

Für das Zellkulturmedium RPMI, das für Zytotoxizitätstest verwendet wurde, ergaben sich mit der bisher benutzten Methode sogar für das als Referenz verwendete Silbernitrat in höheren Konzentrationen sehr schlechte Wiederfindungsraten von nur knapp über 50% in Bezug auf die Kalibrierung mit Silbernitrat in 1% HNO_3 (siehe Tabelle 6 bei HNO_3 / H_2O_2). Es war zu vermuten, dass sich schwerlösliches Silberchlorid in den AAS-Probengefäßen gebildet hatte. Somit ging bei der Verdünnung der Proben (für deren Messung im gültigen Bereich der Kalibrierung) Silbergehalt verloren und es ergaben sich zu niedrige Wiederfindungsraten.

Die Berechnungen der Gleichgewichtskonzentrationen der unterschiedlichen Silberspezies in Mischungen von Silbernitrat und den Testmedien nach dem Vorbild von Liu et al. (2010) legten nahe, dass bei der Verwendung von höheren Chloridkonzentrationen die Fällung von schwerlöslichem Silberchlorid in den AAS-Experimenten vermieden werden konnte (siehe

auch Abbildung 12). Bei höheren Chloridkonzentrationen werden zunehmend lösliche höhere Silberchloridkomplexe ($[\text{AgCl}]_{\text{aq}}$, $[\text{AgCl}_2]^-_{\text{aq}}$, $[\text{AgCl}_3]^{2-}_{\text{aq}}$, $[\text{AgCl}_4]^{3-}_{\text{aq}}$) gebildet.

Tabelle 6: GF-AAS-Wiederfindungsraten von Silber in einem ersten Experiment: Vergleich von Silbernitrat in 1% HNO_3 und in Zellkulturmedium RPMI mit unterschiedlichen Veraschungs- und Verdünnungsmethoden.

Probe / Medium	Veraschung	Verdünnung	Konzentrationsbereich [mg/L]	Verdünnungsfaktor	Wiederfindung [%]
$\text{AgNO}_3 / \text{HNO}_3$ 1 %	$\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$	HNO_3 1%	0.1	10	100 ± 6
			10	1000	64 ± 3
	$\text{HCl} / \text{HNO}_3$	verd. Kw.	0.1	10	94 ± 3
			20	1000	94 ± 5
$\text{AgNO}_3 / \text{RPMI}$	$\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$	HNO_3 1%	0.1	10	87 ± 5
			8	1000	53 ± 2
	$\text{HCl} / \text{HNO}_3$	verd. Kw.	0.1	10	98 ± 2
			10	1000	80 ± 2
$\text{HNO}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$	verd. Kw.	8	1000	70 ± 3	

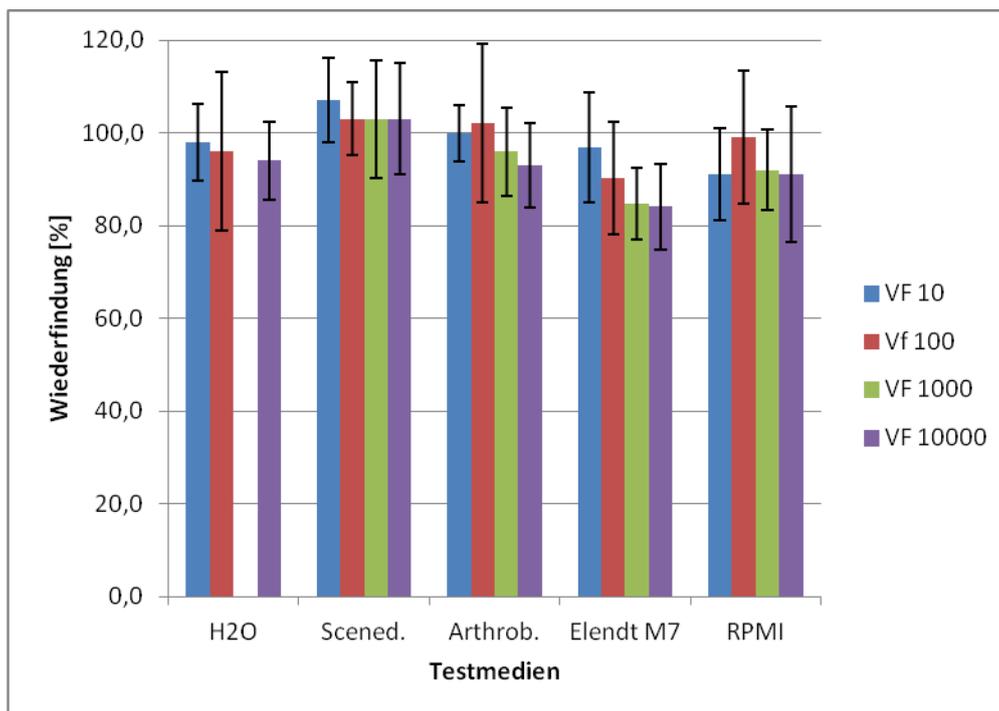


Abbildung 16: Wiederfindung von Silbernitrat in biologischen Testmedien bei der AAS Analyse und der Proben- vorbereitung mit Königswasser (Anwendung der AAS-SOP). Die untersuchten Konzentrationen (VF 10 = 0.05 – 0.20 mg Ag/L, VF 10000 = 50 – 200 mg Ag/L) reichten über 4 Größenordnungen, basierend auf $n \geq 2$ unabhängigen Messungen.

Daher wurde eine Veraschungsmethode mit Königswasser angewendet, wobei der Volumenanteil der konzentrierten Salzsäure erhöht wurde (4/1, v/v, konz. HCl / konz. HNO₃). Für die Verdünnungsschritte bei höheren Silberkonzentrationen außerhalb der Kalibrierung wurde eine verdünnte Königswasser-Lösung mit dem gleichen Molverhältnis verwendet (10% HNO₃ / 5.3 M HCl). Die Wiederfindungsraten erhöhten sich mit dieser Methode für die höheren Silbergehalte drastisch. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde eine AAS-SOP entworfen und mit Silberkonzentrationen von 50 µg/L bis 200 mg/L in vier Größenordnungen überprüft. Die Wiederfindungsraten erhöhten sich mit dieser Methode für die höheren Silbergehalte auf ca. 95-100% für die meisten der bisher getesteten Medien (Abbildung 16), lediglich für AgNO₃ im Daphnien-Medium ElenDt M7 gab es eine leicht Abnahme der Wiederfindung mit zunehmender Silberkonzentration. Die hier entwickelte Methode ist als SOP zusammengefasst und diente als Grundlage für alle späteren AAS-Messungen im UMSICHT-Projekt (siehe Anhang). Im Laufe der ersten AAS-Experimente traten einige Probleme mit Gefäßkontaminationen auf. Daraufhin wurde mit dem Partner BGR eine SOP für die Gefäßreinigung formuliert. Sie ist ebenfalls im Anhang aufgeführt.

Charakterisierung der Nanopartikel NM300K in den Testmedien

Mit der Etablierung der SOPs für die Dynamische Lichtstreuung (DLS) und die Messung des Zetapotentials wurde begonnen, die JRC-Standardpartikel NM300K in Wasser und in den verwendeten Testmedien zu charakterisieren. Die Charakterisierung mit den beiden genannten Methoden wurde beim VdW mit einem DelsaNanoC der Firma Beckman-Coulter durchgeführt.

Bei den ersten Messungen ergaben sich für Proben mit Partikelkonzentrationen unterhalb von 1 mg Ag/L größere Fluktuationen in der Autokorrelationsfunktion (ACF). Die somit stärker verrauschte ACF ergab dann bei der Auswertung mit der Kumulanten-Methode und dem NNLS-Algorithmus eine stärkere Streuung der Ergebnisse innerhalb der 10 Wiederholungen (siehe DLS-SOP). Eine Verlängerung der Messzeiten würde dem entgegensteuern, allerdings würde sich dadurch auch die zeitliche Veränderung bei zu Agglomeration neigenden Proben stärker auswirken. Daher wurde entschieden, keine Proben mit kleineren Konzentrationen als 1 mg Ag/L mit dem vorhandenen DelsaNanoC zu untersuchen. Als Richtwert für die Untersuchungen zum Verhalten der Silbernanopartikel NM300K in den Medien sollte als Konzentration 10 mg Ag/L verwendet werden. Bei der Auswertung der DLS-Messungen wurden die Kumulanten-Ergebnisse genauso wie die Ergebnisse des NNLS-Algorithmus für die hydrodynamischen Durchmesser notiert. Spätere DLS-Messungen und deren Vergleich mit UV/VIS-Spektren der Proben ergaben, dass sich die kolloidale Stabilität der Proben besser

mit den Ergebnissen des NNLS-Algorithmus beschreiben lässt. Daher wurde auf die Auftragung der Kumulanten-Ergebnisse verzichtet. Lediglich bei der Charakterisierung der TiO₂-basierten Partikel sind beide Methoden gleich gut verwendbar. Die Ergebnisse für die hydrodynamischen Durchmesser der NM300K Partikel mit den beim VdW verwendeten Testmedien einschließlich Wasser sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Konzentrationen lagen bei ca. 10 mg Ag/L.

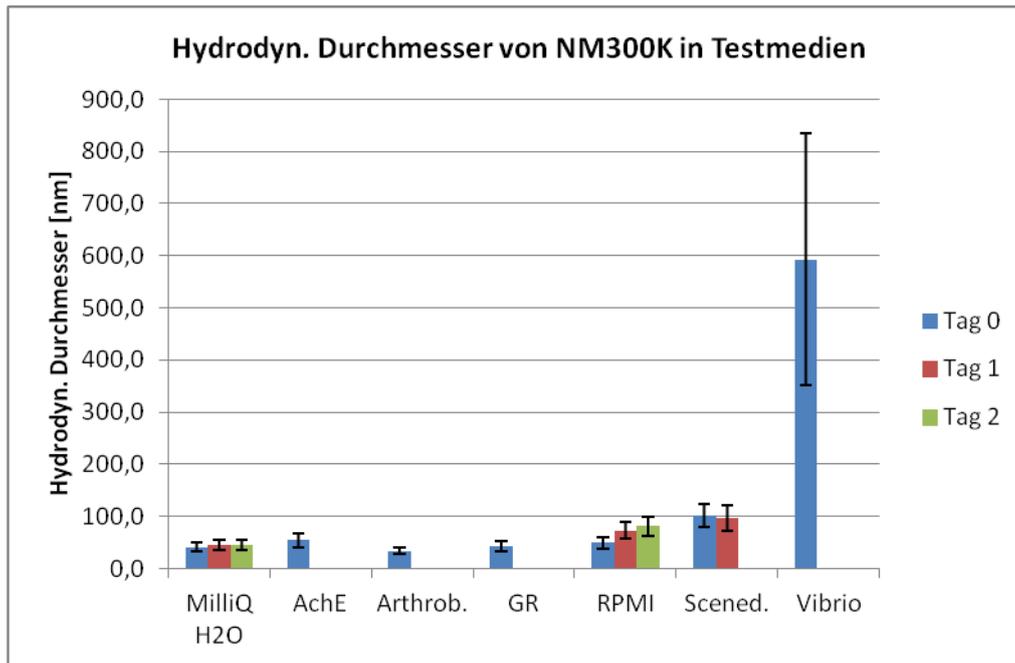


Abbildung 17: Ergebnisse der DLS-Messungen für die hydrodynamischen Durchmesser (NNLS-Algorithmus) der Silbernanopartikel NM300K in den jeweiligen Testmedien. Die Daten sind für die jeweiligen Messtage gemittelt.

Die Charakterisierung wurde an jedem Messtag während der Testlaufzeit durchgeführt. Bei längeren Testlaufzeiten als drei Tagen wurde die Charakterisierung an drei Zeitpunkten durchgeführt. In den Medien Wasser und *Arthrobacter*-Medium sowie in den Medien für die Enzyminhibitionstests lagen die hydrodynamischen Durchmesser zwischen 34 nm und 54 nm, und es war keine Agglomeration während des Testzeitraums feststellbar. Für das Zellkulturmedium RPMI und das Medium für *Scenedesmus vacuolatus* war leichte Agglomeration über die Testlaufzeit festzustellen. Im Medium für das marine Bakterium *Vibrio fischeri* war die Agglomeration sehr stark zu sehen. Dies Medium hat die höchste Ionenstärke unter den untersuchten Medien. Die Ergebnisse für die Zetapotential-Messungen in den Testmedien sind in Abbildung 18 gezeigt. Bei den dargestellten Messreihen ist die Zahl der unabhängigen Messungen $n = 3$. Nur für die Medien für AchE und *Scenedesmus* ist die Zahl der unabhängigen Messungen $n = 2$.

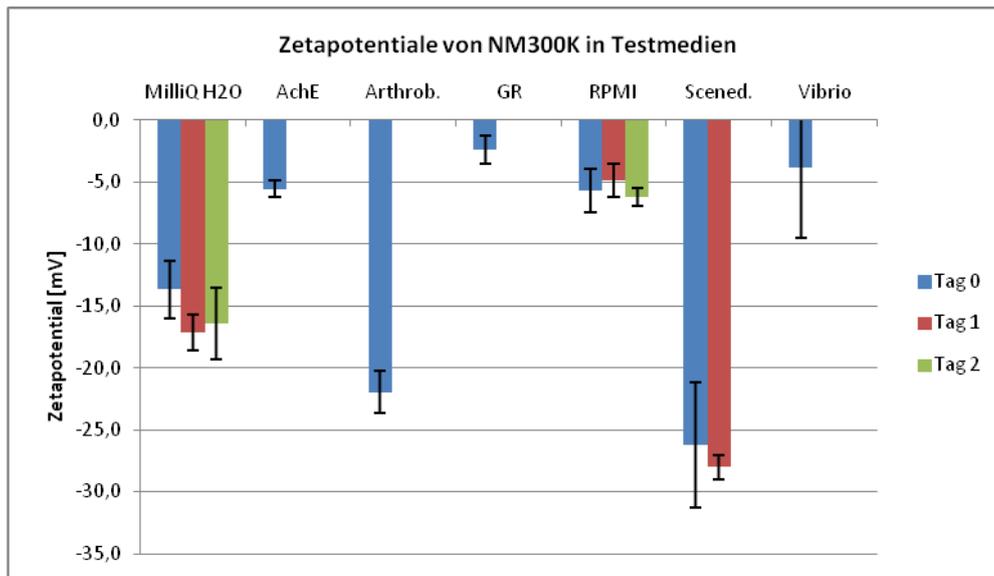


Abbildung 18: Ergebnisse der Zetapotential-Messungen der Silbernanopartikel NM300K in den jeweiligen Testmedien. Die Daten sind für die Messtage jeweils gemittelt.

Für die Testmedien Wasser, *Arthrobacter*, GR und RPMI wurden die UV/VIS-Spektren aufgenommen. Die Kurven für den jeweiligen letzten Messtag sind in Abbildung 19 dargestellt. Die Plasmonbande der Silbernanopartikel NM300K bei ca. 410 nm ist deutlich ausgeprägt. Im Zellkulturmedium RPMI zeigt sich die Ausbildung einer Schulter bei größeren Wellenlängen (bei ca. 550 nm), welche auf die Agglomeration von den Silbernanopartikeln zurückzuführen ist.

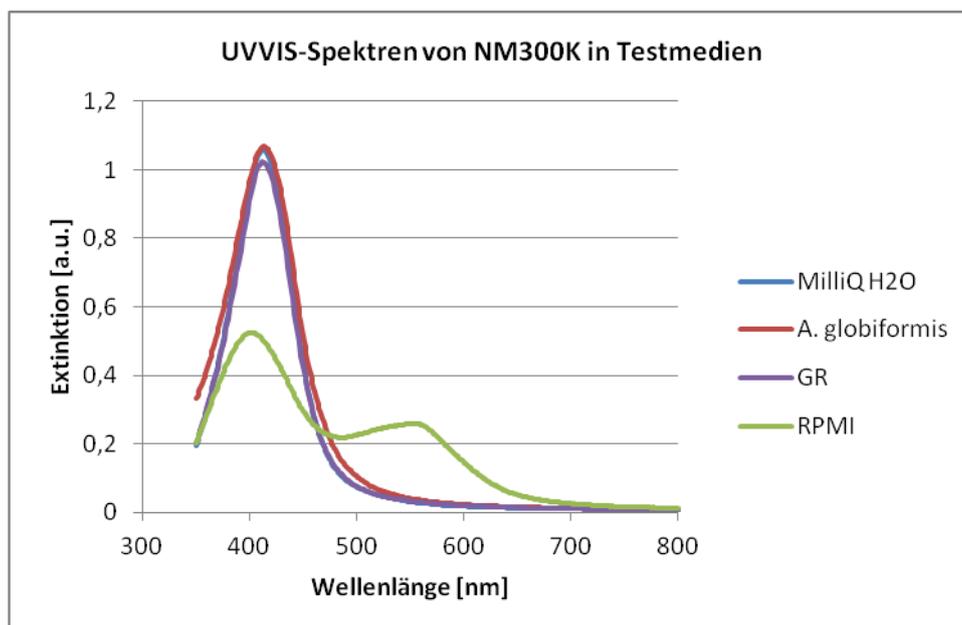


Abbildung 19: Ergebnisse der Messungen der UV/VIS-Spektren der Silbernanopartikel NM300K in den jeweiligen Testmedien am letzten Messtag. Die Daten sind für den Messtag jeweils gemittelt.

Für den Partner UBA wurde im Auftrag die Charakterisierung der Silbernanopartikel NM300K in einer weiteren Zahl von Testmedien durchgeführt, wobei die Konzentration auf 10 mg Ag/L eingestellt wurde. Die Ergebnisse für die hydrodynamischen Durchmesser (Abbildung 20), die gemessenen Zetapotentiale (Abbildung 21) und die UV/VIS-Spektren (Abbildung 22) sind im Folgenden aufgeführt.

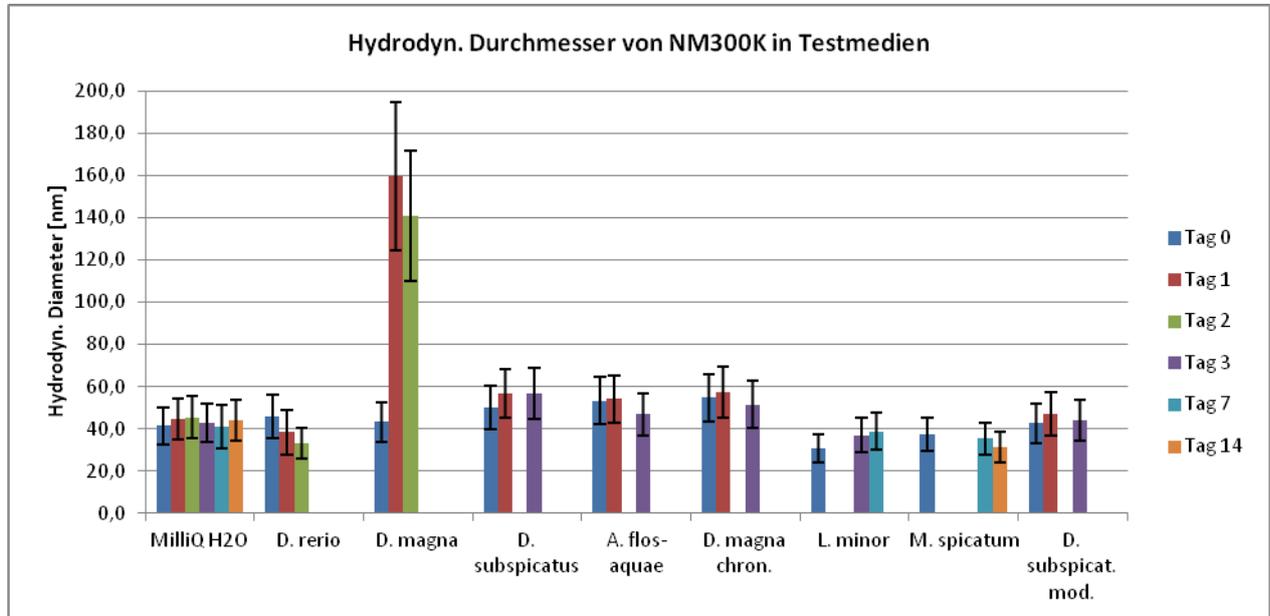


Abbildung 20: Ergebnisse der DLS-Messungen für die hydrodynamischen Durchmesser (NNLS-Algorithmus) der Silbernanopartikel NM300K in den jeweiligen Testmedien. Die Daten sind für die jeweiligen Messtage gemittelt.

Zusammenfassend wurde die kolloidale Stabilität der Silbernanopartikel NM300K in einer Vielzahl von Testmedien einschließlich MilliQ-Wasser bei einer Silberkonzentration von 10 mg Ag L⁻¹ untersucht. Die hydrodynamischen Durchmesser, die mit der NNLS-Methode bestimmt wurden, eignen sich gut, um das kolloidale Verhalten der Silber-Nanopartikel zu beschreiben. Dies ergaben die Vergleichsmessungen der Proben mit der UV/VIS-Spektroskopie. Die Partikel waren über die Testdauern in den meisten Medien kolloidal stabil, wobei die hydrodynamischen Durchmesser im Bereich zwischen 30 nm und 50 nm lagen. Das Zetapotential der NM300K-Silbernanopartikel scheint keinen bestimmenden Einfluss auf die kolloidale Stabilität der Partikel in den Medien zu haben. In vielen hier untersuchten Medien haben die NM300K-Partikel ein Zetapotential in der Nähe von 0 mV und sind trotzdem kolloidal stabil. Sie sind sterisch stabilisiert durch die hinzugefügten Stabilisatoren (Klein et al. 2011, JRC Report). In den Medien Elendt M4 für den Daphnien-Akutttest und den chronischen Daphnien-Test, in RPMI-Medium und in Grünalgen-Medium für *Scenedesmus vacuolatus* zeigte sich Agglomeration der Silbernanopartikel. Im Medium für *Vibrio fischeri* war die Agglomeration sehr stark ausgeprägt. Die Methode der UV/VIS-Spektroskopie war sehr gut geeignet, um die Auswertung der DLS-Messungen bei der Be-

stimmung der kolloidalen Stabilität von Silbernanopartikeln zu ergänzen. Die Aufnahme der UV/VIS-Spektren parallel zur DLS und ELS unterstützte die Interpretation der Lichtstreuungsergebnisse, indem sie eine Differenzierung zwischen verschiedenen Aggregatformen der AgNP ermöglichte.

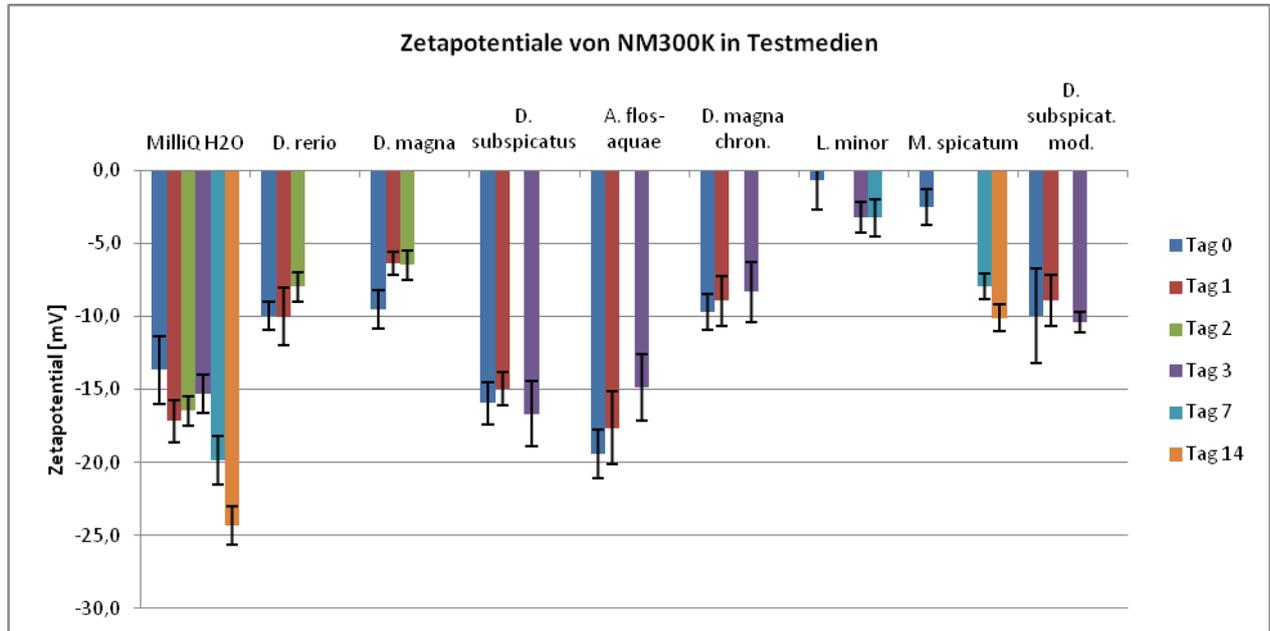


Abbildung 21: Ergebnisse der Zetapotential-Messungen der Silbernanopartikel NM300K in den jeweiligen Testmedien. Die Daten sind für die Messtage jeweils gemittelt.

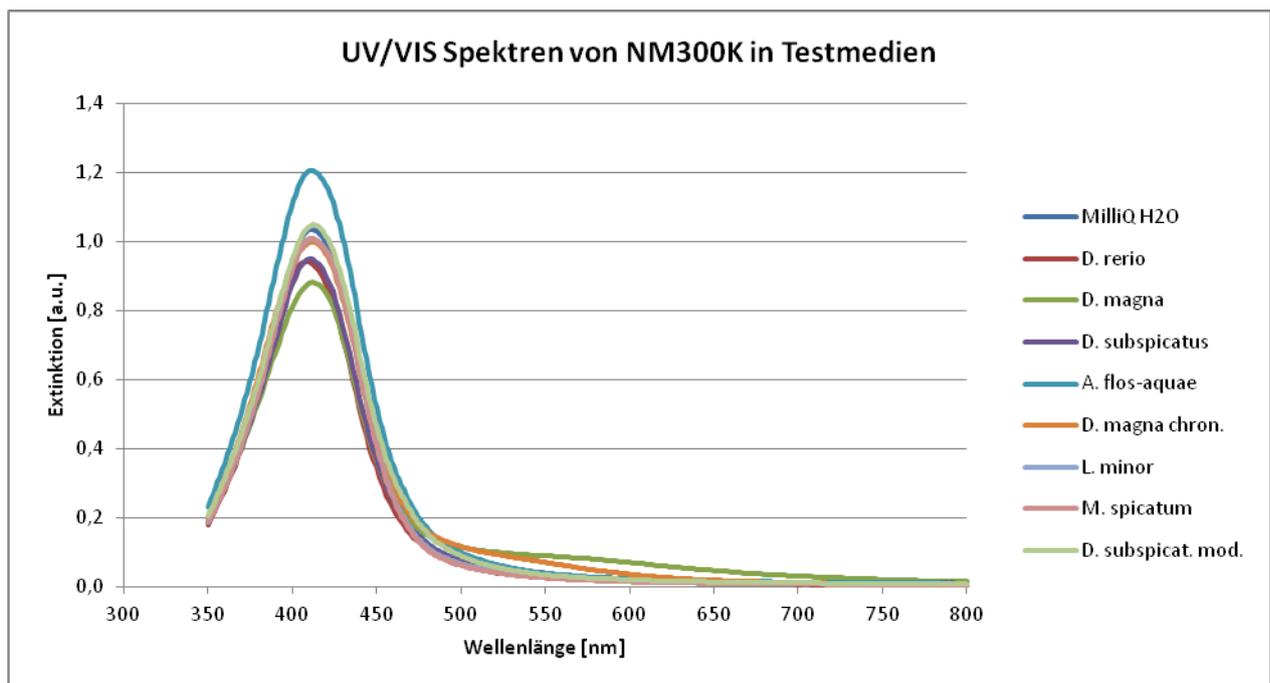


Abbildung 22: Ergebnisse der Messungen der UV/VIS-Spektren der Silbernanopartikel NM300K in den jeweiligen Testmedien am letzten Messtag. Die Daten sind für den Messtag jeweils gemittelt.

Charakterisierung der $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ -Nanopartikel in Medien

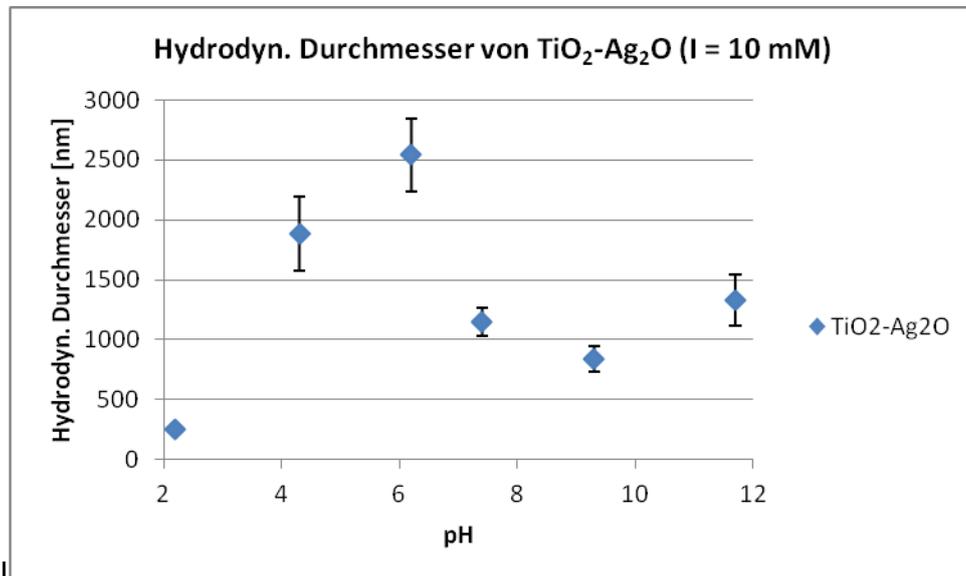


Abbildung 23: Hydrodynamischer Durchmesser der $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ -Dispersionen (Kumulanten-Methode) in Abhängigkeit vom pH bei $I = 10 \text{ mM}$.

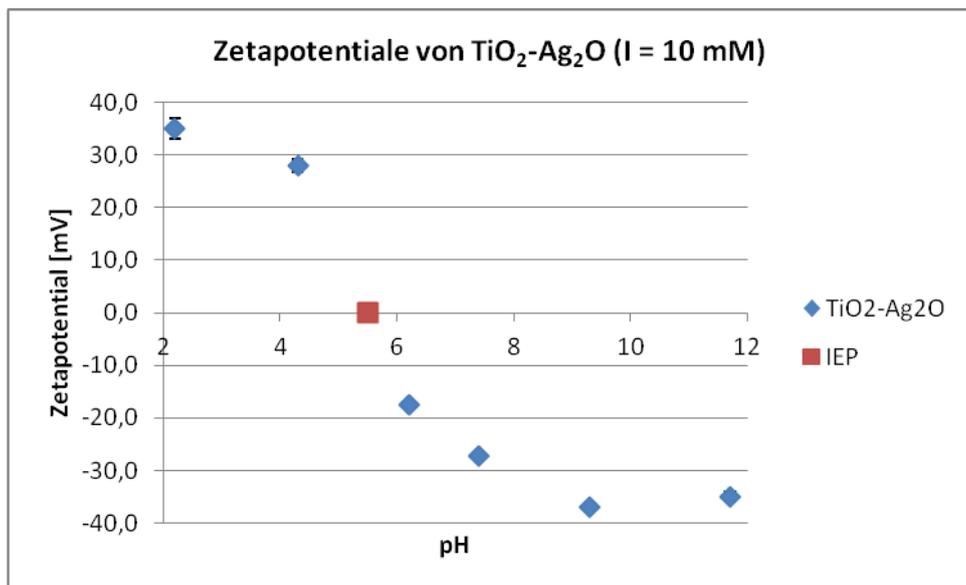


Abbildung 24: Gemessene Zetapotentialien der $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ -Dispersionen in Abhängigkeit vom pH bei $I = 10 \text{ mM}$ und die Abschätzung des isoelektrischen Punkts IEP.

In Zusammenarbeit mit dem Partner IWT wurde die Charakterisierung der Titandioxid-Silber-Komposit-Nanopartikel durchgeführt. Zunächst wurden in Abhängigkeit des pH-Werts von ca. pH 2 bis pH 12 die hydrodynamischen Durchmesser und die Zetapotentialien der Partikel mit den etablierten SOPs bestimmt. Die Konzentration der Partikel war dabei $0,15 \text{ g/L}$. Die unterschiedlichen pH-Werte der $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ -Dispersionen wurden mit verdünnten Natriumhydroxid- und Salzsäure-Lösungen so eingestellt, dass die Dispersionen eine Ionenstärke (I) von ca. 10 mM hatten. Die Ergebnisse für die hydrodynamischen Durchmesser (mit der Ku-

mulanten-Methode bestimmt) sind in der Abbildung 23 gezeigt. Die gemessenen Zetapotentiale sind in der Abbildung 24 dargestellt. Beim Vergleich der beiden Darstellungen ist klar zu erkennen, dass im pH-Bereich in der Nähe des isoelektrischen Punktes (IEP), bedingt durch die kleineren Zetapotentiale, die Nanopartikel zu Agglomeration neigen und somit in diesem Bereich größere hydrodynamische Durchmesser gemessen wurden. In diesem liegen die pH-Werte der Medien für die verwendeten biologischen Testsysteme, daher ist eine starke Neigung zu Agglomeration hier sehr wahrscheinlich.

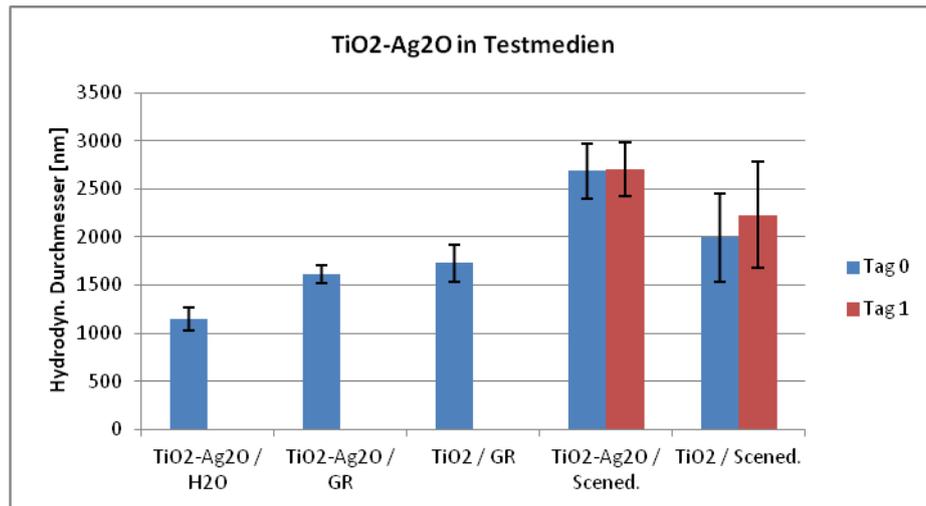


Abbildung 25: Hydrodynamischer Durchmesser der TiO₂/Ag₂O -Dispersionen in den Medien H₂O (mit 10 mM NaCl), GR und *Scenedesmus vacuolatus*.

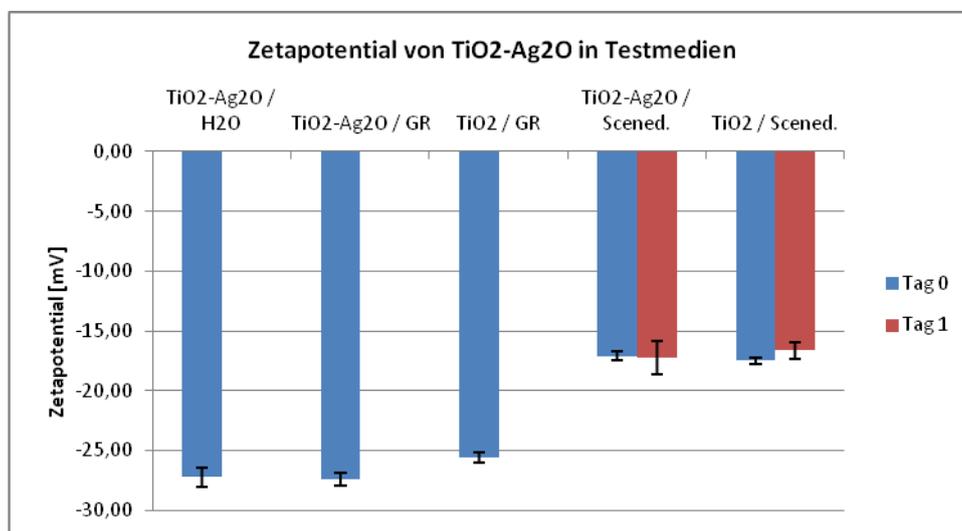


Abbildung 26: Gemessene Zetapotentiale der TiO₂/Ag₂O -Dispersionen in den Medien H₂O (mit 10 mM NaCl), GR und *Scenedesmus vacuolatus*.

In den Medien für das Enzym GR (pH 7,5) und für *Scenedesmus vacuolatus* (pH 6,7) konnte die Vorhersage des Agglomerationsverhaltens der TiO₂/Ag₂O-Partikel aus den vorherigen Messungen bestätigt werden. Die gemessenen hydrodynamischen Durchmesser (Kumulanten-Methode) und die gemessenen Zetapotentiale lagen in dem Bereich pH 6 bis pH 8 der pH-abhängigen Messungen. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu dem kollo-

idalen Verhalten der reinen TiO_2 -Partikel, die ebenfalls untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 für die hydrodynamischen Durchmesser und in Abbildung 26 für die Zetapotentiale dargestellt.

Charakterisierung der selbst hergestellten Silbernanopartikel in Testmedien

Die in AP 1.1.1 hergestellten Silbernanopartikel wurden nach jedem Schritt im Herstellungsprozess charakterisiert. Durch Reduktion von Silbernitratlösungen im Batch- oder Mikroreaktor wurden die Silbernanopartikel hergestellt und dann als Reaktionskontrolle auf die DLS und UV/VIS-Spektroskopie auf die Art der Partikelgrößenverteilung hin untersucht. Für die Synthese vom August 2012 für das Rohprodukt der Reaktion von Glucose mit Silbernitrat ($200 \mu\text{M}$) ist das UV/VIS-Spektrum in Abbildung 27 dargestellt. Die dazugehörigen Ergebnisse der DLS sind in Tabelle 7 aufgeführt. Für die Reaktion mit Glutathion (GSH) wurde eine niedrigere Konzentration von Silbernanopartikeln ($110 \mu\text{M}$) benötigt - daher die niedrigere Extinktion der Dispersion, außerdem war ein Dialyseschritt vor der Reaktion dem Coating-Reagenz GSH nötig. Vor der Reaktion mit GSH wurde das Zwischenedukt filtriert. Die Maxima der Plasmonresonanz verschoben sich bei jedem Schritt um 2 nm zu längeren Wellenlängen. Die UV/VIS-Spektren des Rohprodukts und der Partikel mit GSH-Coating hatten kleine Schultern bei ca. 500 nm, daher waren die gemessenen hydrodynamischen Durchmesser (dH NNLS) etwas größer als für die anderen beiden Proben.

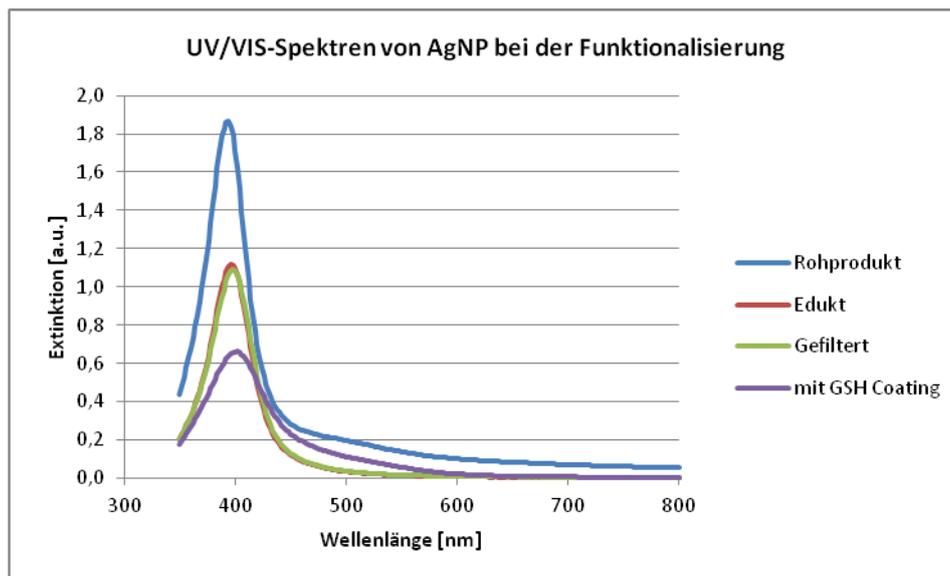


Abbildung 27: UV/VIS-Spektren zwischen und nach den Reaktionsschritten bei einer Synthese von Silbernanopartikeln die mit Glutathion-Coating versehen wurden.

Tabelle 7: Charakterisierungsergebnisse der AgNP zwischen den Reaktionsschritten bei der Synthese vom August 2012 (*gefiltert mit 0,45 µm regen. Cellulose)

Probe (Silbergehalt)	hD (CUMU) [nm]	Polydispersitätsindex	dH (NNLS) [nm]	Ikorr [kHz]	Plasmon [nm]	pH
AgNP Gluconat (200 µM)	47.4 ± 1.5	0.40 ± 0.02	50 ± 15	38.4 ± 3.0	394	10.7
AgNP Gluconat prefunkt (110 µM)	437 ± 55	0.20 ± 0.02	36 ± 8	7.3 ± 0.7	396	10.8
AgNP Gluconat prefunkt (110 µM)*	43 ± 7	0.28 ± 0.07	34 ± 8	5.4 ± 0.5	398	10.8
AgNP Glutathion (100 µM)	69.4 ± 2.8	0.27 ± 0.02	57 ± 12	13.9 ± 1.0	402	9.5

Nach der gleichen Vorgehensweise wurde zuvor im Mai 2012 eine ähnliche Synthese durchgeführt und die Partikelgrößenverteilung und das Zetapotential gemessen. Zusätzlich wurden die UV/VIS-Spektren aufgenommen und die Produkte mit der AAS auf den Silbergehalt hin untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 zusammengefasst. Die UV/VIS-Spektren der AgNP-Dispersionen zeigen deutlich die Bildung von Agglomeraten und den Verlust von Primärpartikeln (Abbildung 28). Die AgNP mit GSH-Coating wurden sogar innerhalb von zwei Monaten vollständig aufgelöst; im UV/VIS-Spektrum war keine Plasmonresonanz mehr messbar. Dies Verhalten deckt sich auch mit den Streueigenschaften der Dispersion bei der DLS-Messung. Die Streuintensitäten waren zu gering für die Messung. Die Nanopartikel-Dispersionen (AgNP-Gluconat, AgNP-Glutathion) wurden ebenso in den Medien für den Glutathion-Reduktase-Inhibitionstest (GR) und den Algen-Wachstumsinhibitionstest charakterisiert. Die Ergebnisse der AAS-Messungen der Stammdispersionen ergaben für AgNP mit Gluconat-Coating 11,8 mg Ag/L und für AgNP mit GSH-Coating 4,6 mg Ag/L. Die erreichten Ausbeuten der Synthesen sind daher 55% für die AgNP mit Gluconat-Coating und 39% für die AgNP mit GSH-Coating.

Tabelle 8: Charakterisierung der Silbernanoartikel aus der VdW-Synthese Mai 2012.

Probe (Nominaler Ag-Gehalt)	Messgröße	Messung 05/2012	Messung 07/2012
AgNP Gluconat H2O (21.6 mg/L)	dH NNLS [nm]	52.9 ± 11.6	75.8 ± 17.5
	Ikorr [kHz]	72.6 ± 1.1	177.4 ± 6.9
	Extinktion @ 402 nm	1.49	1.01
	AAS Messung [mg/L]	11.8 ± 0.1	-
AgNP Glutathion H2O (10.8 mg/L)	dH NNLS [nm]	47.3 ± 10.3	I zu gering
	Ikorr [kHz]	4.2 ± 0.9	I zu gering
	Extinktion @ 396 nm	0.18	0.04
	AAS Messung [mg/L]	4.6 ± 0.1	-

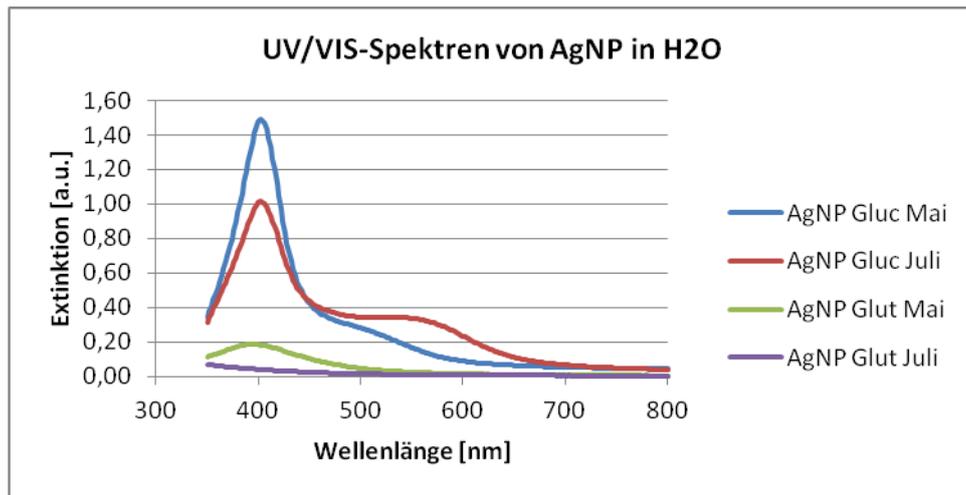


Abbildung 28: UV/VIS-Spektren der Stammdispersionen der Silbernanopartikel (Synthese Mai 2012).

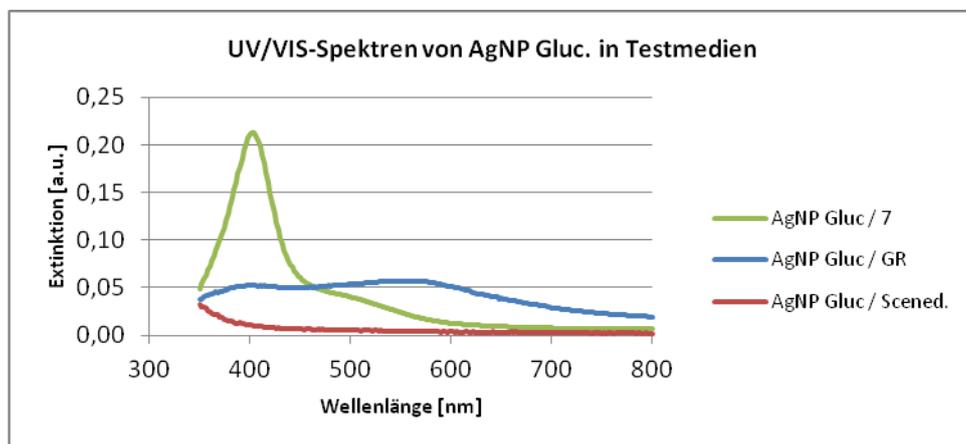


Abbildung 29: UV/VIS-Spektren der AgNP mit Gluconat-Coating in Wasser und den Medien GR und für *Scenedesmus vacuolatus*.

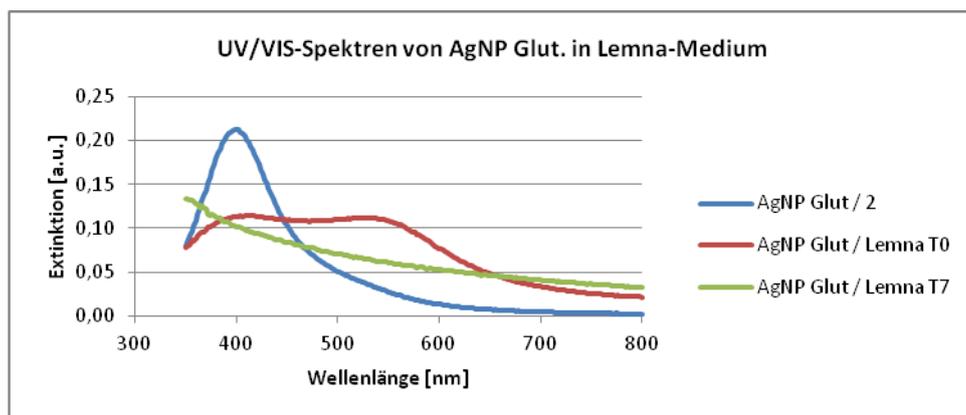


Abbildung 30: UV/VIS-Spektren der AgNP mit GSH-Coating in Wasser und dem *Lemna*-Medium.

Durch die Vorgehensweise bei der Testung der Dispersionen wurden die Stammdispersionen verdünnt. Beim Algentest (*Scenedesmus vacuolatus*) war der Verdünnungsfaktor ca. 4,2 und beim Enzymtest mit GR war er ca. 7. Das bedeutet, die Nominalkonzentration im Algentest betrug ca. 2,8 mg/L (AgNP Gluc.) und 1,1 mg/L (AgNP-Glut.). Die Nominalkonzentrationen im GR betragen ca. 1,7 mg/L (AgNP Gluc.) und 0,7 mg/L (AgNP-Glut.). Die AgNP mit Gluconat-Coating zeigten im GR-Medium starke Agglomeration und im Grünalgen-Medium wurden die Partikel aufgelöst (Abbildung 29). Es konnte keine Plasmonresonanz im Spektrum gemessen werden. Die AgNP mit GSH-Coating zeigten im *Lemna*-Medium ebenfalls starke Agglomeration bei den gemessenen UV/VIS-Spektren (Abbildung 30). Die Ergebnisse für die DLS-Messungen sind in der Abbildung 31 dargestellt. Die Proben AgNP Glut. im GR-Medium und Grünalgen-Medium und die weiteren Messtage von AgNP Gluc. im Grünalgen-Medium sind hier nicht aufgeführt, weil entweder die Streuintensitäten zu klein waren für eine Charakterisierung mit den beim VdW verfügbaren Methoden oder klar mit dem Auge sichtbare ca. 1 mm große Agglomerate vorhanden waren (AgNP Glut. im Grünalgen-Medium). Aufgrund der so beobachteten Instabilität der AgNP wurde wegen der mangelnden Relevanz in Bezug auf die Umwelttoxizität auf weitere Tests mit diesen AgNP verzichtet.

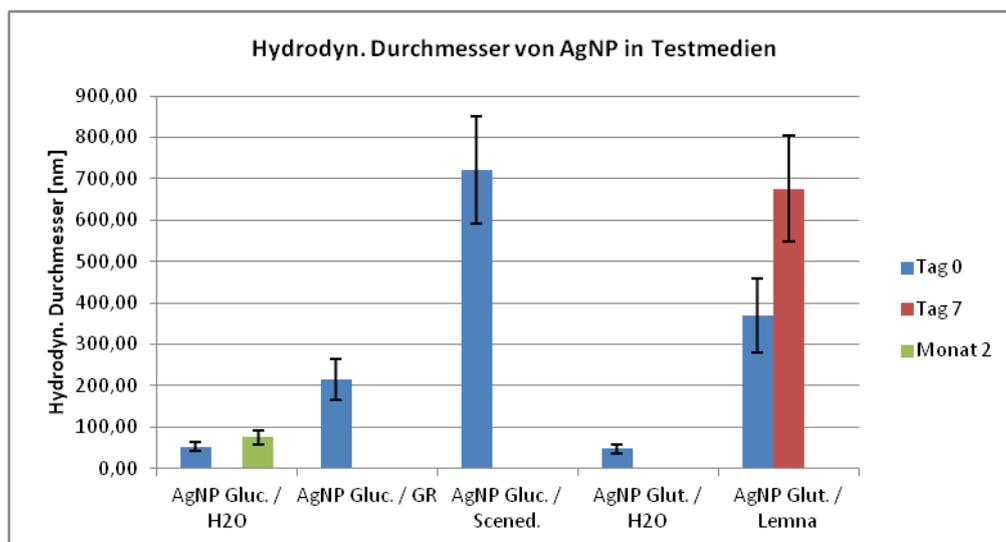


Abbildung 31: Ergebnisse der DLS von AgNP in den Medien Wasser, GR und im Grünalgen-Medium für *Scenedesmus vacuolatus*.

Silbergehaltsbestimmung der Nanopartikel in Testmedien mit Atom-Absorptionsspektroskopie

Zu den schon durchgeführten AAS-Messungen von Silbernitrat in den Testmedien wurden erste AAS-Messungen in den Medien Wasser, Alge und GR mit dem Referenzmaterial NM300K gemacht. Abweichend von den Ergebnissen für Silbernitrat in den Testmedien wurden kleinere Wiederfindungsraten für die NM300K ermittelt in einem Bereich von 50% - 80%.

Dies legte die Vermutung nahe, dass sich durch die Methodik Verluste z.B. durch Adsorption an Oberflächen ergeben oder dass die tatsächliche Silberkonzentration NM300K wesentlich geringer ist als die Nominalkonzentration, was bei der Berechnung von z.B. EC₅₀-Werten berücksichtigt werden müsste.

Daher wurde mit dem Partnern BGR und TUDr für zwei Proben, den AgNP NM300K und den AgNP NanoXact (30 nm, Citrat-stabilisiert, Hersteller nanoComposix), ein Methodenvergleich zur Silbergehaltsbestimmung durchgeführt. Die Wiederfindungsraten hierzu sind in der Tabelle 9 zusammengefasst. Der Projektpartner BGR mit der Methode ICP-OES mit Säureaufschluss, das UFT mit AAS und Königswasseraufschluss und der Partner TUDr mit UV/VIS Spektroskopie haben vergleichbare Ergebnisse für die Silbergehalte dieser Proben erzielt. In einem letzten Schritt wurde die NM300K-Silbernanopartikel-Dispersion bei einer Nominalkonzentration von 20 mg Ag/mL nach Volhard titriert, um den Silbergehalt zu messen. Diese Titrationsmethode ist eine sehr robuste Methode um Silbermengen in einem Bereich von 0,1 – 1,0 mmol zu bestimmen (Jander & Blasius 1995). Die Ergebnisse der beiden Titrationen mit insgesamt 11 Wiederholungen sind in Tabelle 10 aufgeführt. Diese Ergebnisse stimmen gut mit Ergebnissen des Partners BGR für ICP-OES Messungen des NM300K überein.

Tabelle 9: Methodenvergleich der Silberbestimmung mit Königswasseraufschluss (VdW) mit Hilfe der GF-AAS und den Methoden ICP-OES (BGR) und der Auswertung der Plasmonresonanz im UV/VIS (TUDr).

Nominaler Silbergehalt	Gefundener Silbergehalt [mg/L]		
	VdW: GF-AAS	BGR: ICP-OES	TUDr: UV/VIS (d50,3)
NanoXact (20 mg/L)	14.9 ± 0.2	14.1 ± 0.1	14.2 (39.0 nm)
NM300K BGR (20 mg/L)	15.0 ± 0.3	14.5 ± 0.4	15.6 (51.4 nm)
AgNO ₃ (20 mg/L)	18.8 ± 0.9		

Tabelle 10: Ergebnisse der Titration der NM300K-Silbernanopartikel nach Volhard.

Titration nach Volhard	Gefundene Konzentration	Wiederfindung
NM300K (20 mg/mL)	[mg/mL]	[%]
Vial Nr. 7016	16.95 ± 0.88	84.8 ± 4.4
Vial Nr. 7051	16.78 ± 0.11	83.9 ± 0.6
Mittelwert	16.87 ± 0.50	84.3 ± 2.5

Nun wurde überprüft, ob die für Silbernitrat etablierte AAS-SOP auch auf die Silbergehaltsbestimmung der Silbernanopartikel NM300K und der $\text{TiO}_2\text{-Ag}_2\text{O}$ -Partikel in den Testmedien angewendet werden konnte. Außerdem sollte der gelöste Silberanteil der Nanopartikelproben in den Testmedien bestimmt werden. Für die Bestimmung des gelösten Silberanteils der Silbernanopartikel wurde von einer Silberkonzentration von 10 mg Ag/L ausgegangen, wie in den entsprechenden Charakterisierungsversuchen für die Dynamische Lichtstreuung und die Bestimmung des Zetapotentials. Als experimenteller Ansatz zur Bestimmung des gelösten Silberanteils wurde die Ultrafiltration gewählt. Die PES-Membran der verwendeten Filter ist mit einer Trenngröße von 3 kD vom Hersteller angegeben (Sartorius Vivaspin 500, MWCO 3000). Nach den Empfehlungen des Herstellers ist die Abtrennung von Aprotinin (MW 6500) zu 96% mit dieser Membran möglich. Der hydrodynamische Durchmesser von Aprotinin wird von Wilkins et al. (1999) mit ca. 3,2 nm angegeben. Daher sollte die Porenweite dieser Membran kleiner als 3 nm sein. Zusätzlich zu der Bestimmung des Gesamtsilbergehalts wurde die Ultrafiltration durchgeführt und das Filtrat mit der AAS untersucht. Die gemessenen Gesamtsilbergehalte in den NM300K-Proben lagen bei ca. 6.9 bis 8.2 mg/L. Bezieht man die Gesamtsilbergehalte der NM300K-Proben auf die Ergebnisse der Titration nach Volhard sind die Wiederfindungen zwischen 82% und 97% (siehe Abbildung 32). Entsprechende Wiederfindungen für das Medium Wasser haben die Projektpartner BGR und TUDr mit anderen Methoden (ICP-OES, UV/VIS) bestimmt (Tabelle 9).

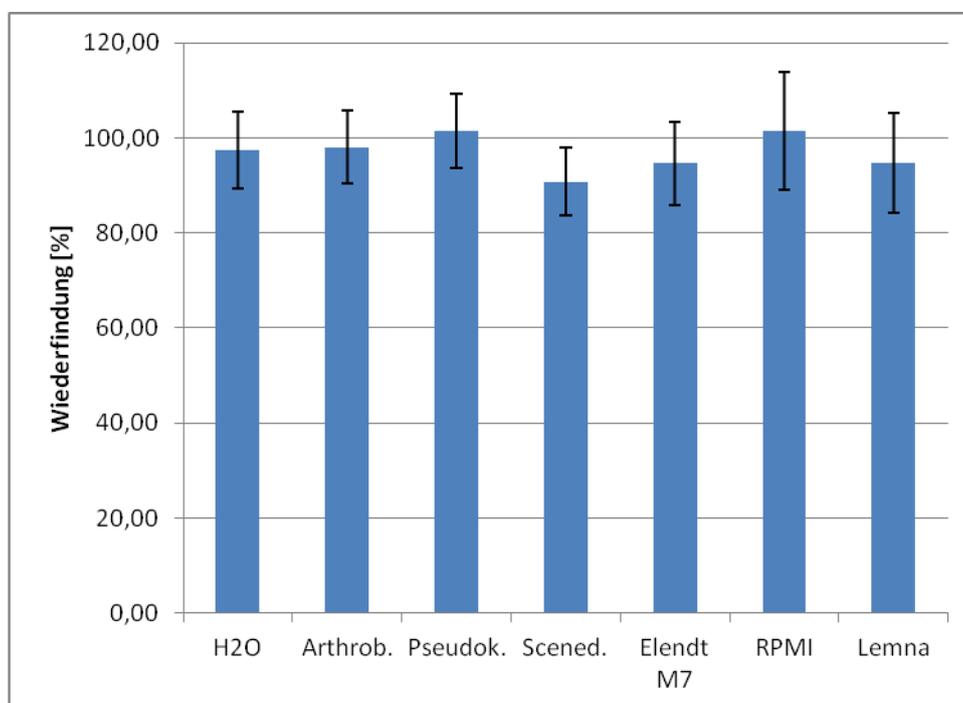


Abbildung 32: Wiederfindung für 10 mg Ag/L NM300K AgNP in biologischen Testmedien, basierend auf n = 3 unabhängigen Messungen.

Die Bestimmung des Gesamtsilbergehaltes und des gelösten Silberanteils wurde für die untersuchten Testmedien am ersten Tag und am letzten Tag der Testlaufzeit durchgeführt. Zeitlich parallel wurden zusätzlich die Nanopartikel in Wasser untersucht. Die Proben wurden über den Versuchszeitraum im Dunkeln aufbewahrt.

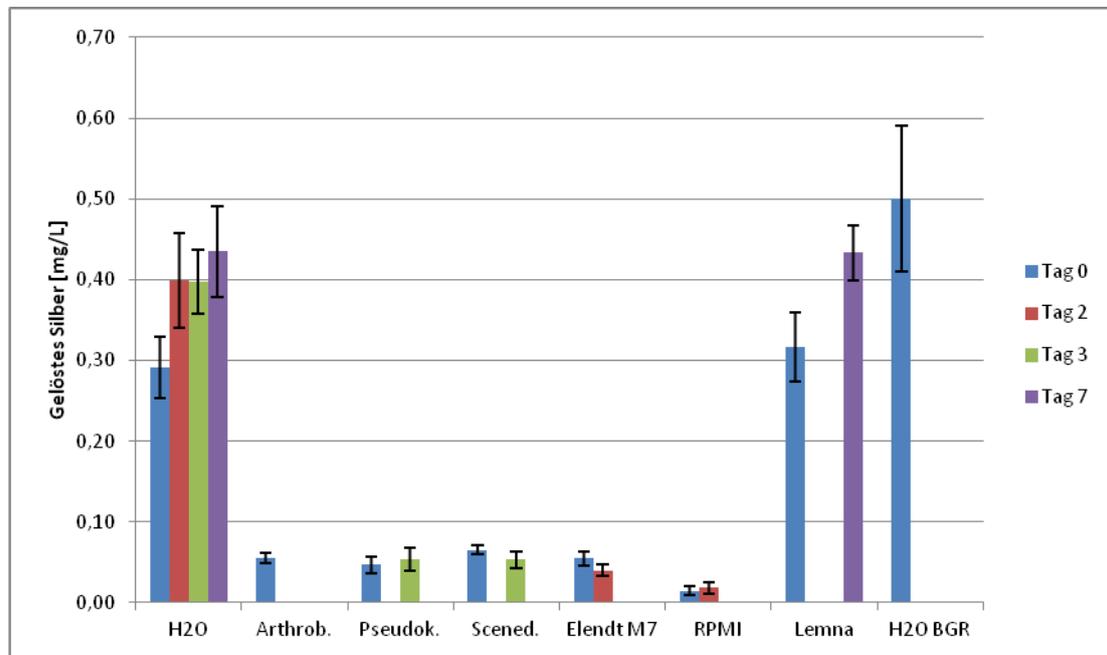


Abbildung 33: Gelöstes Silberanteil für 10 mg Ag/L NM300K in biologischen Testmedien, basierend auf $n \geq 2$ unabhängigen Messungen.

Die Ergebnisse für den gelösten Silberanteil sind in Abbildung 33 für NM300K und Abbildung 34 für die $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ -Partikel des Partners IWT dargestellt (beide mit der Einwaage 10 mg Ag/L). In Abbildung 33 ist zusätzlich das Ergebnis des Partners BGR für den gelösten Silberanteil von NM300K (bestimmt mit der Methode der Ultrazentrifugation) dargestellt. Für NM300K in Wasser und in *Lemna*-Medium wurden gelöste Silberanteile von 0,3 bis 0,5 mg/L, für alle anderen Medien (*Arthrobacter*, *Pseudokirchneriella*, *Scenedesmus*, Elendt M7 und RPMI) sehr viel kleinere gelöste Silberanteile von 0,01 bis 0,07 mg/L gemessen.

Für die Versuche mit den $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ -Partikeln des Partners IWT ergaben sich deutlich höhere gelöste Silberanteile. In Wasser und dem *Lemna*-Medium betrug der gelöste Silberanteil 2,4 bis 3,6 mg/L. Die gelösten Silberanteile in den anderen Medien (*Arthrobacter*, *Pseudokirchneriella*, Elendt M7 und RPMI) waren auch in diesen Experimenten sehr viel geringer. Es wurden gelöste Silberanteile von 0,1 bis 0,4 mg/L gemessen. Die Muster für beide Partikelarten sind ähnlich, nur dass die Absolutwerte der gelösten Silberanteile im Falle von $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ viel höher sind. Es lag nahe, dass die Zusammensetzungen der Testmedien einen entscheidenden Einfluss haben. Die wichtigsten Komponenten der untersuchten Test-

medien, die das Verhalten in den Testmedien bestimmen sollten, sind in der Tabelle 5 (S. 25) aufgeführt. Die Bestandteile der Medien, die oxidierend wirken, sind rot (Nitrate), die reduzierend wirkenden grün (Ammonium und Glucose) markiert. Es wird davon ausgegangen, dass die oxidierenden Komponenten die Silberionen (Ag^+) stabilisieren, während die reduzierenden Komponenten die Silbernanopartikel (Ag^0) stabilisieren.

Zusätzlich enthalten die untersuchten Medien Chloridionen. Nur im Testmedium für *Lemna* ist der Chloridgehalt (0.01 mM) vernachlässigbar klein. Die enthaltenden Chloridionen fällen gelöste Silberionen als Silberchlorid, wenn das Löslichkeitsprodukt überschritten wird ($K_L \approx 10^{-10}$).

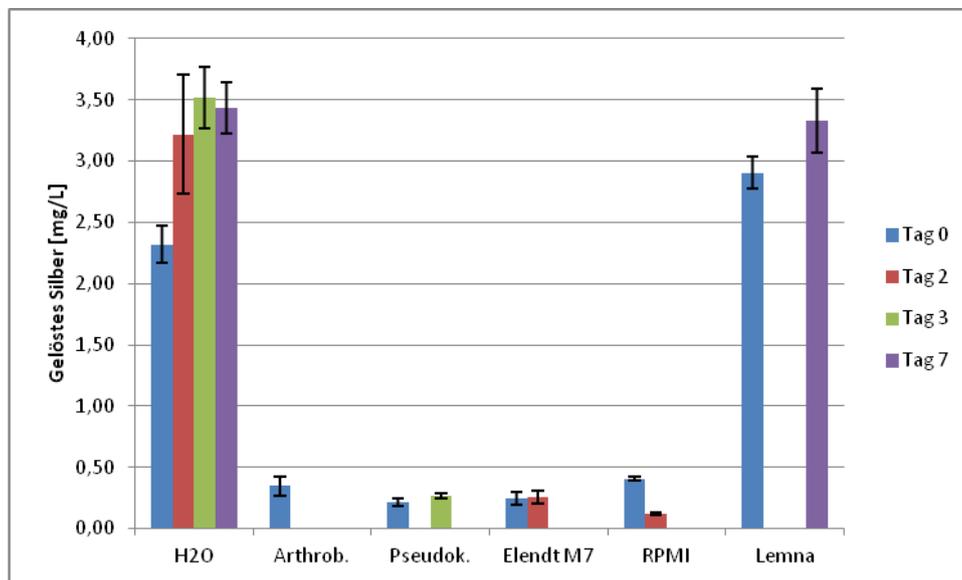


Abbildung 34: Gelöstes Silberanteil der $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ Nanopartikel (10 mg Ag/L) in biologischen Testmedien, basierend auf $n \geq 2$ unabhängigen Messungen.

Die Software PHREEQC (Ver. 2.18, USGS, Datenbank-Datei minteq.v4, erweitert u.a. um die Komponente Glucose) erlaubte eine theoretische Abschätzung, wie sich die in den Proben vorhandenen Silberspezies abhängig von der Medienzusammensetzung verhalten.

Zu Beginn der Messungen war in den Wasserproben schon ein hoher Anteil von gelöstem Silber vorhanden (ca. 0,3 mg/L für NM300K und ca. 2,5 mg/L für $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$). Ausgehend von diesen gelösten Anteilen als Ag^+ wurde für die Testmedien die numerische Spezierung durchgeführt. Die experimentellen Daten sind in den Abbildungen 35 und 36 diesen numerischen Ergebnissen gegenüber gestellt. Die Daten zeigten eine gute Übereinstimmung für die jeweiligen Medien. In den Medien, in denen experimentell wenig gelöstes Silber gemessen wurde, gaben die numerischen Berechnungen kleine Silberkonzentrationen für das chemi-

sche Gleichgewicht an. Die numerischen Berechnungen neigten aber dazu, die gelösten Silberanteile zu unterschätzen. Es konnte aus den Berechnungen geschlossen werden, dass in den Medien RPMI und *Arthrobacter* die gelösten Silberanteile so gering waren, weil sie Glucose enthalten. Die Glucose wirkte hier reduzierend. In dem Medium für *Pseudokirchneriella subcapitata* ist Ammonium enthalten (0,28 mM), so dass hier das Ammonium reduzierend auf die Silberionen wirken konnte. In den Medien Elendt M7 und für die Grünalgen *Scenedesmus vacuolatus* waren die gelösten Silberanteile so gering, weil die vorhandenen Silberionen mit Chloridionen gefällt wurden. Das *Lemna*-Medium enthält viel Nitrat (ca. 6 mM) und sehr wenig Chlorid (0,01 mM), so daß hier die oxidierende Wirkung des Nitrats einen hohen gelösten Silberanteil stabilisierte. Die Verwendung der numerischen Speziierung erlaubte somit die Identifizierung der wichtigsten Komponenten in Testmedien, die über Redox- oder Löslichkeitsgleichgewichte die Stabilität von Silbernanopartikeln und Silberionen maßgeblich in den Medien beeinflussen.

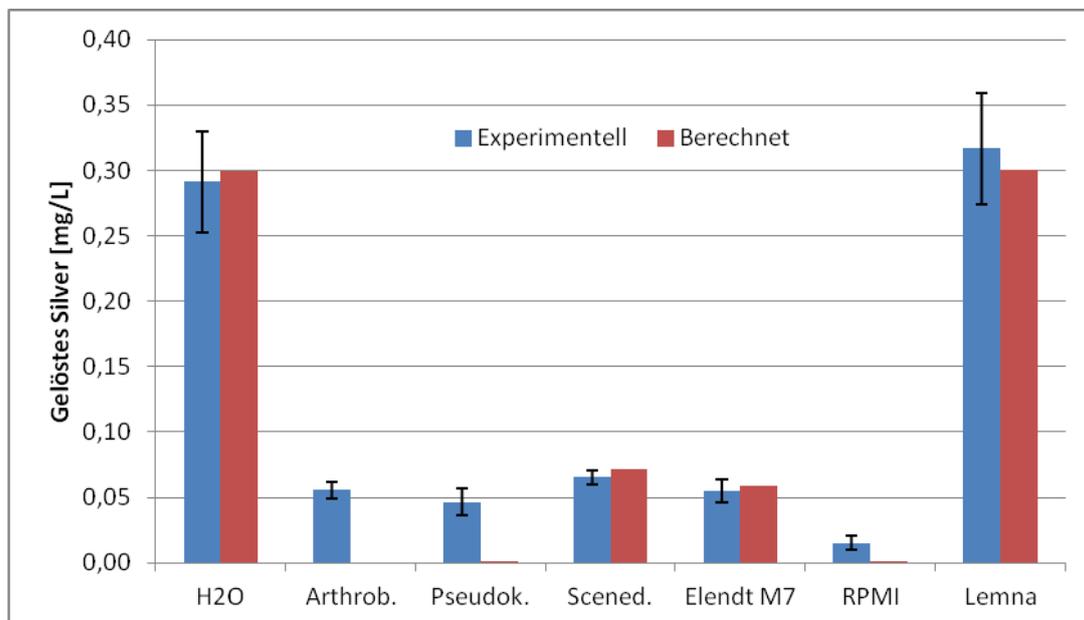


Abbildung 35: Vergleich des gelösten Silberanteils mit den numerischen Speziationsrechnungen für 0,3 mg Ag/L (NM300K) in den biologischen Testmedien.

Die gewonnenen Ergebnisse dieses Arbeitspaketes waren wichtig für die Bewertung des Einflusses der kolloidalen Eigenschaften (hydrodynamischer Durchmesser, Zetapotential), des gelösten Silberanteils und der Verteilung der Silberspezies auf das Verhalten der untersuchten Partikel in den Toxizitätsuntersuchungen sowie die Betrachtung des Verhaltens der Silbernanopartikel in den Abschnitten des Lebenszyklus, von der Herstellung über den Gebrauch im Textil, die mögliche Freisetzung dabei und die daraus folgenden möglichen Umweltkonzentrationen. Die Speziationsrechnungen legen nahe, dass die Chloridkonzentration in den jeweiligen Medien einen sehr großen Einfluß auf die obengenannten Eigenschaften hat. Ebenso ist die Anwesenheit von Schwefel unter anoxischen Bedingungen sehr wichtig,

da Silberionen dann sehr fest an den Schwefel gebunden vorliegen. Wie schon angedeutet, ist das Redoxpotential des umgebenden Mediums, bestimmt durch gelösten Sauerstoff, Nitrat oder gelöste reduzierende Komponenten wie Glucose und Ammoniumionen, bestimmend, ob Silbernanopartikel chemisch stabil sind (reduzierende Bedingungen) oder dazu neigen sich aufzulösen (oxidierende Bedingungen).

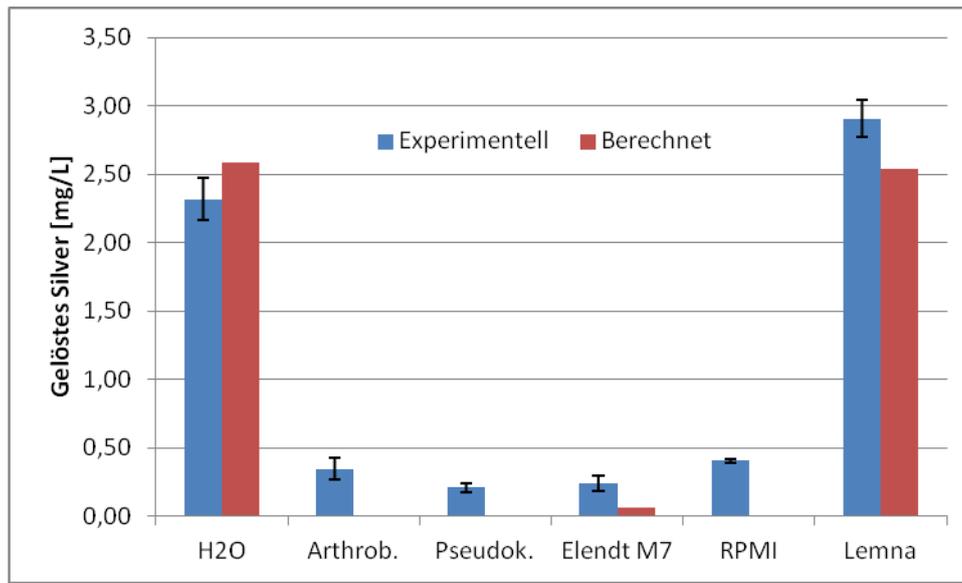


Abbildung 36: Vergleich des gelösten Silberanteils mit den numerischen Speziationsrechnungen für 2,59 mg Ag/L ($\text{TiO}_2\text{-Ag}_2\text{O-NP}$) in biologischen Testmedien.

2.1.3 Arbeitspaket 1.2.3: Wirkungsuntersuchungen mit Screening-Tests

Ziel dieses Arbeitspakets war es, grundlegende Mechanismen der Wirkungen von AgNP auf subzellulärer und zellulärer Ebene zu erarbeiten. Es sollten Aussagen dazu gewonnen werden, welche biologischen Merkmale (morphologisch, physiologisch, biochemisch) besonders hohe bzw. niedrige Sensitivitäten gegenüber AgNP haben, um daraus eine erste Einschätzung möglicher Gefahrenpotenziale und Wirkweisen der NP abzuleiten.

Um toxikologische Wirkmechanismen der zu testenden AgNP zu identifizieren, wurden die Partikel in Screening-Tests im Mikroliter-Maßstab auf subzellulärer Ebene an den Enzymen Acetylcholinesterase (AChE) und Glutathion-Reduktase (GR) getestet. Die ausgewählten Enzyme stellen in der Toxikologie Standard-Endpunkte dar, um die Toxizität verschiedenster Substanzen auf elementare Stoffwechselvorgänge abzuschätzen. Glutathion-Reduktase (GR) wurde ausgewählt, weil von einer starken Wechselwirkung von Silber (als freigesetzte

Silberionen (Ag^+) oder Silberpartikel (AgNP) mit den Thiol-Gruppen des Enzyms auszugehen war. Die Interaktion von freigesetzten Ag^+ aus den Partikeln mit Thiolgruppen in Proteinen und anderen Biomolekülen (z.B. Glutathion) wird als hauptverantwortlich für die beobachteten toxischen Effekte angesehen (Luoma 2008). Eine Inhibition dieses Enzyms hat für alle Zellen gravierende Konsequenzen, da die Glutathion-Reduktase ein Schlüsselenzym zur Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Stoffwechsels darstellt. Um zu untersuchen, ob tatsächlich Thiolate die bevorzugten biologisch aktiven Nucleophile für eine Bindung von Silberspezies sind, wurde in einer weiteren subzellulären Testserie das Enzym Acetylcholinesterase getestet. Dieses Enzym weist im aktiven Zentrum ein hochreaktives Alkoholatanion als nukleophiles Agens auf.

Zur Erfassung von Effekten der AgNP auf grundlegende Funktionen zur Aufrechterhaltung der Zellvitalität wurden Zytotoxizitätsversuche auf zellulärer Ebene an der physiologisch relevanten humanen Leberkarzinom-Zelllinie Hep G2 im Mikroliter-Maßstab durchgeführt.

Die Testpartikel waren die Referenzpartikel NM300K, TiO_2 -geträgerte Ag-Nanopartikel ($\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$; Partner IWT) und selbst hergestellte Gluconat- und Glutathion-gecoatete Partikel (siehe AP 1.1.1). Als Referenz bzw. Positivkontrolle diente Silbernitrat (AgNO_3). $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ -NP mit einer sehr scharfen Größenverteilung (10 – 20 nm) der Primärpartikel bestehen aus TiO_2 -Grundpartikeln, auf die 5 Mol% (6,6 Gew.-%) Silber dotiert wurde.

Zur Interpretation der Testergebnisse wurde in den Testmedien die Charakterisierung (DLS & ELS, UV/VIS und AAS) zur Bestimmung der kolloidalen Stabilität und zum Auflösungsverhalten der NM300K und der $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ durchgeführt (siehe dazu ebenfalls bei Abschnitt 2.1.2). Für die relevanten Konzentrationsbereiche wurden außerdem mit PHREEQCi die Gleichgewichtsspezies des Silbers in den Testmedien berechnet (siehe Abschnitt 2.1.2).

Methoden und Statistik

Glutathion-Reduktase (GR): Die Messung der Enzymaktivität erfolgt modifiziert nach Cribb et al (1989). Dabei wird die Reaktion eines Indikators mit dem reduzierten Substrat (reduziertes Glutathion, GSH) photometrisch verfolgt. Das oxidierte Glutathion (GSSG) ist das Substrat des Enzyms. Es wird durch das Enzym zu GSH reduziert. Das GSH reagiert in einem zweiten – nicht geschwindigkeitsbestimmenden - Schritt mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoate (DTNB) unter Bildung des Anions der Mercapto-2-nitro-Benzoessäure. Die Aktivität des Enzyms wird photometrisch über die zeitabhängige Zunahme der Extinktion beim Absorptionsmaximum des Farbstoffes (420 nm) verfolgt.

Acetylcholinesterase (AChE): Für die Messung der Enzymaktivität wurde von Ellman et al. (1961) eine photometrische Methode entwickelt, welche Acetylthiocholin als Substrat verwendet. Das Acetylthiocholin wird durch das Enzym zu Acetat und Thiocholin gespalten. Das gebildete Thiol kann in einem zweiten - nicht geschwindigkeitsbestimmenden - Schritt mit 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoate (DTNB) zu dem gelben Farbstoff Mercapto-2-nitro-Benzoessäure reagieren. Die Aktivität des Enzyms kann daher photometrisch über die zeitabhängige Zunahme der Extinktion des Farbstoffes beim Absorptionsmaximum (420 nm) verfolgt werden.

Zellvitalität: Hep G2-Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat in 96-well-Mikroplatten mit verschiedenen Konzentrationen (je 6 Replikate einer Konzentration) der gelösten AgNP für weitere 48 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO₂). Danach wurden die Zellen mit gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen um die AgNP zu entfernen und weitere 24 h inkubiert. Die Zytotoxizität der AgNP wurde in Abhängigkeit von der Konzentration mittels MTT-Assay ermittelt. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan (Mosmann, 1983; Berridge & Tan 1993; Berridge et al. 1996). Das gebildete Formazan wird mit Isopropanol aus den Zellen gelöst und photometrisch quantifiziert ($\lambda=570$ nm). Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms ToxRat Professional (Version 2.10.05 ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Deutschland) durchgeführt. Die EC_{xx}-Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen über das Verfahren der Probitanalyse berechnet. Das Programm ermittelte die prozentuale Hemmung der verschiedenen Konzentrationen bezogen auf die Kontrolle.

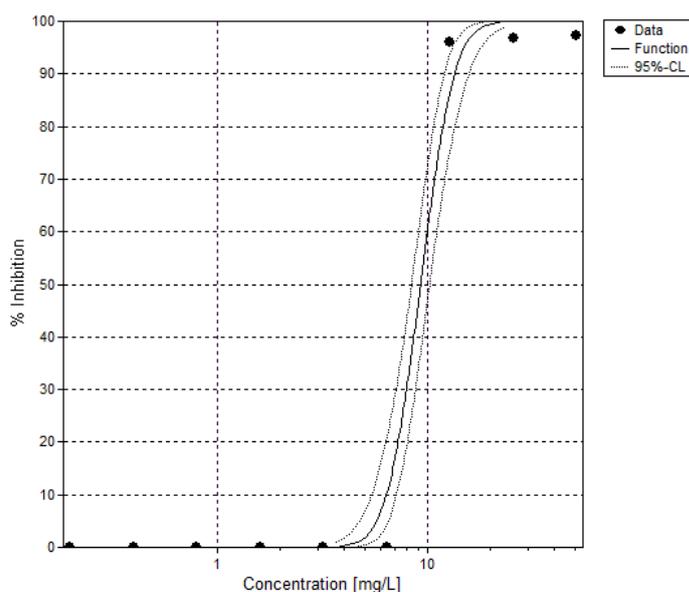


Abbildung 37: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit Vertrauensintervallen, berechnet und dargestellt mit ToxRat Professional, zeigt die Wachstumsinhibition der Zelllinien Hep G2 nach 48 h Inkubation mit TiO₂/Ag₂O.

Anschließend wurde eine Kurve mit sigmoidalem Verlauf, die die einzelnen Testergebnisse möglichst gut verband, erstellt. Abbildung 37 zeigt beispielhaft einen solchen sigmoidalen Verlauf. Anhand der dahinterliegenden mathematischen Funktion wurden die EC_{xx} -Werte berechnet. Diese Verfahren der Erstellung von Dosis-Wirkungsbeziehungen mit der Berechnung von EC_{xx} -Werten gilt auch für alle ökotoxikologischen Tests, die beim Partner ÖKO innerhalb von UMSICHT durchgeführt wurden und Teil dieses Berichtes sind (siehe Kap. 2.1.4 und 2.1.5).

Ergebnisse

Der Enzyminhibitionstest mit GR ergab für NM300K und TiO_2/Ag_2O eine komplette Hemmung der Enzymaktivität in dem getesteten Konzentrationsbereich von 100 μg Ag/L – 100 mg Ag/L. Der EC_{50} Wert für beide Testsubstanzen lag $< 0,1$ mg Ag/L. Der EC_{50} für Silbernitrat war mit $< 0,0001$ mg Ag/L mehrere Größenordnungen geringer. Alle Experimente wurden in drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei Replikaten durchgeführt. Das als Kontrolle ebenfalls getestete Dispersionsmittel der NM300K und das Trägermaterial TiO_2 zeigten in allen getesteten Konzentrationen keinen Effekt auf die Enzymaktivität. Im Gegensatz dazu hatten weder Silbernitrat noch die NM300K-Silberpartikel einen Effekt auf die Enzymaktivität der Acetylcholinesterase.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass essentielle Thiolgruppen in Proteinen und anderen Biomolekülen das molekulare Haupttarget für Ag^+ und Silberpartikel darstellen und weisen damit auf die besondere Rolle von Thiolaten als Angriffspunkt für die molekulare Toxizität von Silberspezies hin.

Tabelle 11: Inhibition des Zellwachstums (Hep G2) durch TiO_2/Ag_2O -NP. Übersicht der EC -Werte aller Wiederholungen (6 Replikate pro Wiederholung).

	Parameter	EC_{10}	EC_{20}	EC_{50}
run 1	Value [mg Ag/L]	5,294	5,920	7,333
run 2	Value [mg Ag/L]	6,402	7,281	9,313
	Mittelwert aller runs	5,848	6,601	8,323
	Stabw	0,783	0,962	1,400

Tabelle 12: Inhibition des Zellwachstums (Hep G2) durch $AgNO_3$. Übersicht der EC_{xx} -Werte aller Wiederholungen (je 6 Replikate pro Konzentration).

	Parameter	EC_{10}	EC_{20}	EC_{50}
run 1	Value [mg Ag/L]	2,841	3,432	4,928
run 2	Value [mg Ag/L]	4,441	5,096	6,631
run 3	Value [mg Ag/L]	6,082	7,133	9,677
	Mittelwert aller runs	4,455	5,220	7,079
	Stabw aller runs	1,621	1,854	2,406

Die Ergebnisse der zellulären Zytotoxizitätsassays mit der Zelllinie HepG2 sind für $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ -NP in Tabelle 11 und für die AgNO_3 in Tabelle 12 zusammengefasst. Sie zeigen nur einen geringen Unterschied der Wachstumshemmung durch $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ im Vergleich zu AgNO_3 . Im Gegensatz dazu wurde das Wachstum der Zelllinie durch NM300K im untersuchten Konzentrationsbereich bis 50 (mg Ag/L) nicht inhibiert, wie Abbildung 38 zeigt.

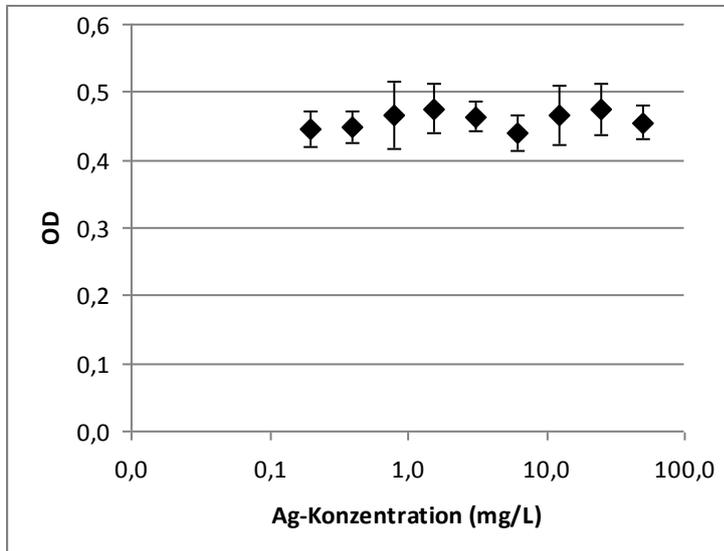


Abbildung 38: Darstellung der optischen Dichte (OD) als Indikator für die Zellvitalität der HEP G2 Zelllinie nach Inkubation in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von NM300K (0,2 bis 50 mg Ag/L).

Das parallel getestete Dispersionsmittel (NM300dis) und TiO_2 -Nanopartikel als Trägermaterial führten in dem getesteten Konzentrationsbereichen zu keiner Abnahme der Enzymaktivität, respektive der Zellvitalität.

Die vom Partner VdW hergestellten gecoateten AgNP wurden nur in der am höchsten herstellbaren Konzentration getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ag-Konzentration dieser Glutathion- bzw. Gluconat-gecoateten Ag-Nanopartikel mit 4,4 mg/L bzw. 11,7 mg/L zu gering war um einen messbaren Effekt in den o.g. Testsystemen zu induzieren.

In den Screening-Testsystemen bestätigte sich, dass in wässrigen Medien die gelösten Silberspezies aus der Silbernitrat-Referenz einen stärkeren toxischen Effekt zeigen als die Silberpartikel. Die bei dem Versuch gemachten Beobachtungen deuteten jedoch zusätzlich auf eine starke Agglomeration der NM300K und Sedimentation der Partikel in dem Testmedium RPMI hin, was ihre Bioverfügbarkeit weiter reduziert. Die Charakterisierung der NM300K-Partikel ergab für die Freisetzung von Ag^+ aus den NM300K im Testmedium RPMI (mit der Ultrafiltrationsmethode und der nachfolgenden Messung mit der AAS, siehe Abschnitt AP 1.2.2) die niedrigste gemessene gelöste Ag^+ -Konzentration der untersuchten Medien. Die Werte lagen für RPMI am Testanfang bei $0,01 \pm 0,01$ mg Ag/L und am Testende bei $0,02 \pm 0,01$ mg Ag/L bei einer Nominalkonzentration der NM300K von 10 mg Ag/L. Es wurde eine

deutliche Agglomeration der NM300K bei der gemessenen Konzentration von 10 mg Ag/L festgestellt (siehe auch Abschnitt zum AP 1.2.2).

Für die Versuche mit den TiO₂/Ag₂O-Partikeln des Partners IWT ergaben sich wesentlich höhere gelöste Silberanteile. Die gelösten Silberanteile im RPMI-Medium war mit 0,1 bis 0,4 mg/L wesentlich höher als für NM300K, d.h. die Absolutwerte der gelösten Silberanteile waren im Falle von TiO₂/Ag₂O fast eine Größenordnung höher.

2.1.4 Arbeitspaket 2.3.1: Erfassung der Wirkung – Terrestrische Systeme, Sediment und Akkumulation

Zu den toxikologischen Effekten von AgNP innerhalb terrestrischer Kompartimente ist wenig bekannt. Auf dem Hintergrund der Simulationsversuche des Kläranlagenpfades (AP 2.1.4, Partner IME), die gezeigt haben, dass ca. 90% der AgNP im Belebtschlamm bleiben (Tiede et al. 2010; Schlich 2013), sind Untersuchungen hierzu dringend erforderlich. In Deutschland wird Belebtschlamm als Dünger auf Ackerböden aufgebracht und kann dort terrestrische Organismen verschiedener Trophieebenen beeinflussen. Außerdem haben weitere Ergebnisse gezeigt, dass die Mobilität der AgNP eingeschränkt ist (Hoppe et al. 2011; Schlich 2013).

Um mögliche toxikologische Wirkungen auf terrestrische Systeme zu untersuchen, wurden vom Partner ÖKO folgende Tests und Untersuchungen durchgeführt:

1. der Sedimentkontakttest mit *Arthrobacter globiformis* nach DIN 38412-L48 (2002)
2. der Reproduktionstest mit der Collembolenart *Folsomia candida* nach OECD-Richtlinie 232 (2009) bzw. ISO 11267 (2001) sowie in einer hier entwickelten miniaturisierten Variante (Filser et al. 2013)
3. Langzeiteffekte von NM300K im Boden auf die beiden Bodenorganismen

Da Nanopartikel besonders während ihrer Entwicklung in nur geringen Mengen verfügbar sind, war es ein weiteres Ziel dieses Projektes beide Testsysteme so zu miniaturisieren, dass wesentlich kleinere Testvolumina benötigt wurden. Zusätzlich wurden in aquatischen Systemen der Daphnientest und der *Lemna*-Test in miniaturisierter Form verwendet (siehe 2.1.5 und 2.6). Alle modifizierten Testsysteme wurden validiert bevor sie zur Anwendung kamen.

Sedimentkontakttest mit Arthrobacter globiformis nach DIN 38412-L48 (2002), modifiziert

RefeSol 01A wurde als Testboden verwendet. Refesol (www.refesol.de) sind Böden, die durch das Umweltbundesamt (UBA) als geeignete Testböden entsprechend der Deutschen Bundes-Bodenverordnung anerkannt sind. Die Analysedaten von Refesol 01A sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Physiko-chemische Eigenschaften von RefeSol 01A. WHC_{max}^* : Maximale Wasserhaltekapazität.

Sand [weight%]	71
Silt [weight%]	24
Clay [weight%]	5
pH	5,67
C_{org} [%]	0,93
N_{total} [%]	882
WHC_{max}[*] [ml/kg]	227

Für die Testvorbereitung wurde der Boden gesiebt, zu je 15 g in Zentrifugenröhrchen aliquotiert und bei 120 °C autoklaviert. Dann wurde der Boden mit der AgNP-Dispersion gemischt, um die höchste Konzentration zu erreichen. Die Verdünnungsstufen wurden durch Vermischen von kontaminiertem mit nicht kontaminiertem Boden hergestellt. Für sechs verschiedene Konzentrationen wurden drei unabhängige Tests mit je drei Replikaten jeder Konzentration für die AgNP NM300K und TiO_2/Ag_2O sowie für $AgNO_3$ durchgeführt. Parallel wurde der Test ohne Boden durchgeführt, um den Einfluss des Bodens (u.a. Adsorption von Ag^+ und/oder der AgNP) zu erfassen. Für das höchste eingesetzte Volumen der NM300K-Standarddispersion wurde zur Kontrolle der Einfluss des Dispersionsmittels der NM300K (NM300Kdisp) ermittelt.

Ebenso wurde für das höchste eingesetzte Volumen der TiO_2/Ag_2O -Dispersion der Einfluss nicht dotierter TiO_2 -Trägerpartikel untersucht. All Proben wurden auf einen Wassergehalt von 50% der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt. Alle Tests wurden ca. 20 Stunden nach Dotierung der Böden durchgeführt/begonnen.

Der Sediment-Kontakttest basiert auf der Hemmung der Dehydrogenase-Aktivität der Bakterien als toxikologischem Endpunkt. Gemessen wird dazu die Metabolisierung des Farbstoffes Resazurin zu Resorufin über die Abnahme der optischen Dichte im Absorptionsmaximum des Resazurins (Liu 1989; Thomas et al. 1986). Der Sediment-Kontakttest wurde mit dem Bakterium *Arthrobacter globiformis* durchgeführt, das als nicht pathogen klassifiziert ist. Die verwendete Bakterienkultur stammte von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Seriennummer 2014). Die Bakterien wurden entsprechend der DIN 38412-L48 (2002) vermehrt und in 1,5 ml Eppendorf Zentrifugenröhrchen bei -20 °C gelagert.

Miniaturisierung des Sedimentkontakttests mit *Arthrobacter globiformis*

Für die Miniaturisierung des Tests wurden 24-Well-Platten mit Deckel verwendet. Je Well wurden 0,6 g Boden eingewogen. Es wurden immer zwei Platten mit je 3 Replikaten jeder

Ag-Konzentration vorbereitet. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle (NC) Boden eingewogen, der mit NM300K Dispersant bzw. mit der TiO₂ Trägermaterial dotiert war. Dann wurden 600 µl dionisiertes Wasser in jedes Well pipettiert und weiter entweder 400 µl der Bakterien-dispersion bzw. nur das Kulturmedium (Blank, um keine direkte Reduktion des Resazurins durch Bestandteile des Bodens und/oder die Testsubstanz zu erfassen). Anschließend folgte eine Inkubationszeit von 120 Minuten bei 30 °C auf dem Rüttler (100 min⁻¹). Danach wurden in jedes Well 500 µl der Resazurin-Lösung (45 mg/L) pipettiert und die Platten weitere 60 Minuten unter denselben Bedingungen inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zentrifugation der Platten (5 Minuten, 5000 U min⁻¹ bei Raumtemperatur) beendet. Je 3 mal 300 µl-Aliquots wurden in die Wells einer 96-Well Platte überführt. Abschließend wurde die optische Dichte (OD) gemessen.

Die Hemmung der Dehydrogenaseaktivität wurde nach Gl. 1 berechnet:

$$I = 100 - \frac{(OD_{BTS} - OD_{TS})}{(OD_{BNC} - OD_{NC})} \cdot 100 \text{ in \%}$$

wobei

I: Hemmung der Dehydrogenase (%)

OD_{BTS}: optische Dichte der Blanks (d.h. ohne Bakterien) mit Testsubstanz

OD_{TS}: optische Dichte mit Bakterien und Testsubstanz

OB_{BNC}: optische Dichte der Blank-Negativkontrollen (d.h. ohne Testsubstanz) ohne Bakterien

OD_{NC} : optische Dichte der Negativkontrollen mit Bakterien

Der Test wurde auch ohne Boden durchgeführt, um eine Wechselwirkung der AgNP mit dem Boden (Adsorption) zu erfassen. Dazu wurde das Testmaterial in entsprechenden Konzentrationen in deionisiertem Wasser verdünnt und 500 µl jeder Konzentration in die Wells einer 24-Well-Platte überführt.

Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms ToxRat Professional (Version 2.10.05 ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Deutschland, siehe Kap. 2.1.3) durchgeführt.

Validierung:

Abbildung 39 zeigt die gemittelte OD mit und ohne Bakterien. Das entscheidende Validitätskriterium für den Sedimentkontakttest, die Abnahme der OD des Resazurin-Farbstoffes auf 60% ± 10% im Vergleich zur Kontrolle aufgrund seiner Metabolisierung in Anwesenheit der Bakterien im Vergleich zur Kontrolle ohne Bakterien, ist erfüllt. Die Messung der OD wurde sowohl direkt als auch drei Stunden nach Beendigung des Tests durchgeführt. Der Vergleich zwischen den Ergebnissen zeigt, dass durch den Zentrifugationsschritt und Überfüh-

rung des Überstandes in eine anderes Well sichergestellt wird, dass die Messung der OD nicht durch Bakterien und/oder Boden gestört wird und eine weitere Metabolisierung des Resazurins ausgeschlossen ist.

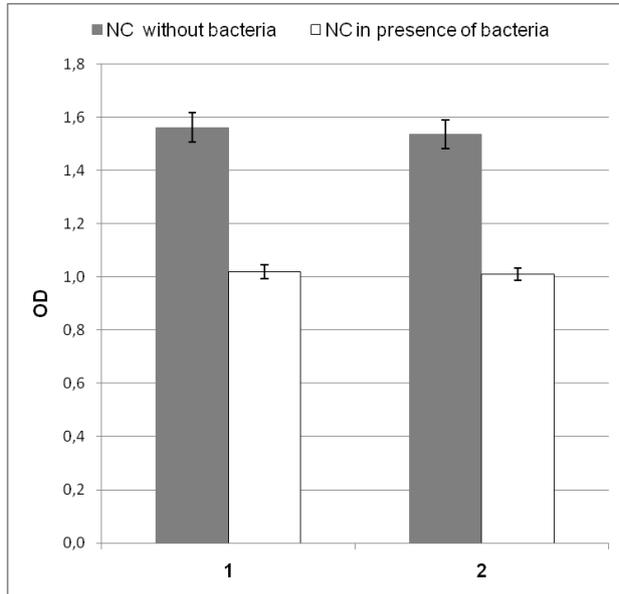


Abbildung 39: Abnahme der optischen Dichte (OD; $\lambda=620\text{nm}$) durch die Metabolisierung des Resazurins durch *Arthrobacter globiformis* (□) im Vergleich zur Kontrolle ohne Bakterien (■). Die Messung der OD erfolgte entweder (1) direkt nach der Inkubation und Zentrifugation der 24-Well-Platten oder (2) nachdem die Platten für ca. drei Stunden im Dunkeln bei Zimmertemperatur gelagert waren.

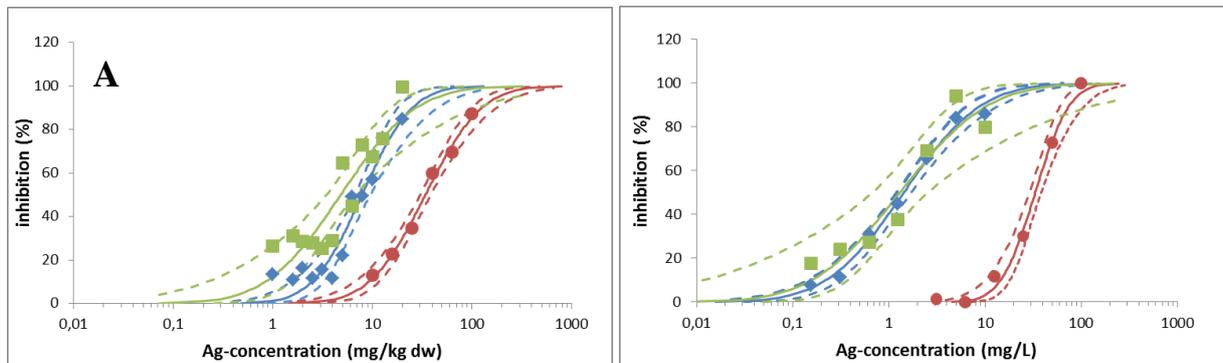


Abbildung 40: Dosis-Wirkungskurven für den Sedimentkontakttest mit (A) und ohne Boden (B) in Anwesenheit der NM300K (●) und $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ (■) oder AgNO_3 (◆).

Abbildung 40 A und B zeigen die ermittelten Dosis-Wirkungskurven für den Sedimentkontakttest für NM300K, $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ und AgNO_3 mit (A) und ohne Boden (B). In Abbildung 41 sind die daraus resultierenden EC_{50} -Werte für NM300K, $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ und für AgNO_3 zusammengefasst. Während die Dosis-Wirkungskurven und die EC_{50} -Werte für AgNO_3 und $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ vergleichbar sind, liegt der EC_{50} für NM300K um eine Größenordnung höher. Die Anwesen-

heit des Dispersionsmittels und TiO_2 –Trägerpartikel allein hatten keinen Effekt auf die Vitalität der Bakterien (nicht dargestellt).

Die Ergebnisse sind zur Veröffentlichung eingereicht (Engelke et al. 2013, submitted).

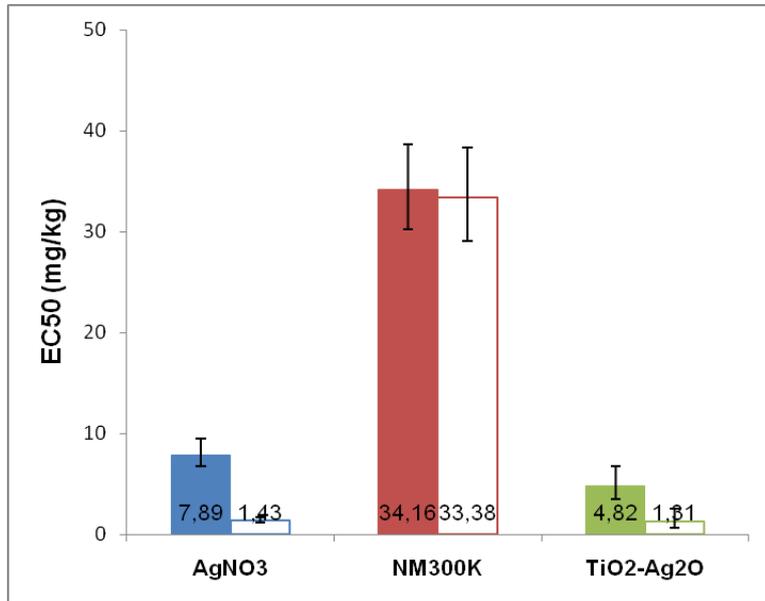


Abbildung 41: Im Sediment-Kontakttest ermittelte EC₅₀-Werte (mg/L) für AgNO₃ (■□), NM300K (■□) und TiO₂/Ag₂O (■□), mit (gefüllte Symbole) und ohne (offene Symbole) Boden. (3 runs mit je 3 Replikaten).

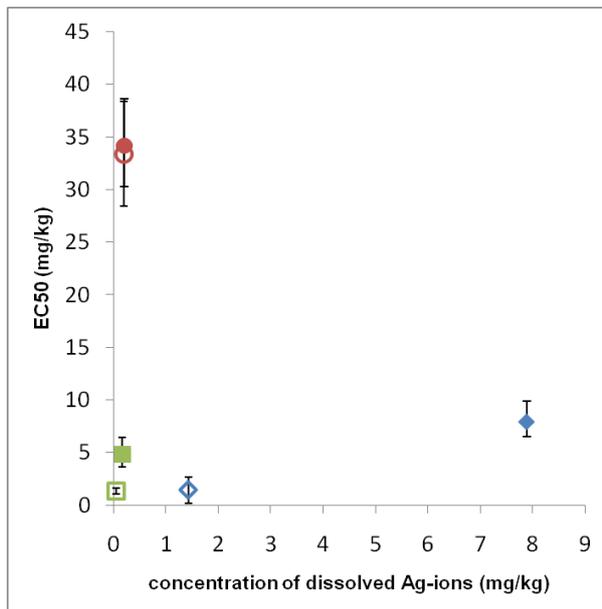


Abbildung 42: Im Algen-Wachstums-Inhibitionstest ermittelte EC₅₀-Werte (mg/L) für AgNO₃ (◆◇), NM300K (●○) und TiO₂/Ag₂O (■□) in Beziehung zur extrapolierten Konzentration der Ag⁺, mit (gefüllte Symbole) und ohne (offene Symbole) Boden.

Es war ein weiteres Ziel zu unterscheiden, ob die Unterschiede der EC₅₀-Werte der untersuchten AgNP auf den Anteil der gelösten Ag⁺ oder auf spezifische Partikeleigenschaften

zurückzuführen waren. Deshalb wurden die experimentell ermittelten EC_{50} -Werte zu den wie unter 2.1.2 dargestellten relativen gelösten Ag-Anteilen in Beziehung gesetzt.

Der relative Anteil gelöster Ag^+ betrug $0,78\% \pm 0,13\%$ für NM-300K und $4,5\% \pm 0,1\%$ für TiO_2/Ag_2O . Abbildung 42 zeigt den Zusammenhang zwischen den experimentell ermittelten EC_{50} -Werten und den extrapolierten Konzentrationen gelöster Ag^+ im Testmedium für beide AgNP und $AgNO_3$. Die Ag-Konzentrationen gelöster Ag^+ , die zu einer 50%-Hemmung der Dehydrogenaseaktivität führten, waren für NM300K und TiO_2/Ag_2O in der gleichen Größenordnung, sowohl mit als auch ohne Boden. Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die toxischen Effekte proportional zur Aktivität der Ag^+ sind, die von den AgNP in das Medium freigesetzt wurden. Im Gegensatz dazu war die $AgNO_3$ -Konzentration, die zu einer 50%-Hemmung führte, in Anwesenheit des Bodens um eine Größenordnung höher. Möglicherweise ist die geringere Toxizität des $AgNO_3$ in Anwesenheit vom Boden darauf zurückzuführen, dass freie Ag^+ eine hohe Affinität zu organischem Material haben und dass dadurch ihre Bioverfügbarkeit herabgesetzt ist (Benoit et al. 2013). Eine weitere Hypothese beinhaltet, dass ein direkter Kontakt zwischen Partikeln und Zellen die antibakterielle Aktivität der AgNP erhöht (Fabrega et al. 2011). Neue Ergebnisse weisen darauf hin, dass die antibakterielle Wirkung allein auf der effektiven Konzentration der Ag^+ innerhalb der Zellen beruht (Bondarenko et al. 2013). Diese ist nicht allein von der extrazellulären Löslichkeit der Ag^+ , sondern der Löslichkeit auf der Partikel-Oberfläche abhängig, die ihrerseits auf einen direkten Zell-Partikel Kontakt zurückzuführen ist (Bondarenko et al. 2013). Diese „short-distance“-Effekte werden durch zusätzliche Freisetzung von Ag^+ von der Oberfläche der AgNP in der Nähe der Bakterienmembran begründet. Der direkte Kontakt mit der Oberfläche der Bakterien (und Zellen generell) führt zu einer erhöhten lokalen Ag^+ -Konzentration, die zusätzliche Schädigung der Bakterienmembran induziert und weitere Sekundäreffekte durch Ag^+ wie die Akkumulation von intrazellulären ROS (reaktive Sauerstoffspezies) und Inaktivierung von Biomolekülen hervorruft (Fabrega et al. 2009; 2011).

Collembolen-Reproduktionstest mit *Folsomia candida* (OECD Richtlinie 232), miniaturisierte Form)

Methodenentwicklung:

Der Collembolen-Reproduktionstest mit *Folsomia candida* (OECD TG 232) wurde miniaturisiert (Filser et al. 2013). Hierzu wurden sowohl die Bodenmenge (30, 20 und 10g Trockenboden) als auch die Zahl der eingesetzten Tiere (10, 7 und 5 Tiere) systematisch variiert. Die Größe der Versuchsgefäße wurde der Bodenmenge angepasst. Gearbeitet wurde mit unbehandeltem Lufa 2.2-Boden. Die Validität des miniaturisierten Tests wurde anhand der toxikologischen Endpunkte Mortalität und Reproduktion sowie anhand der Streuung der einzelnen

Replikate überprüft. Das miniaturisierte Testsystem mit 10 g Boden und 5 Tieren erfüllte alle Validitätskriterien.

In Abbildung 43 sind die Ergebnisse des miniaturisierten und des Standard-Testsystems zur Hemmung der Collembolen-Reproduktion in Anwesenheit steigender Konzentrationen der NM300K Silberpartikel dargestellt. Tendenziell zeigen beide Testsysteme eine Abnahme in der Reproduktion in Abhängigkeit von der Konzentration. Das Dispersionsmittel allein hatte keinen Einfluss auf die Reproduktion. Alle im Folgenden dargestellten Ergebnisse zum Collembolen-Reproduktionstest wurden mit der miniaturisierten Variante des Testsystems durchgeführt.

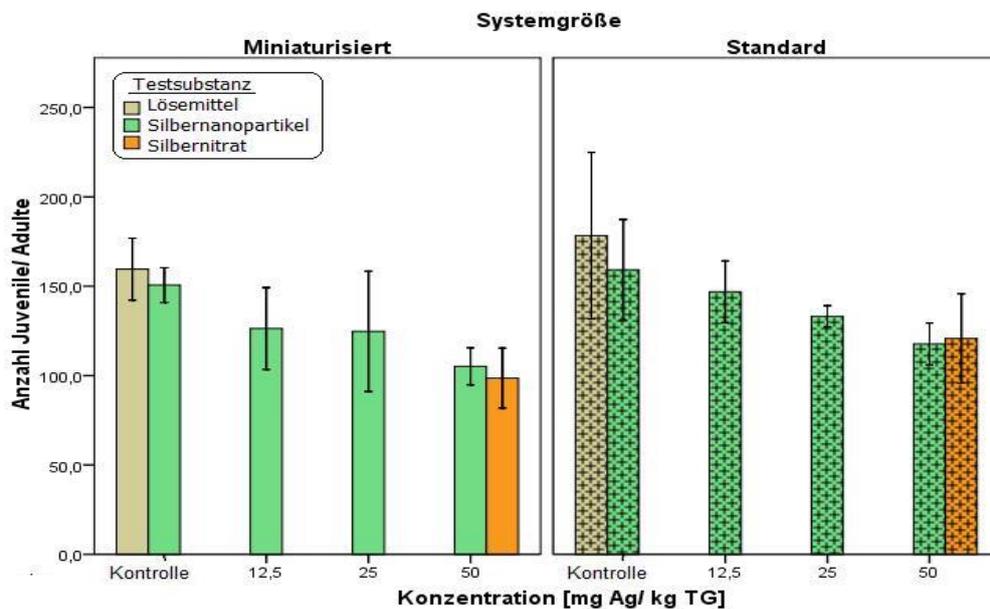


Abbildung 43: Reproduktion von *F. candida* nach 28 Tagen Laufzeit mit den Testsubstanzen NM300K, dem Dispersionsmittel (NM300Kdisp) und der Referenzsubstanz AgNO_3 ($\text{MW} \pm \text{SE}$, $n = 5$); Vergleich von miniaturisierten und Standard-Tests.

Bodenbeaufschlagung:

Es wurden zwei Methoden der Boden-Dotierung mit den Testsubstanzen verglichen: A) die Bodenbeaufschlagung mit zunehmend verdünnter AgNP-Testlösung und B) die Bodenbeaufschlagung durch Vermischung des Bodens mit der höchsten Konzentration der AgNP und weitere Verdünnung durch Mischen des in der höchsten Konzentration mit AgNP-dotierten Bodens mit nicht-kontaminiertem Boden. Jeder Test wurde mit je fünf Replikaten jeder Konzentration durchgeführt. 50 mg Ag/L AgNO_3 diente in allen Versuchen als Referenzstandard. Für das höchste eingesetzte Volumen an NM300K-Standarddispersion wurde zur Kontrolle ebenfalls der Einfluss des Dispersionsmittels der NM300K (NM300Kdisp) ermittelt.

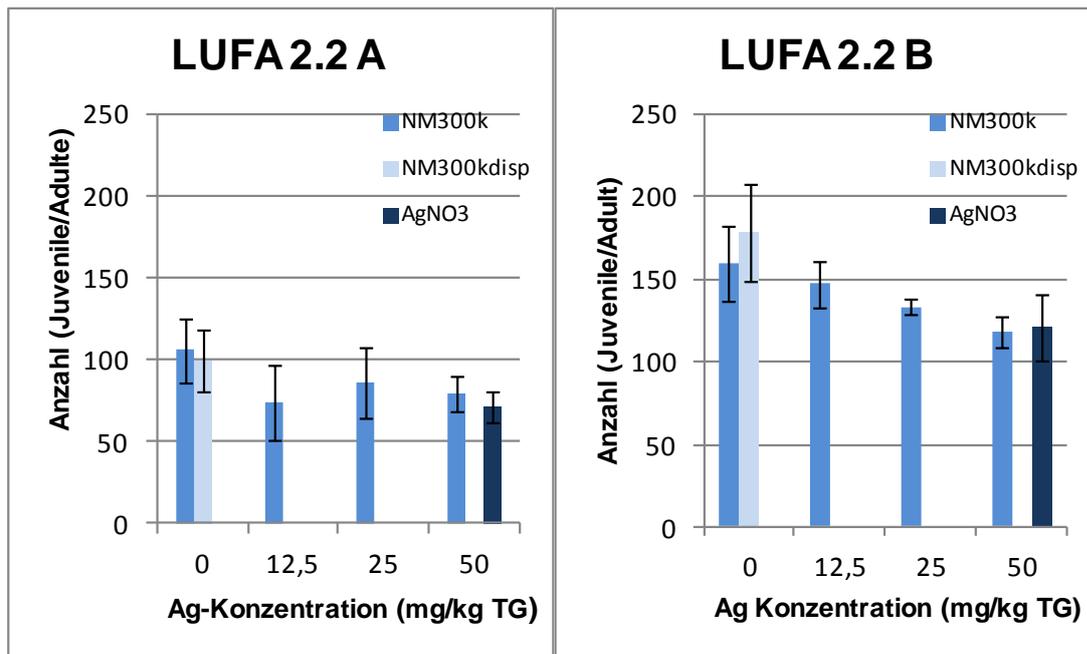


Abbildung 44: Einfluss der NM300K-Silbernanopartikel, des Dispersionsmedium (NM300kdisp) und des Referenzstandards (AgNO₃) auf die Reproduktion von *F. candida* nach 28 Tagen Laufzeit. A) Bodenbeaufschlagung durch Vermischung von mit NM300K-kontaminiertem und nicht-kontaminiertem Boden und B) Bodenbeaufschlagung mit steigender Verdünnung der Testlösung.

Beide Varianten der Boden-Dotierung mit NM300K lieferten valide Ergebnisse entsprechend den Validitätskriterien (OECD 232). Allerdings waren die Collembolen in der Variante B (Verdünnung der Testlösung) wesentlich reproduktionsfreudiger als in Variante A (Abbildung 44 A und B). In Variante B war eine konzentrationsabhängige Wirkung zu beobachten, und die Werte wiesen eine niedrigere Streuung auf. Deshalb wurde in den nachfolgenden Tests die Variante B verwendet.

Vergleich LUFA 2.2 Boden und RefeSol 01A:

Alle bisher vorgestellten Tests wurden mit dem LUFA 2.2-Boden durchgeführt. Der Test wurde mit dem Boden Refesol 01A wiederholt, da dieser als Standard für alle terrestrischen Testsysteme innerhalb des UMSICHT-Projektes gewählt wurde (siehe auch Sediment-Kontakttest).

Im LUFA-Boden wirkte NM300K in allen getesteten Konzentrationen ähnlich wie AgNO₃ in der höchsten Konzentration (Reduktion der Reproduktion um ca. 20%). Eine konzentrationsabhängige Wirkung war nicht festzustellen. Im Refesol 01A war das Muster ähnlich, jedoch wirkten hier die AgNP in allen Konzentrationen stärker toxisch als AgNO₃ in der höchsten Konzentration. Bei 25 mg Ag/kg TM Boden reduzierte NM300K die Reproduktion um gut 60% (Abbildung 45).

Die Abbildungen 44 und 45 zeigen, dass das Dispersionsmittel in beiden getesteten Böden und beiden Beaufschlagungsvarianten keine toxische Wirkung auf die Reproduktion von *F. candida* hat.

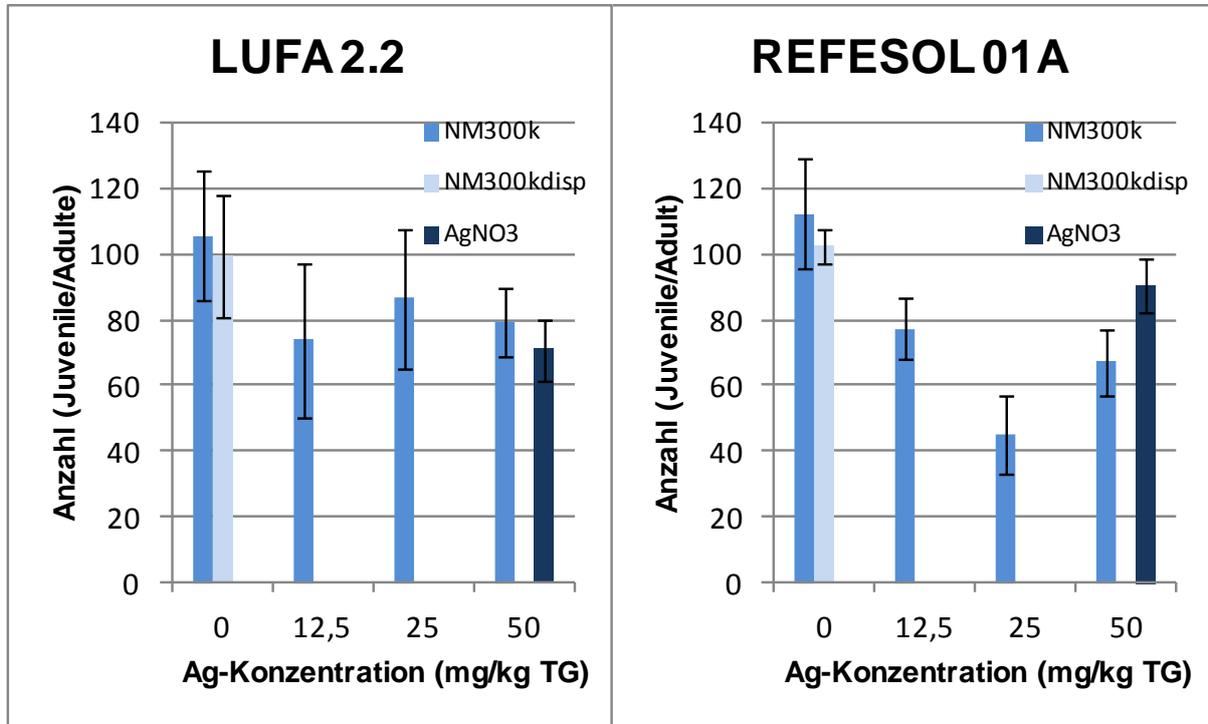


Abbildung 45: Einfluss der NM300K Silbernanopartikel, des Dispersionsmediums (NM300kdisp) und des Referenzstandards (AgNO_3) auf die Reproduktion von *F. candida* nach 28 Tagen in LUFA 2.2 und im Refesol 01A Boden. Die Bodenbeaufschlagung erfolgte durch Vermischung von mit NM300K-kontaminiertem und nicht-kontaminiertem Boden.

Vergleich NM300K und $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$:

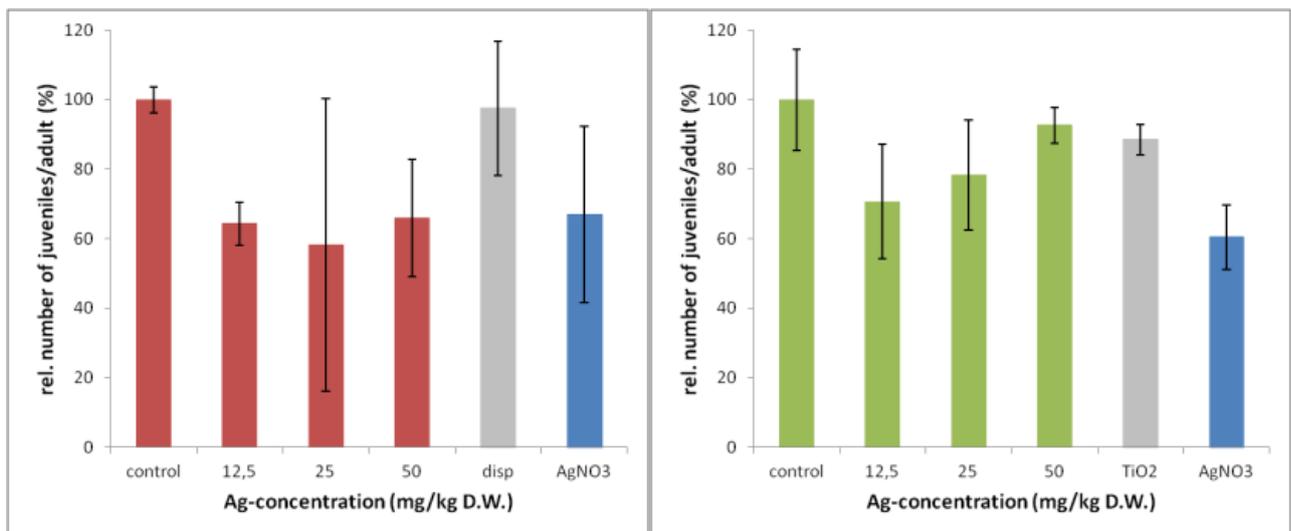


Abbildung 46: Durch NM300K (■) und $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ (■) induzierte Abnahme der Reproduktionsrate im Collembolen-Test. 50 mg/kg Trockengewicht AgNO_3 (■) diente als Positivkontrolle, das Dispersionsmittel der NM300K und die TiO_2 -Partikel entsprechend als Negativkontrollen (■).

Neben NM300K AgNP wurde $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ im Collembolen-Reproduktionstest untersucht. Wie NM300K führte auch $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ zu einer Abnahme der mittleren Reproduktionsrate (Abbildung 46), allerdings sind auch hier die Standardabweichungen hoch, und es lässt sich kein Zusammenhang zwischen der Zunahme der Konzentration und der Reproduktionsrate herstellen. Weder für NM300K noch durch $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ konnten EC_{50} -Werte ermittelt werden, bzw. der EC_{50} -Wert war mit > 50 mg/kg Trockengewicht für beide AgNP sehr hoch.

Langzeiteffekte von NM300K im Boden auf Bodenorganismen

Neben der unmittelbaren Beeinflussung der Vitalität der Bakterien und der Reproduktion der Collembolen durch die verschiedenen Ag-Spezies wurde die Wirkung von NM300K und AgNO_3 im Rahmen der Simulation des Kläranlagenpfades (siehe Zwischenberichte des Verbundpartners vom Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, IME) untersucht. Ziel war es zu klären, ob an Belebtschlamm adsorbierte AgNP bei landwirtschaftlicher Verwertung von Belebtschlamm langfristig eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der Bodenmikroflora und -fauna entfalten. Dies würde darauf hindeuten, dass toxische Silberspezies im Zuge des Belebtschlammabbaus freigesetzt werden.

Die Dotierung des Belebtschlammes erfolgte über zwei verschiedene Ansätze:

- LV1 Verwendung von Belebtschlamm aus der Laborkläranlage, der über einen längeren Zeitraum AgNP bzw. Silbernitrat über synthetisches Abwasser zugeführt wurde. Die NM300K-Konzentrationen betragen dabei 0,4 / 4,0 / 8,2 / 16,4 (mg Ag/kg TM Boden). Als Kontrolle diente Boden + Belebtschlamm (K+B), der nicht mit NM300K dotiert war. Ein weiterer Boden war mit 4,0 (mg Ag/kg TM Boden) AgNO_3 dotiert.
- LV2 Einmaliges Spiken von aus der regionalem Kläranlage frisch geholtem Belebtschlamm mit AgNP bzw. Silbernitrat. Die Konzentrationen betragen hier entweder 2,5 oder 6 mg Ag/kg TM Boden sowohl für NM300K als auch für AgNO_3 . Als Kontrolle diente Boden + Belebtschlamm (K+B), der nicht mit NM300K dotiert war

Alle Lagerversuche (LV1 und LV2) wurden über insgesamt 140 Tage durchgeführt. Die Proben der gelagerten Böden aus LV1 und LV2 wurden nach 32, 60, 100 und 140 Tagen Lagerzeit vom Partner IME an den Partner ÖKO/Universität Bremen geschickt und dort sowohl im *Arthrobacter*-Sedimentkontakttest als auch im *Collembolen*-Reproduktionstest in Hinblick auf ihre hemmende Wirkung im Vergleich zu Kontrollboden (K+B) und Boden ohne Belebtschlamm untersucht.

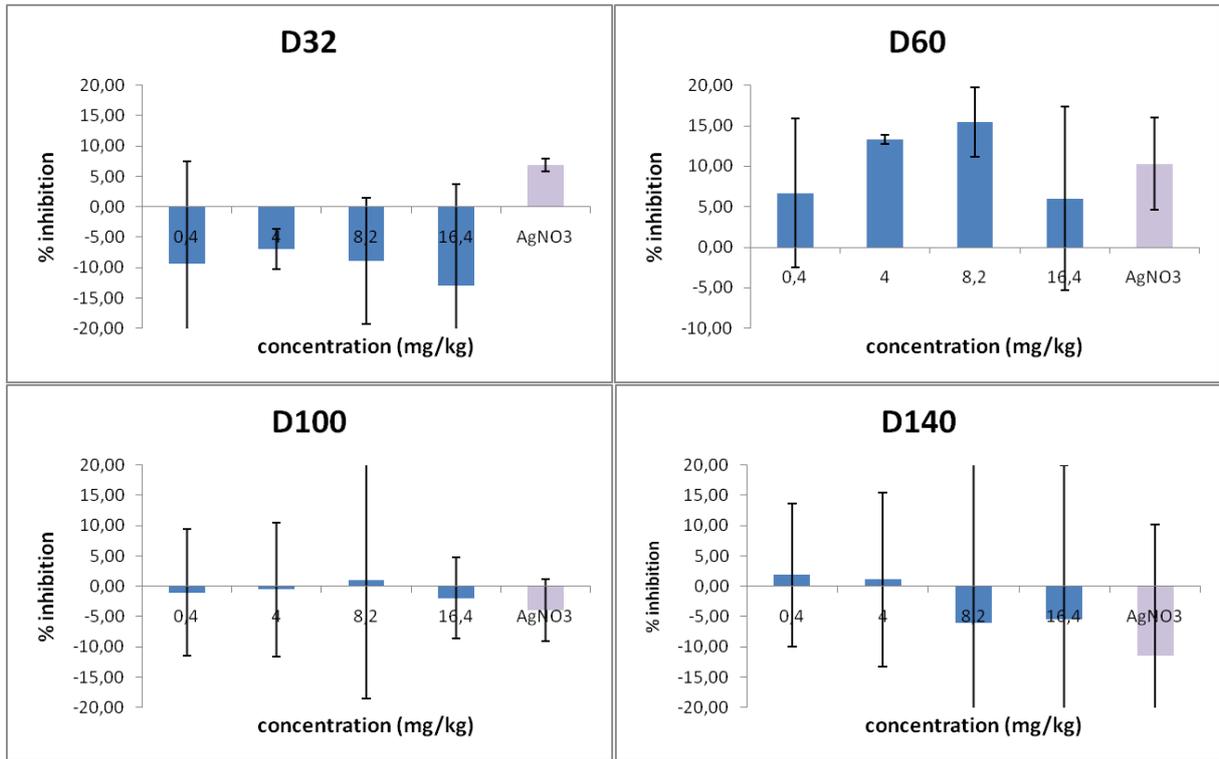


Abbildung 47: Hemmung der Dehydrogenase-Aktivität in Anwesenheit steigender NM300K-Konzentrationen im Boden aus Lagerversuch LV1.

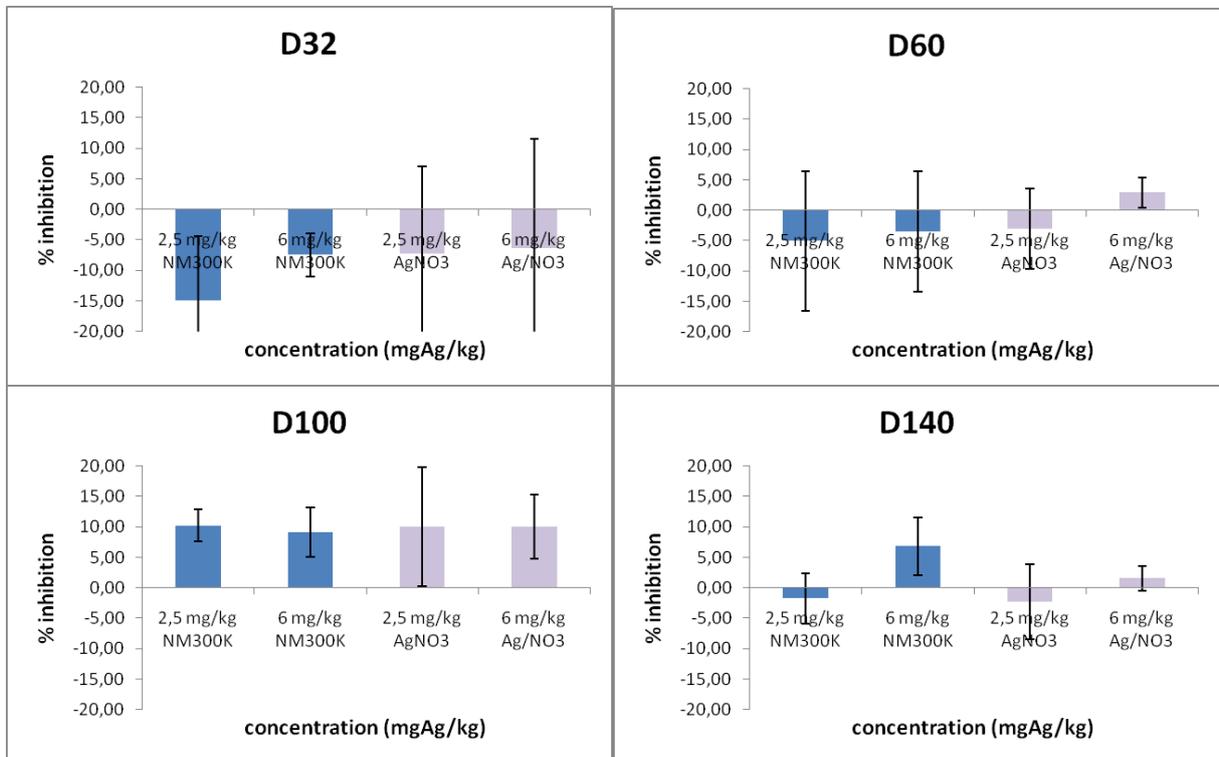


Abbildung 48: Hemmung der Dehydrogenase-Aktivität in Anwesenheit steigender NM300K -Konzentrationen im Boden aus Lagerversuch LV2. D = Lagerzeit in Tagen.

Sowohl der Collembolen-Reproduktionstest als auch der Sediment-Kontakttest wurden in der oben vorgestellten miniaturisierten Form durchgeführt. Wie Abbildung 47 und Abbildung 48 zeigen, übten innerhalb des betrachteten Lagerzeitraums von 140 Tagen weder NM300K noch AgNO_3 einen signifikanten, von der Lagerzeit abhängigen Einfluss auf die Vitalität der Bakterien aus.

Im Collembolen-Reproduktionstest wurden aus den oben genannten Lagerversuchen LV1 der mit einer NM300K-Konzentrationen von 16,4 (mg Ag/kg TM Boden) und der mit 4,0 (mg Ag/kg TM Boden) AgNO_3 dotierte Böden untersucht. Aus Lagerversuch LV2 wurden die mit 6 mg Ag/kg TM Boden NM300K und AgNO_3 dotierten Böden ausgewählt.

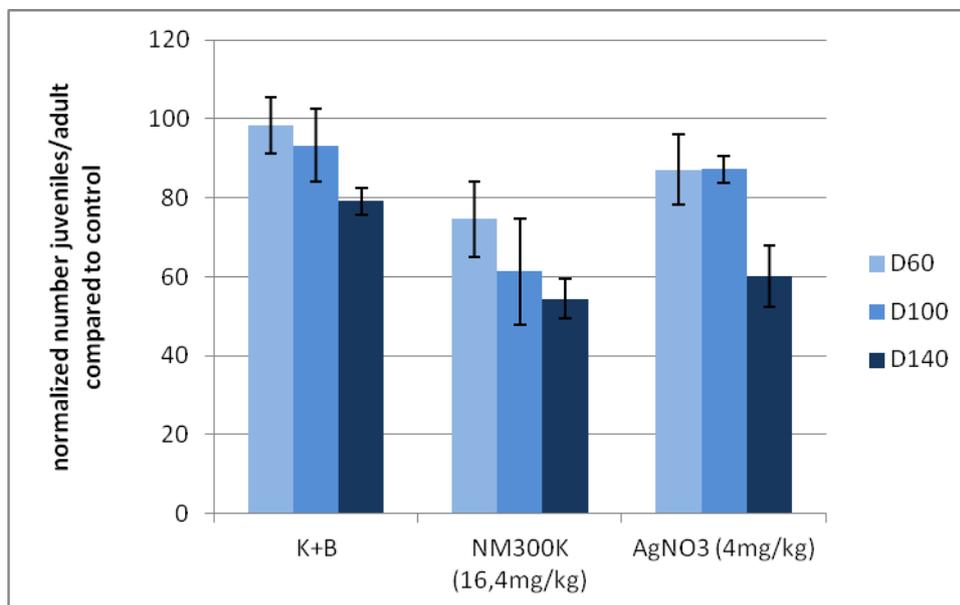


Abbildung 49: Hemmung der Reproduktionsrate in LV1 für die Kontrollen (K+B; Boden plus Belebtschlamm ohne AgNP), die mit 16,4 mg Ag/kg TM NM300K und die mit 4 mg Ag/kg dotierten Böden für die Lagerzeiträume von 60, 100 und 140 Tagen. Die Daten sind normiert auf den Boden ohne Belebtschlamm.

In Abbildung 49 sind die Ergebnisse zu LV1 für die Kontrollen (Boden plus Belebtschlamm ohne AgNP), die mit 16,4 mg Ag/kg TM NM300K und die mit 4 mg Ag/kg dotierten Böden für die Lagerzeiträume von 60, 100 und 140 Tagen zusammengefasst. Die Anzahl der Juvenilen wurde auf die jeweilige Anzahl Juveniler in den Kontrollen (Boden ohne Belebtschlamm) normiert. Die Ergebnisse zeigen, dass allein die Beaufschlagung des Bodens mit Belebtschlamm (K+B) zu einer Hemmung der Reproduktion führte. AgNO_3 führte erst nach 140 Tagen Lagerung zu einer signifikanten Reduktion im Vergleich zur Kontrolle (K+B). Dagegen war die Reproduktion für 16,4 mg Ag/kg TM NM300K für alle drei Lagerungszeiträume signifikant reduziert (der Boden für den Lagerungszeitraum D32 in LV1 war am Ende verschimmelt und die Tiere verendet, so dass die Ergebnisse nicht verwendet werden konnten).

Diese Ergebnisse zur Hemmung der Reproduktion in LV1 wurden durch die Ergebnisse aus Lagerversuch 2 (LV2, Abbildung 50) bestätigt. Insbesondere NM300K (6 mg Ag/kg TM) führte zu einer Hemmung, die abhängig von der Lagerzeit war.

Die in LV1 beobachtete Hemmung der Reproduktion durch Beaufschlagung des Bodens allein mit Belebtschlamm ohne Silber lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass hier Belebtschlamm aus der Laborkläranlage, in LV2 aber frischer Klärschlamm aus der regionalen Kläranlage verwendet wurde.

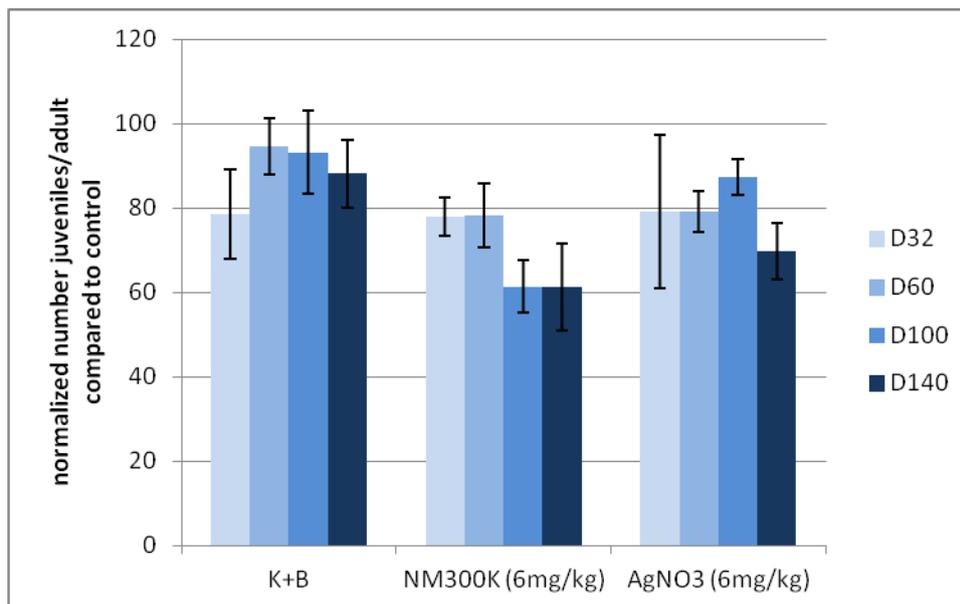


Abbildung 50: Hemmung der Reproduktionsrate in LV2 für die Kontrollen (K+B; Boden plus Belebtschlamm ohne AgNP), die mit 16,4 mg Ag/kg TM NM300K und die mit 4 mg Ag/kg dotierten Böden für die Lagerzeiträume von 60, 100 und 140 Tagen. Die Daten sind normiert auf den Boden ohne Belebtschlamm.

Der Sedimentkontakttest mit Bakterien hat gezeigt, dass die Anwesenheit von Boden die toxische Schwelle der leicht löslichen Silberverbindungen (AgNO_3 und $\text{TiO}_2\text{-AgNP}$) erheblich nach oben verschiebt (Abbildung 41), also die Bioverfügbarkeit von Ag^+ verringert. Für NM300K war das jedoch nicht der Fall: mit oder ohne Boden scheinen diese Partikel deutlich weniger toxisch.

Wie irreführend die Risikoabschätzung mit diesem Kurzzeittest sein kann, ist aus den Langzeitversuchen mit Collembolen ersichtlich: erst nach 60 bis 100 Tagen Lagerung (und länger) zeigte sich die toxische Wirkung von NM300K, deren Schwelle nun in der gleichen Größenordnung lag wie die von AgNO_3 (Abbildung 49 und 50) und die von AgNO_3 und $\text{TiO}_2\text{-AgNP}$ im Bakterientest.

2.1.5 Arbeitspaket 2.3.2: Erfassung der Wirkung – Aquatische Systeme

Um die toxische Wirkung der verfügbaren AgNP (NM300K, TiO₂/Ag₂O, Gluconat- und Glutathion-gecoatete AgNP) auf aquatische Systeme zu untersuchen, wurden vom Partner ÖKO folgende Testsysteme herangezogen:

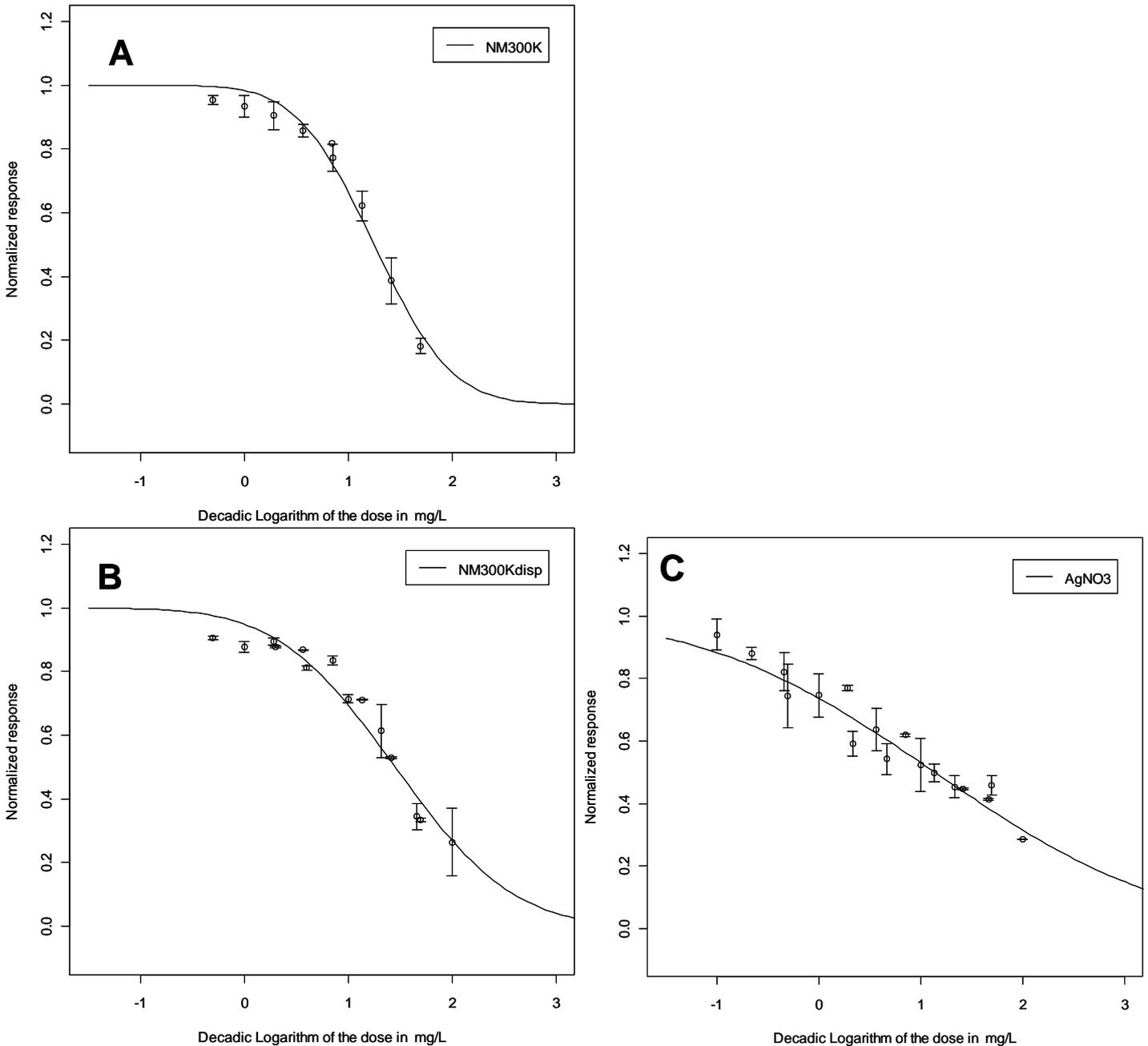
1. Leuchtbakterientest (*Vibrio fischeri*) nach DIN 38412-34,
2. Hemmung des Algenwachstums (*Pseudokirchneriella subcapitata*) nach OECD Richtlinie 201 bzw. DIN EN ISO 8692 (2012) und der Ein-Generationen-Algentoxizitätstest,
3. Hemmung des Wasserlinsenwachstums (*Lemna minor*) nach OECD Richtlinie 221 bzw. DIN EN ISO 20079 (2005), miniaturisiert.

Biotests wie der Leuchtbakterientest oder aquatische Testsysteme mit einzelligen Grünalgen oder Wasserlinsen werden u.a. für Zwecke des Monitorings von Gewässern, phytopharmakologischen Wirkungsanalysen sowie in der prospektiven Beurteilung des aquatischen Toxizitätspotentials von Chemikalien eingesetzt. Für eine Einschätzung einer toxischen Wirkung von AgNP auf Gewässer wurden deshalb die drei o.g. Tests durchgeführt. Um einen möglichst großen Probendurchsatz bei Reduzierung des Abfallvolumens zu erzielen, wurde der konventionelle Test, der die Hemmung des Wasserlinsenwachstums (*Lemna minor*) nach OECD Richtlinie 221 erfasst, miniaturisiert und der 72 h-Algenwachstumshemmtest mit dem Ein-Generationen-Algentoxizitätstest (24 h) verglichen. Zusätzlich wurde Der Daphnientest miniaturisiert (Baumann et al 2013, s.a. Abschnitt 2.6)

Leuchtbakterientest (*Vibrio fischeri*), LCK 482 (DIN EN ISO 11348-2)

Wie Abbildung 51 zeigt, reagieren die Bakterien nicht nur sensitiv auf die Silbernanopartikel, sondern auch auf das Dispersionsmittel. Die entsprechenden EC₅₀-Werte betragen 18 ± 3 mg Ag/L für NM300K, 28,6 ± 0,9 mg/L für das Dispersionsmittel der NM300K und 12,72 ± 8,8 mg Ag/L für AgNO₃ als ionische Silber-Referenz. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit gegen das Dispersionsmittel ist der Test nicht anwendbar. Trotzdem zeigt sich hier ebenfalls der Trend, dass das AgNO₃ als lösliches Silbersalz den stärksten Effekt auf die Leuchtintensität der Bakterien zeigt, verglichen mit den NM300K-Silber-Nanopartikeln. Ein Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven der NM300K-Partikel mit dem Dispersionsmittel zeigt ebenfalls, dass es einen Effekt der Silberpartikel gibt, jedoch ist die Höhe dieses Effektes schwer abzuschätzen, da bereits das Dispersionsmittel alleine eine deutliche toxische Wirkung zeigt. Zur besseren Bewertung dieser Effekte müssten Mischungseffekte mit berücksichtigt werden,

was jedoch eine Erfassung der Einzelstofftoxizitäten voraussetzen würde. Ergebnisse zu der Größenverteilung und dem Zetapotential mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) zeigten darüber hinaus, dass die NM300K-Partikel nicht mehr als Nanopartikel (sondern > 600nm) vorliegen und das AgNO_3 ausfällt, was auf die hohe Ionenstärke bzw. die hohe NaCl-



Konzentration (2%) in dem Testmedium für den Leuchtbakterientest zurückzuführen ist.

Abbildung 51: Abnahme der Leuchtintensität von *Vibrio fischeri* als Funktion der Konzentration der NM300K-Partikel (links), des Dispersionsmittels (NM300Kdisp; Mitte) und von AgNO_3 (rechts).

*Hemmung des Algenwachstums (*Pseudokirchneriella subcapitata*) nach OECD Richtlinie 201 bzw. DIN EN ISO 8692 (2012) und dem Ein-Generationen-Algentoxizitätstest*

Für die Erfassung der toxischen Wirkung der AgNP wurde der 72 h-Algenvermehrungshemmtest an- Batch-Kulturen einzelliger Grünalgen (*Pseudokirchneriella subcapitata*) durchgeführt. Alternativ dazu wurde der validierte Ein-Generationen-Algentoxizitätstest (24 h) mit synchronisierten Kulturen der Algen *Scenedesmus vacuolatus* angewandt, bei dem die Wachstumsleistung durch entsprechende Kultivierungsbedingungen maximiert wurde (Altenburger et al. 1990, Faust et al. 1992). Toxikologischer Endpunkt war bei beiden Testdesigns die Hemmung der Algen-Vermehrung. Als Ausleseparameter wurde die Zellzahl mittels Zellcounter ermittelt. In der Regel wurden 8 verschiedene Verdünnungsstufen mit zwei Replikaten pro Durchlauf gemessen.

Es wurden mindestens drei Durchläufe pro Testsubstanz durchgeführt. Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms ToxRat Professional (Version 2.10.05 ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Deutschland) durchgeführt. (siehe auch Kap. 2.1.3).

Die ermittelten EC_{50} -Werte ($\mu\text{g Ag/L}$) für AgNO_3 , NM300K und $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ sind in Abbildung 52 für beide Versuchsbedingungen (72 h-Algenwachstumshemmtest oder Ein-Generationen-Algentoxizitätstest, 24 h) zusammengefasst. Die Mittelwerte der erzielten Ergebnisse beider Testsysteme sind für AgNO_3 und $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ vergleichbar. Für NM300K unterscheiden sie sich in den Mittelwerten, allerdings nicht signifikant.

Wie für die terrestrischen Tests war es ein weiteres Ziel zu unterscheiden, ob die EC_{50} -Werte der untersuchten AgNP auf den Anteil der gelösten Ag^+ oder auf spezifische Partikeleigenschaften zurückzuführen waren. Deshalb wurden die experimentell ermittelten EC_{50} -Werte zu den wie unter 2.1.2 dargestellten relativen gelösten Ag-Anteilen in Beziehung gesetzt.

Der relative Anteil gelöster Ag^+ betrug $0,6\% \pm 0,1\%$ für NM300K und $8,1\% \pm 1,3\%$ für $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ für den 72 h-Algenwachstumshemmtest und $0,8\% \pm 0,1\%$ NM300K im Ein-Generationen-Algentoxizitätstest (24 h). Die gelöste Ag^+ Konzentration für $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ wurde im Medium für den Ein-Generationentest nicht bestimmt, der Wert sollte aber entsprechend leicht höher sein als der Wert im 72 h-Algenwachstumshemmtest. Abbildung 53 zeigt den Zusammenhang zwischen den experimentell ermittelten EC_{50} Werten und den extrapolierten Konzentrationen gelöster Ag^+ im Testmedium für beide AgNP und AgNO_3 . Die Ag-Konzentrationen gelöster Ag^+ , die zu einer 50% Hemmung des Algenwachstums führten, waren für NM300K, $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ und AgNO_3 in der gleichen Größenordnung. Im Gegensatz

dazu lagen die experimentell ermittelten EC_{50} -Werte ohne Berücksichtigung des gelösten bzw. partikulären Ag-Anteils um mehr als eine Größenordnung auseinander.

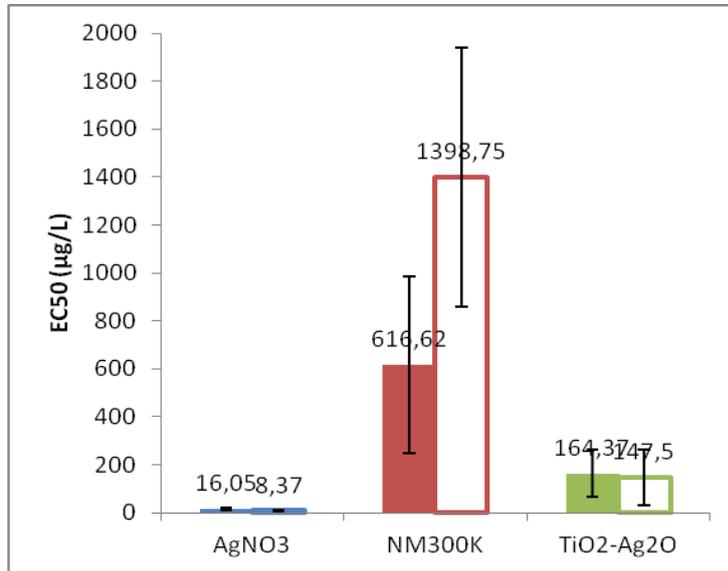


Abbildung 52: Im Algen-Wachstums-Inhibitionstest ermittelte EC_{50} -Werte ($\mu\text{g/L}$) für AgNO_3 (\blacklozenge), NM300K (\bullet) und $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ (\blacksquare). Die EC_{50} -Werte wurden entweder aus dem 72 h Algenwachstumshemmttest (gefüllte Symbole) oder dem Ein-Generationen-Algentoxizitätstest (offene Symbole) ermittelt (mindesten 3 runs mit je 2 Replikaten).

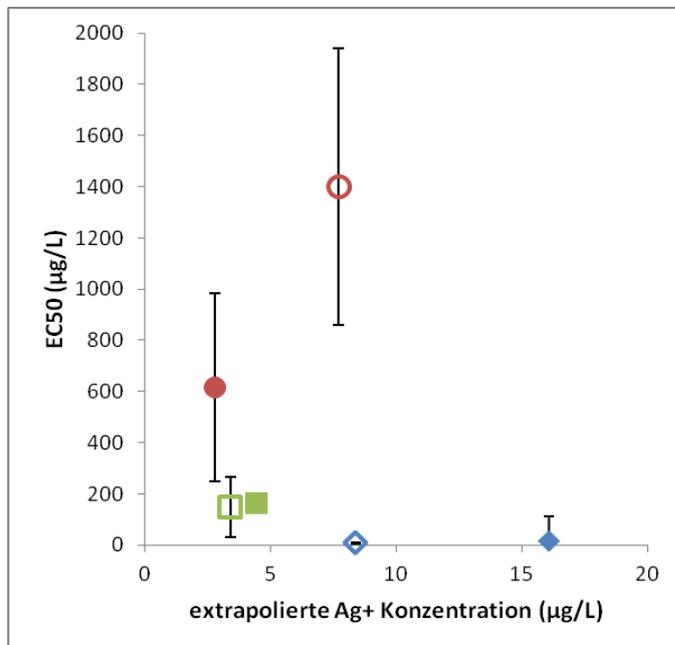


Abbildung 53: Im Algen-Wachstums-Inhibitionstest ermittelte EC_{50} -Werte ($\mu\text{g/L}$) für AgNO_3 (\blacklozenge), NM300K (\bullet) und $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ (\blacksquare) in Beziehung zur extrapolierten Konzentration der Ag^+ . Die EC_{50} -Werte wurden entweder aus dem 72 h Algenwachstumshemmttest (gefüllte Symbole) oder dem Ein-Generationen-Algentoxizitätstest (offene Symbole) ermittelt (mindesten 3 runs mit je 2 Replikaten).

Hemmung des Wasserlinsenwachstums (*Lemna minor*) nach OECD Richtlinie 221 bzw. DIN EN ISO 20079 (2005), miniaturisiert.

Das aquatische Testsystem wurde so miniaturisiert, dass wesentlich kleinere Testvolumina benötigt wurden, da Nanopartikel besonders während ihrer Entwicklung in nur geringen Mengen verfügbar sind. In unserer modifizierten Form wurden Polystyrol-6-Well-Platten verwendet. Diese haben ein Fassungsvermögen von 15 ml/Well, einen flachen Boden und einen Deckel. Anstelle der 100 ml im konventionellen Test war hier das Testvolumen auf 10 ml reduziert; es wurden ca. 3 Fronds in je ein Well überführt. Dieser Test erfüllte die Validitätskriterien (mindesten 8-fache Anzahl an Fronds für die Kontrollen am Ende des Tests nach 168 Stunden) und wurde auch bereits in anderen Arbeitsgruppen erfolgreich validiert (Soukupova and Beklova 2009). Die miniaturisierte Alternative des Lemna-Tests ermöglicht einen größeren Probendurchsatz bei gleichzeitiger Reduzierung des Abfallvolumens auf 10% im Vergleich zum konventionellen Test.

Pro Wiederholung des Tests wurden für jede Verdünnungsstufe 3 Replikate und für die Kontrollen 6 Replikate vorbereitet. Ausleseparameter für das Wachstum der *Lemna* waren sowohl Anzahl der Fronds und die Zunahme der Frondoberfläche am Anfang und am Ende des Tests. Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms ToxRat Professional (Version 2.10.05 ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Deutschland) durchgeführt (siehe auch Kap. 2.1.3).

Die ermittelten EC_{50} -Werte ($\mu\text{g/L}$) für AgNO_3 , NM300K und $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ sind in Abbildung 54 für beide Beobachtungsparameter (Anzahl der Fronds und Frondoberfläche) zusammengefasst.

Wie für die terrestrischen Tests war es ein weiteres Ziel zu unterscheiden, ob die EC_{50} -Werte der untersuchten AgNP auf den Anteil der gelösten Ag^+ oder auf spezifische Partikeleigenschaften zurückzuführen waren. Deshalb wurden die experimentell ermittelten EC_{50} -Werte zu den wie unter 2.1.2 dargestellten relativen gelösten Ag-Anteilen in Beziehung gesetzt.

Der relative Anteil gelöster Ag^+ betrug $4,4\% \pm 0,99\%$ für NM300K und $32,3\% \pm 0,63\%$ für $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$. Abbildung 55 zeigt den Zusammenhang zwischen den experimentell ermittelten EC_{50} -Werten und den extrapolierten Konzentrationen gelöster Ag^+ im Testmedium für beide AgNP und AgNO_3 . Die Ag-Konzentrationen gelöster Ag^+ , die zu einer 50%-Hemmung des *Lemna*-Wachstums führten, waren für NM300K, $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ und AgNO_3 in der gleichen Größenordnung. Im Gegensatz dazu lagen die experimentell ermittelten EC_{50} -Werte ohne Berücksichtigung des gelösten bzw. partikulären Ag-Anteils um mehr als eine Größenordnung auseinander (Abbildung 54).

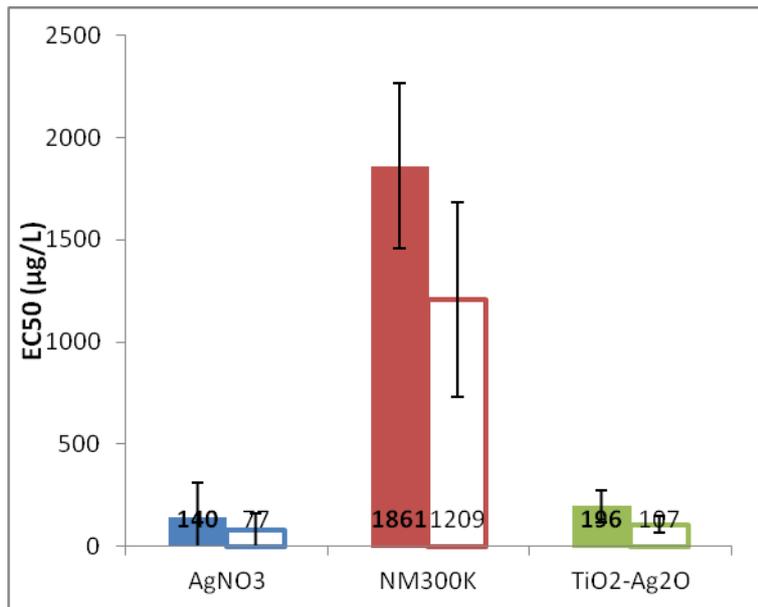


Abbildung 54: Im *Lemna*-Wachstums-Inhibitionstest ermittelte EC₅₀-Werte (µg/L) für AgNO₃, NM300K und TiO₂/Ag₂O. Die EC₅₀-Werte wurden entweder aus dem Ausleseparameter Anzahl der Fronds (gefüllte Symbole) oder der Frondoberfläche (offene Symbole) ermittelt (mindesten 2 runs mit je 3 Replikaten).

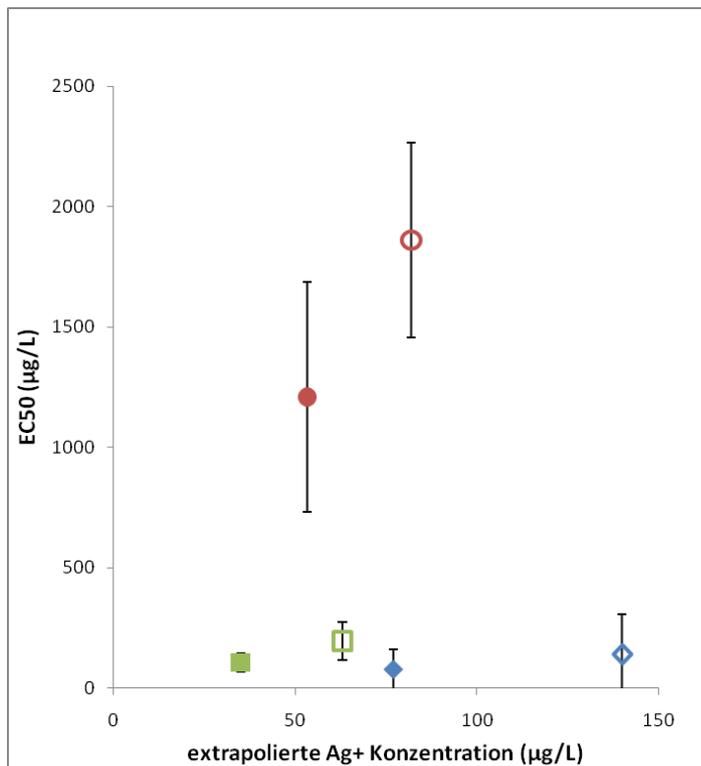


Abbildung 55: Im *Lemna*-Wachstums-Inhibitionstest ermittelte EC₅₀-Werte (µg/L) für AgNO₃ (◆◆), NM300K (●○) und TiO₂/Ag₂O (■□) in Beziehung zur extrapolierten Konzentration der Ag⁺. Die EC₅₀-Werte wurden entweder mittels der Ausleseparameter Anzahl der Fronds (gefüllte Symbole) oder der Frondoberfläche (offene Symbole) ermittelt.

Zusammengefasst zeigen beide aquatischen Testsysteme, dass für die hier verwendeten AgNP allein der Anteil der gelösten Ag^+ die Toxizität bestimmt. So liegen sowohl für das Referenzmaterial NM300K wie auch für $\text{TiO}_2/\text{Ag}_2\text{O}$ die Mengen an gelöstem Silber, die zu einer mittleren Hemmung (EC_{50}) des Algen- bzw. Wasserlinsenwachstums führen, in derselben Größenordnung.

Die Ag-Konzentration der beim Verbundpartner VdW hergestellten Glutathion- bzw. Gluconat-gecoateten Ag-Nanopartikel war mit 4,4 mg/L bzw. 11,7 mg/L zu gering, um einen messbaren Effekt in den aquatischen Testsystemen zu beobachten.

2.1.6 Arbeitspaket 3.1: Lebenszyklusanalyse

Unkenntlich gemachte vertrauliche Daten sind rot markiert

Überblick

In diesem Arbeitspaket sollten am Beispiel der textilen Wertschöpfungskette die möglichen Expositionen von Mensch und Umwelt gegenüber den verschiedenen Silberspezies (AgNP, Silberpartikel > 100 nm, gelöste Silberionen und an verschiedene Matrices gebundene Silberpartikel) ermittelt werden. Es wurden die folgenden Stationen der textilen Kette untersucht: Die Produktion von silberhaltigen Textilfasern und Geweben, der Gebrauch dieser Gewebe (Abnutzung durch Reibung, Waschen, Tragen am Körper) und schließlich die Entsorgungspfade- oder Recyclingpfade. Besonders wurden dabei folgende Punkte betrachtet: (1) Bewertung des Umwelteintragspfades „Verschleiß beim Produktgebrauch“ mittels Stoffflussanalysen, (2) Abschätzung des Einflusses der Verarbeitungsweise von Nanopartikeln auf die Partikelemission in der Müllverbrennungsanlage. Die hier gewonnenen Expositionsdaten gingen in das Arbeitspaket 3.2 zur Risikobewertung ein.

In Abbildung 56 ist der Lebenszyklus von silberhaltigen Textilien schematisch dargestellt. Die hergestellten Textilien werden verkauft und von den Konsumenten angewendet. Beim Gebrauch können Bestandteile der Textilien freigesetzt werden, abhängig von Art des Gebrauchs und den Materialeigenschaften der Textilien. Durch das Tragen von Kleidung entsteht beispielweise Abrieb, der Silber enthält. Durch die Reinigung in der Waschmaschine werden Teile des Silbers ausgewaschen und gelangen ins Abwasser, welches dann in Kläranlagen behandelt wird. In der Kläranlage verteilt sich das Silber auf die wässrige Phase, welche über das Nachklärbecken in Oberflächengewässer gelangt, und auf den Klärschlamm, in dem das Silber sorbiert an die Klärschlammpartikel vorliegt. Der Klärschlamm wird zum Teil auf Ackerflächen ausgebracht. Das im Klärschlamm enthaltene Silber kann dann in Abhängigkeit von den vorliegenden Bedingungen (und der vorliegenden Silberform)

im Boden transportiert werden und wieder in Oberflächengewässer gelangen. Ein Teil des Silbers gelangt über den Entsorgungspfad über Haushaltsmüll bis zur Deponie oder in die Müllverbrennung. Für die Abschätzung der Verteilung des Silbers während des Lebenszyklus wurde der Arbeit von Blaser et al. (2008) gefolgt. Diese Abschätzung konzentrierte sich dabei auf die Bedingungen, die in Deutschland vorliegen, wobei z.B. Produktionsmengen und Gebrauchsmengen aus Daten, die für den globalen Markt vorliegen, auf Deutschland umgerechnet wurden. Dies geschah basierend auf den Bevölkerungszahlen.

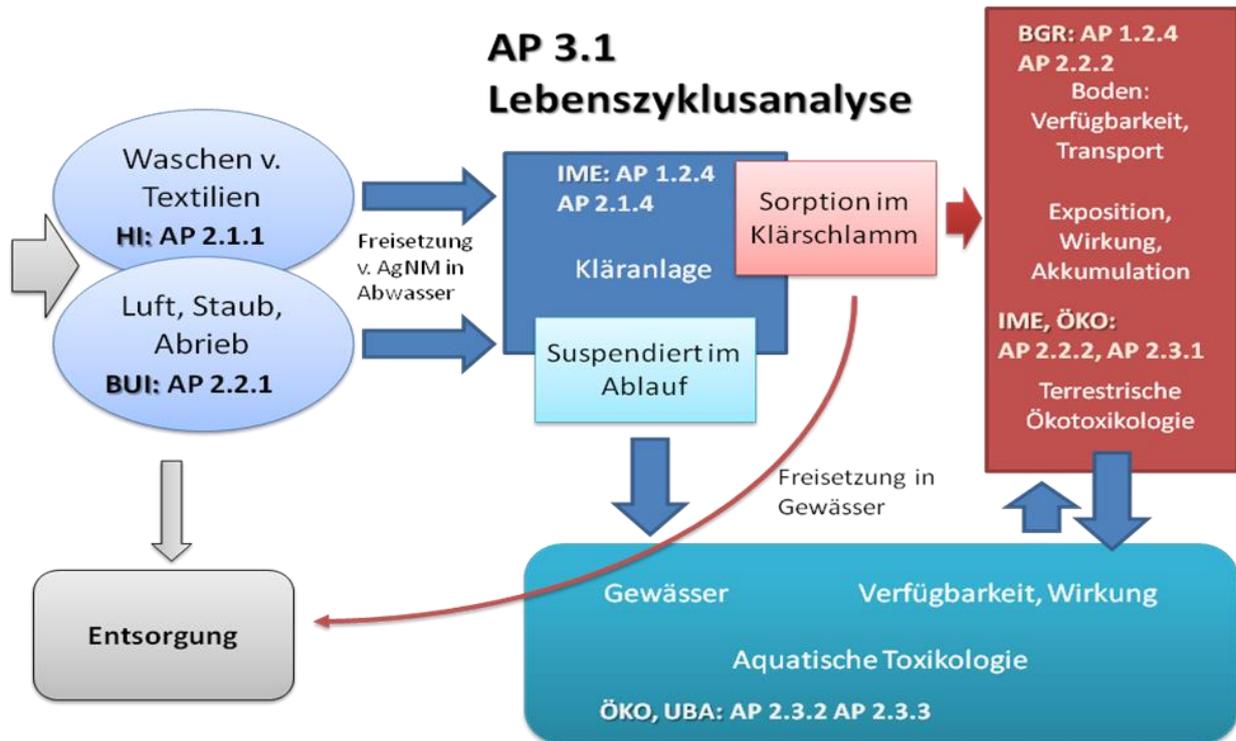


Abbildung 56: Schema der Stationen des Lebenszyklus von Silber aus Textilprodukten von der Herstellung angefangen (oben links) bis zur Freisetzung von Silber in den Boden und in Oberflächengewässer.

Herstellungsmengen

Der Projektpartner RAS stellt die Silbernanopartikel AgPure (NM300K) her, die z.B. eingebracht in Polyester-Fasern als Rohmaterial zur Herstellung von Textilien dienen. Die Konzentrationen an Silbernanopartikeln in den fertigen Textilprodukten variieren je nach Hersteller von **XXX** Ag/kg Textil. Die von RAS beabsichtigte Produktionsmenge an AgPure für das Jahr 2013 wird auf **XXX** Ag eingeschätzt. Die beabsichtigte biozide Wirkung durch die Freisetzung von Silberionen kann auch durch die Verwendung von Silberchlorid im Textil erreicht werden. Der Projektpartner CHT gibt für die Jahresproduktion eines Herstellers von Silberchlorid für Textilien (iSys AG) für Deutschland die Menge von 136 kg Ag an. Für die EU

werden von diesem Hersteller 319 kg Ag als Silberchlorid hergestellt. Für den Weltmarkt sind es 352 kg Ag (ebenfalls als Silberchlorid). Eine vertrauliche mündliche Auskunft (über RAS) für den EU-Markt von 2006 gibt die Verwendung von **XXX** Ag in nanopartikulärer Form für antimikrobielle Anwendungen an (proportionaler Anteil nach der Bevölkerung von D wäre 1302 kg).

Die Abschätzung von Windler et al. (2013) für den Anteil an biozidem Silber am globalen Markt ist 0,1% - 0,5%. Die top-down Abschätzung von Burkhardt et al. (2011) kommt auf 0,2%. Windler et al. (2013) geben 68% als Nutzung von biozidem Silber für Wasserbehandlung an und 32% für andere Zwecke. Als konservative Annahme für die Nutzung im Textilbereich wird dann dieser Wert von 32% übernommen. Nach Burkhardt et al (2011) schlüsselt sich die Silberverwendung im Textilbereich auf in 79% als Silbersalze, 13% als metallisches Silber und 8% als Silberionentauscher. Die konservative Annahme von 13% Anteil von Silbernanopartikeln wird von Windler et al. (2013) gemacht. Übertragen auf den weltweiten Silberbedarf des Jahres 2012 von 32.604 t (SilverInstitute 2013) ergeben sich 65 t/a (mit der Annahme 0,2% für biozide Verwendung) für die weltweite biozide Verwendung von Silber und 21 t/a als weltweite Verwendung von Silber in Textilien. Der weltweite Anteil von Silbernanopartikeln im Textilbereich ist dann 2,7 t/a. Dies entspricht gut 10% der globalen Produktion von Nanosilber, die von der EU-Kommission mit ca. 20 t/a beziffert wird (European Commission, 2ndRegRevNanoMat 2012).

Für den europäischen Markt können die Mengen über die Bevölkerungszahlen der industrialisierten Welt abgeschätzt werden, wenn man Burkhardt et al (2011) folgt. Die Bevölkerungszahlen sind dabei Wikipedia entnommen (<http://en.wikipedia.org/wiki/Usa>, ...). Als industrialisierte Welt wird dabei die Bevölkerung der EU & Schweiz, USA, Kanada, Japan, 1/10 von China und Südkorea angenommen. Die abgeschätzten Daten für Europa sind dann 28,1 t/a biozide Verwendung von Silber, 9 t/a Silberverwendung für Textilien. Die Verwendung von Silbernanopartikeln in Textilien wäre dann 1,2 t/a.

Für Deutschland ist die abgeschätzte Verwendung von Silbernanopartikeln in Textilien diesen Annahmen folgend 190 kg/a. Dieser Wert wird für das realistische Szenario verwendet. Ein mittleres Szenario nimmt 600 kg Ag/a an und für das worst-case-Szenario wird 1.500 kg Ag/a angenommen, welches ungefähr der Menge an Silber entspricht, die in Deutschland für Textilien eingesetzt wird.

Andere Silberquellen

Um die Auswirkung der Nutzung von Silbernanopartikeln in Textilien auf die Umweltkonzentrationen von Silber zu bewerten, müssen die anderen Silberquellen (OS) und die schon vorhandene Konzentration des Silbers in der Umwelt berücksichtigt werden. Folgende Abschätzungen der Umweltkonzentrationen von Silber konnten dem Dokument des SCENIHR (2013)

entnommen werden. Die Umweltkonzentration von Silber im Oberflächenwasser, welches von menschlichen Aktivitäten beeinflusst wird, liegt im Bereich von 1 – 10 ng Ag/L (Wen et al. 1997; Wen et al. 2002; Tappin et al. 2010; Lanceleur et al. 2011). Wenn das Oberflächenwasser von Einträgen von unbehandeltem Abwasser aus der photographischen Industrie oder dem Bergbau betroffen ist, liegen die Umweltkonzentrationen von Silber im Bereich von 100 – 1000 ng Ag/L (Wen 2002; Lanceleur 2011). Sedimente von Flüssen in industrialisierten Gebieten enthalten ca. 1 mg Ag/kg (Gobeil 1999; Lanceleur 2011) und in hochkontaminierten Gebieten im Bereich von 10 – 100 mg Ag/kg (Dissanayake et al. 1983; Lanceleur 2011). Der geogene Hintergrund von Silber ist ca. 70 µg Ag/kg (Pais and Benton Jones 1997).

Auf den wichtigsten Austragungsweegen im Lebenszyklus, Abwasser (WW) und feste Abfälle (SW), werden die Abschätzungen von Hund-Rinke et al. (2008) für die Silberkonzentration im Abwasser von ca. 10 µg Ag/L und von Blaser et al. (2008) für die Menge von Silber im festen Abfällen von 700 t Ag/a in der EU (extrapoliert auf 2010) verwendet. Für Deutschland ergibt die bevölkerungsbasierte Abschätzung dann 114 t/a Silber in festen Abfällen. Eine geringere Abschätzung der Silberkonzentration im Abwasser von ca. 4 µg Ag/L geben Shafer et al. (1998) an.

Berücksichtigung der Speziation des Silbers im Lebenszyklus

Die Bewertung der Vorhersagen der Umweltkonzentrationen von Silber mit den aus den anderen Arbeitspaketen bestimmten Wirkungen sollte auch die Vorhersage der vorhandenen Silberspezies mit einschließen. In vielen Arbeiten wird die Wichtigkeit der Speziation des Silber bei der Betrachtung der Toxizität stark betont (Ratte 1999; Navarro et al. 2008; Choi et al. 2009; Liu et al. 2010; Liu et al. 2012). Es wurde in der vorliegenden Abschätzung eine vereinfachte qualitative Einteilung der Spezies von Silber in 5 Gruppen vorgenommen. Dies geschah basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen zur Speziation von Silber aus dem Arbeitspaket 1.2.2. Die Gruppen umfassen metallische Silbernanopartikel (AgNP), gelöste Silberionen und leicht bis schwerlösliche Silbersalze (wie z.B. AgNO₃ und AgCl), metallisches Silber (> 100 nm), schwefelgebundene Silberionen wie z.B. Ag₂S und gebunden an Schwefelgruppen von DOM (gelöste organische Stoffe) und NOM (natürliche organische Stoffe) und als letzte Gruppe metallische Silbernanopartikel fest eingebunden in Polymere, wie es z.B. für die Polyesterfasern des Projektpartners HI gilt (HI, persönliche Mitteilung). Die Unterscheidung von Silbernanopartikeln und metallischem Silber (> 100 nm) wurde gemacht, um nanospezifische Effekte beurteilen zu können. Gelöste Silberionen und die leicht- bis schwerlöslichen Silbersalze wie z.B. Silberchlorid wurden in eine Gruppe zusammengefasst, weil durch leichte Veränderungen des Mediums, wie z.B. die Erhöhung des Chlorid-Gehaltes das in Silberchlorid enthaltene Silber als Silberchlorid-Komplexe wieder in Lösung gebracht

werden kann. Dies ist bei Anwesenheit von reduziertem Schwefel als S^{2-} oder als SH-Gruppen in organischen Verbindungen nicht möglich, da die Bindung von Silber an diesen Schwefel sehr stark ist ($K \approx 10^{-36}$ für die Reaktion $Ag_2S + H^+ \rightarrow 2Ag^+ + HS^-$ (PHREEQC: v2.18, *minteq.v4* Database).

Produktion der silberhaltigen Fasern und Textilien

Die Silbernanopartikel NM300K werden nach Auskunft des Herstellers RAS fest in die Polyesterfasern eingebunden. Eine oberflächliche Behandlung von Fasern mit Nanopartikeln, wie dies z.B. für die Proben für die Abriebversuche des Partners BUI geschehen ist, wird nicht als realistisch angesehen. Die schnelle Freisetzung von Silber aus diesen Materialien widerspricht der beabsichtigten langanhaltenden bioziden Wirksamkeit der Produkte. Hingegen ermöglichen die fest in die Fasern eingebundenen Silbernanopartikel eine langanhaltende biozide Wirksamkeit (konkrete Beispiele: vgl. Bericht des Partners HI).

Für die Einarbeitung von Silberchlorid in Fasern für die Textilherstellung wird aus den oben genannten Gründen ähnlich verfahren wie beim AgNM NM300K (Auskunft vom Partner CHT).

Der Projektpartner RAS nennt als Produkte, die Silbernanopartikel enthalten: **XXX**. Beispiele von Textilien die Silberchlorid enthalten, sind Militäruniformen und Wischtücher (CHT). Die Konzentration von Silber in Textilien schwankt je nach Anwendung nach Angaben vom Partner RAS von **XXX** Ag/kg Textil. Die biozide Wirksamkeit ist jedoch nach Auskunft von RAS nicht immer gegeben. Windler et al. (2013) geben in 25/75%-Quantilen die Silberkonzentrationen 33/77 mg Ag/kg Textil an. Die Silbergehalte in Textilien, die im Rahmen einer Waschstudie (KEMI Report 2011) gemessen wurden, liegen im Bereich von 0,5 mg/kg bis 1360 mg/kg. Der Mittelwert des Silbergehalts in dieser Studie liegt bei 110 mg/kg.

Freisetzung von Silber im Gebrauch von Textilien

Beim Gebrauch von Textilien wird Abrieb erzeugt, der aus Fasern und Faserbruchstücken besteht. Diese Bruchstücke werden zu einem kleinen Teil direkt in die Luft freigesetzt. Ein großer Teil des Abriebs ist jedoch nicht luftgetragen. Die Simulation des Abriebverhaltens wurde vom Projektpartner BUI mit Hilfe eines Martindale-Aufbaus durchgeführt. Die Freisetzungsexperimente ergaben keine Freisetzung von einzelnen Silbernanopartikeln. Die grobe und die feine Fraktion des Abriebs wurden auf den Silbergehalt untersucht und es wurde in der feinen Fraktion keine Silberkonzentration, die signifikant über dem Blindwert liegt, gefunden. Die Silbergehaltsbestimmung der groben Fraktion des Abriebs ergab einen Silbergehalt der nicht signifikant von dem des untersuchten Textils abweicht. Berücksichtigt man die Er-

gebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Partners BUI, kann angenommen werden, dass die Freisetzung von Silber aus dem Textil über die freigesetzten Faserbruchstücke geschieht. Die Freisetzung von Silber aus Textilien über Abrieb kann aus Abriebversuchen mit nicht mit Silbernanopartikeln behandelten Textilien abgeschätzt werden.

Die Daten des Partners HI zum Abrieb lagen auch drei Monate nach Projektende noch nicht vor (Martindale-Versuche -> Lebensdauer) und konnten somit nicht in diesem Bericht berücksichtigt werden. Die Menge des Abriebs insgesamt in den Martindale-Versuchen (Bedingungen siehe Bericht BUI) entspricht 0,5 g/kg bis 5 g/kg Textil.

Bei der Reinigung von Textilien in Waschmaschinen wird Silber ins Waschwasser abgegeben und gelangt somit mit dem Haushaltsabwasser in die Kanalisation und letztendlich in die Kläranlage. Die Wasch- und Eluationsversuche wurden von den Partnern HI und RAS durchgeführt. Die Eluationsversuche (folgend der ISO 10993-17) des Partners RAS von Polyesterfasern mit XXX NM300K ergaben in Wasser eine Freisetzung von Silberionen weniger als XXX innerhalb von 6 Tagen und in 0,5% HNO₃ weniger als XXX, ebenfalls als Silberionen.

Aufgrund der harschen Bedingungen, der Anwesenheit von Salpetersäure, kann der letztere Fall als Freisetzung von Silber während der Lebensdauer eines Jahres dieser HighTec-Faser angenommen werden. Die Annahme der Verwendung nur dieser HighTec-Fasern für die Herstellung von silberhaltigen Textilien dient als Grundlage für das realistische Szenario mit geringer Freisetzung als Silberionen.

Die Waschversuche nach DIN EN ISO 105-C12 mit einer oberflächlich beschichteten Polyesterfaser (mit 75 ppm Silber, NM300K, Binder iSySSyn vom Partner CHT, 2 Waschzyklen) und oberflächlich beschichteter Baumwolle (mit 50 ppm Silber, NM300K, Binder iSysMTX vom Partner CHT, 9 Waschzyklen) ergaben die Freisetzung von über 95% des Silbers. Die Zahl der Waschzyklen der Versuche entspricht etwa dem 10fachen Wert bei Haushaltswäschen. Die Untersuchung des Waschwassers durch den Partner TUDr ergab eine Freisetzung von Silbernanopartikeln. Die Waschversuche können als Grundlage für eine worst-case-Annahme der Freisetzung von 95% des Silbers als Nanopartikel während der Lebensdauer eines Textils benutzt werden. Lorenz et al. (2012) berichten von einem worst-case-Textil (Socken mit 2,9 g Ag/kg), das nach einem Waschzyklus 23,5% des Silbers freisetzt. 13,6% des Gesamtsilbers sind in der Größenfraktion < 0,45 µm zu finden, und auch freigesetzte Silbernanopartikel wurden in der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Waschwassers nachgewiesen.

Die Waschversuche mit einer Lyocell-Faser (mit 161 ppm NM300K fest eingebunden in die Fasern, 4 Waschzyklen, XXX) ergaben die Freisetzung von 7 ppm (entsprechend 4,3%) als Silberionen während der Lebensdauer. Dies letztere Szenario wird ebenfalls als realistisch angenommen. Aufgrund der etwas höheren Freisetzung als bei den Eluationsversuchen des

Partners RAS wird diese Freisetzung im mittleren Szenario verwendet. Die Freisetzung von Silbernanopartikeln aus den Textilien wird als nicht gewünschte Produkteigenschaft betrachtet. Im realistischen Szenario werden nur Silberionen und Faserbruchstücke, die Silbernanopartikel enthalten, freigesetzt. Die Bruchstücke sind im Mikrometerbereich (Daten BUI), und man daher davon ausgehen, dass die Bruchstücke selbst ein ähnliches Freisetzungsverhalten haben wie die Fasern selbst. Die Freisetzung von Silberionen wird auch von den Arbeiten von Bott et al. (2012), Lansdown (2010) und Hahn et al. (2011) für Kompositmaterialien, die Silbernanopartikel enthalten, beschrieben.

Daten zu Nutzungsszenarien vom Partner HI stehen ebenfalls noch aus und konnten hier nicht berücksichtigt werden. Eine mögliche Abschätzung wäre, dass 5% der benutzten Wäsche mit Silbernanopartikeln behandelt wurden (Entwurf UBA).

Verhalten im Abwasser und in der Kläranlage

Das im Abwasser enthaltene Silber reagiert wegen des hohen Schwefelgehalts im Abwasser und bei den vorherrschenden anoxischen Bedingungen größtenteils zu schwerlöslichem Silbersulfid. Für Silbernanopartikel berichten Kägi et al (2013) die Bildung von Silbersulfid im Abwasser. Für AgNP (mit PVP-Coating) im Durchmesserbereich von 5 – 100 nm werden 25 – 30% des Silbers in Silbersulfid umgewandelt. Für Silberionen berichtet Blaser et al. (2008) vollständige Umwandlung zu Silbersulfid. Für Mikrosilber und Silbernanopartikel eingebunden in Fasern nimmt man keine nennenswerte Umwandlung an. Nach Angaben von Eurostat (http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Water_statistics) gelangen 95% des Abwassers in die Kläranlage und 5% gelangen ungeklärt in Oberflächengewässer. Bei starken Niederschlägen kann es jedoch zu einer Verschiebung dieser Verteilung kommen durch Überlastung des Kanalsystems, wenn Regenwasser mit z.B. dem häuslichen Abwasser in einem System geleitet wird. Benotti & Brownawell (2007) und Phillips et al. (2012) berichten von einem sehr großem Einfluss dieser Ereignisse auf die Konzentrationen von Stoffen in Oberflächengewässern, die in der Kläranlage sehr gut abgebaut werden. Zudem geben Phillips et al. (2012) die Abschätzung für den Beitrag dieser Ereignisse zum jährlichen Auslauf aus der Kanalisation von 10% an. Im Rahmen dieses Projektes wurde dann im worst-case-Szenario der Anteil des Abwassers, welches ungeklärt in Oberflächengewässer gelangt, auf 15% festgelegt.

Für die Verteilung des Silbers auf Klärschlamm und Ablauf spielt das anfängliche Vorliegen des Silbers eine untergeordnete Rolle, wobei es Hinweise aus Modellversuchen des Partners IME gibt, dass bei Einleitung von Silbernanopartikeln bis zu 10% der Partikel unverändert die Kläranlage wieder verlassen. Die Untersuchung von Burkhardt et al (2010) hat für Silberchlorid ergeben, dass 96% des Silbers an den Klärschlamm gebunden die Kläranlage

verlassen. Die verbleibenden 4% des Silbers verlassen die Kläranlage als gelöstes Silber über das Nachklärbecken ins Oberflächengewässer. Die Projektpartner IME und BGR (Schlich et al. 2013) geben an, dass der Hauptteil des Silbers als Silbersulfid die Kläranlage verlässt. Diese Aussage wird von Kägi et al (2011) bestätigt. Spätere Versuche mit AgNP (mit Citrat-Coating) ergaben die Umwandlung von 95% von AgNP mit 10 nm Durchmesser und 10% Umwandlung von AgNP mit 100 nm Durchmesser in Silbersulfid nach 24 h (Kägi et al. 2013). Metallisches Silber und Silbersulfid liegen dabei zusammen in den Partikeln vor. Es wurden in beiden Arbeiten Hinweise auf Core/Shell- ($\text{Ag}^0/\text{Ag}_2\text{S}$)-Strukturen und auf komplexere Strukturen der Partikel gefunden. Für NM300K wird basierend auf diesen Daten in der Kläranlage eine Umwandlung von 90% des Silbers in Silbersulfid angenommen.

Die geringen Konzentrationen des Silbers im Ablauf der Versuchskläranlagen erlaubten unseren Projektpartnern keine experimentelle Speziation des Silbers. Daher wird von gleicher Verteilung der Silberspezies-Gruppen im Klärschlamm und im Ablauf ausgegangen. Gemäß der Richtlinie (EU TGD Part II, 2003) wird der Verdünnungsfaktor 10 vom Ablauf in Oberflächengewässer angenommen.

Austrag des Klärschlammes auf Agrarflächen

Der Feststoffanteil im Abwasser beträgt ca. 3 g/L (Burkhardt et al. 2010). Diese Menge an Feststoff verbleibt näherungsweise auch im Klärschlamm, so dass die Menge an Trockensubstanz, an die Silber gebunden ist, aus dem Abwasservolumen abgeschätzt werden kann. Die Ausbringung des Klärschlammes darf 5 t TS/ha alle 3 Jahre nicht überschreiten. Der Partner IME hat die Menge Klärschlamm im ausgebrachten Boden auf 1.67 g TS/ TM Boden bei 20 cm Eindringtiefe (entspricht Umpflügen nach der Ausbringung) abgeschätzt. Daten von Eurostat (http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Water_statistics) Water Statistics für Deutschland im Jahr 2008 schätzen 30% Ausbringung des Klärschlammes auf landwirtschaftlich genutzten Flächen, 52% werden in der Müllverbrennung verbrannt, und 18% werden kompostiert oder anders verarbeitet.

Entsorgung und Recycling

Nach der Verwendung des Textils wird angenommen, dass das Textil weggeworfen wird und der Verbleib wie bei anderen festen Abfällen (SW) sich auch auf Deponie (LF), Müllverbrennung (TWT) und Recycling (REC) verteilt. Dabei werden die Daten von Eurostat für Deutschland von 2011 (<http://ec.europa.eu/eurostat/waste>) benutzt für das Silber aus anderen Quellen. Die Verteilung der festen Abfälle in Deutschland für 2011 ist laut dieser Quelle für direkte

Deponierung mit 1% angegeben, für die Müllverbrennung 37%, für Recycling 45% und für die Kompostierung 17%. Diese Werte werden korrigiert mit der Annahme, dass silberhaltige Abfälle nicht in die Kompostierung gelangen sollten. Es ergeben sich die korrigierten Anteile 1,2% Deponie, 54,2% Recycling und 44,6% Müllverbrennung. Für Textilabfälle werden die Daten von Walser et al. (2011) für die Schweiz verwendet. Die Werte sind 5% Recycling und 95% Müllverbrennung. Da für Deutschland laut Eurostat auch direkte Deponierung geschieht, wird der korrigierte Anteil der Deponierung von silberhaltigen festen Abfällen 1,2% benutzt. Der Rest von 93,8% der silberhaltigen Textilabfälle wird dann nach diesen Annahmen in der Müllverbrennungsanlage verbrannt.

In der Müllverbrennungsanlage wird die Verteilung des Silbers von Blaser et al. (2008) auf Schlacke und Bodenasche, Flugasche und Austrag in die Atmosphäre angegeben mit 78%, 21% und 1%. Müller et al. (2008) geben eine Zurückhaltung von Silber bei der Müllverbrennung von 99,9% im realistischen Szenario an. Für das worst-case-Szenario in diesem Projekt wird 1% Austrag in die Atmosphäre angenommen. Die Transformation von Silber bei der Müllverbrennung ist ungeklärt. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit zu Kupfer (gleiche Nebengruppe im PSE) werden die Daten für die Transformation von Kupfer für Silber angenommen. Kupfer liegt in der Bodenasche als Metall vor (Eggenberger et al. 2010). Wegen der hohen Temperaturen wird angenommen, dass Silbernanopartikel ihre Nanoform verlieren und sich zu größeren Partikeln zusammenlagern. Der Anteil von Kupfer in der Schlacke ist ca. 60% metallisch (Zeltner 2010), meist als Nuggets. Wegen der hohen Temperaturen und des vorhandenen Sauerstoffs liegen die restlichen 40% wahrscheinlich als Salze oder oxidisch vor. Johnson et al. (2010) geben an, dass die Filterasche hauptsächlich aus leichtlöslichen Natrium- und Kaliumsalzen besteht. Weitere Bestandteile sind z.B. eine Vielzahl von Zink und Blei enthaltenden Chloriden, Sulfaten und Silikaten. Es wird daher erwartet, dass Kupfer und somit Silber ebenso in der Flugasche hauptsächlich als Salze vorliegen. Für den Austrag in die Atmosphäre wird die gleiche Speziation erwartet.

Berechnung der PEC-Werte

Unter Verwendung der oben genannten Verteilungsfaktoren und Silbermengen und deren unterschiedlicher Gewichtung für die Szenarien mit geringen, mittleren und worst-case wurden die PEC-Werte im Oberflächenwasser, im Boden und in der Luft mit Hilfe eines eigens erstellten Matlab-Skriptes berechnet.

Der PEC-Wert im Oberflächenwasser ergab sich dabei aus den Silbermengen, die pro Jahr ungeklärt ins Oberflächenwasser gelangen, und aus dem Ablauf der Kläranlagen, wobei das gesamte Abwasservolumen aus der durchschnittlichen Abwassermenge pro Kopf von 122 L

am Tag abgeschätzt wurde. Das gesamte Abwasservolumen im Jahr in Deutschland beträgt dann ca. $3,65 \cdot 10^9 \text{ m}^3/\text{a}$. Zudem wurde eine Verdünnung des Abwasser bei der Einleitung mit dem angenähertem Faktor 10 (TGD EU 2003) berücksichtigt. Der PEC-Wert im Boden wurde berechnet für Ackerflächen auf denen Klärschlamm ausgebracht wurde. Die Abschätzung des Partners IME für die Klärschlammmenge von 1.67 g/kg Boden wird dabei angewendet. Der PEC-Wert in der Luft wurde über die gesamte ausgetragene Silbermenge in den Luftraum bis 1 km Höhe über Deutschland abgeschätzt. Dabei wird die Fläche Deutschlands von 357121 km^2 angesetzt (http://www.statistik-portal.de/Statistik-Portal/de_jb01_jahrtab1.asp, abgerufen 26.7.2013).

Ausgehend von den bisher erwähnten Verteilungsfaktoren und Silbermengen und deren unterschiedlicher Gewichtung für die Szenarien mit geringen, mittleren und worst-case-Verhalten (siehe auch Tabelle 14) wurden die PEC-Werte im Oberflächenwasser, im Boden und in der Luft abgeschätzt. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Matlab-Skriptes für die unterschiedlichen Szenarien jeweils mit und ohne die anderen Quellen (OS) durchgeführt, um eine Bewertung des Gebrauchs von Silbernanopartikeln in Bezug auf die PEC-Werte zu ermöglichen.

Ergebnisse

Tabelle 14: Szenarien

Szenarien	Gering	Mittel	worst case
AgNP Einsatz in Textilien	190 kg	600 kg	1500 kg
Ag Freisetzung Abrieb Lifetime	0,1%	1%	2%
Ag Freisetzung Wäsche Lifetime	0,85% (Ag ⁺)	4,3% (Ag ⁺)	95% (AgNP)
Unbehandeltes Abwasser	5%	10%	15%
Elimination in Klärschlamm	96%	95%	90%
Austrag in Oberflächenwasser	4%	5%	10%
Austrag Müllverbrennung Feinstaub	0,1%	0,1%	1%

Die Ergebnisse für die PEC-Werte für das realistische und das mittlere Szenario werden kaum von den eingesetzten Mengen von Silbernanopartikeln beeinflusst. Die Werte sind 100fach bis 20.000fach größer als die Konzentrationen, die vom Einsatz der AgNP in Textilien stammen. Lediglich beim PEC-Wert für Luft gibt es eine sehr kleine Konzentration der Spezies (Ag/Polym), welche die AgNP eingebunden in Fasern repräsentiert. Diese Menge wird freigesetzt als Abrieb beim Tragen der Textilien.

Tabelle 15: Ergebnisse für die PEC-Werte für die unterschiedlichen Szenarien ohne Berücksichtigung der anderen Quellen (ohne OS) und mit der Berücksichtigung der anderen Quellen (mit OS).

Szenario	Spezies	Realistisch		Medium		Worst-case	
		ohne OS	mit OS	ohne OS	mit OS	ohne OS	mit OS
PEC Wasser [ng/L]	AgNP					4.284	4.284
	Ag+						
	Ag ₂ S	0.00388	88.00	0.1014	145.1	4.789	239.8
	AgMetal						
PEC Boden [ng/g]	AgNP					0.0135	0.01354
	Ag+						
	Ag ₂ S	0.000236	5.344	0.00370	5.292	0.1799	5.190
	AgMetal						
PEC Luft [pg/m ³]	AgNP						
	Ag+	0.497	191.2	1.525	189.2	17.67	1846.4
	Ag ₂ S						
	AgMetal						
	Ag/Polymer	0.532	0.532	16.80	16.80	42.00	42.00

Nur für das worst-case-Szenario kommen die Werte für den Einsatz von AgNP in Textilien in den Bereich der Beiträge aus den anderen Quellen. Die Werte mit anderen Quellen sind 30fach bis 100fach größer als der Beitrag der AgNP. Ein weiterer wesentlicher Unterschied ist, dass in Wasser und Boden eine Exposition mit Silbernanopartikeln zu erwarten ist, wenn diese Art von worst-case-Textil mit 95% Silberfreisetzung als Silbernanopartikel beim Waschen tatsächlich verwendet werden würde. Ein wichtiger Faktor für die Freisetzung von Silbernanopartikeln in Oberflächengewässer ist der Beitrag des ungeklärten Abwassers, das in Oberflächengewässer gelangt. Dies geschieht vor allem bei sehr starken Niederschlägen. Die fast vollständige Umwandlung von AgNP in Silbersulfid in der Kläranlage kommt so nicht zum Tragen und ermöglicht in diesem Fall die erhöhte Exposition mit AgNP in der Umwelt.

Die in diesem Arbeitspaket abgeschätzten PEC-Werte dienen in dem Arbeitspaket 3.2 zur Gefährdungs- und Risikoabschätzung. Die PEC-Werte werden mit den bestimmten Wirkungen aus den Arbeitspaketen 1.2.3 und 2.3.1-2.3.2 bewertet, um die Risiken abzuschätzen. Die EC₅₀-Werte für NM300K für die aquatischen Tests (UBA, Cyanobakterien, Grünalgen und Daphnien (akut) liegen im µg/L-Bereich (5 µg/L bis 40 µg/L). Für Silberionen als AgNO₃ wurde vom UBA für Grünalgen und den Daphnien-Test (akut) die EC₅₀-Werte 2 µg/L und 3 µg/L angegeben. Die PEC-Werte der hier berechneten Szenarien im Oberflächenwasser liegen im ng/L-Bereich und sind somit mehr als 1000fach unter diesen Wirkungskonzentrationen. Dies gilt sogar im Falle des worst-case-Szenarios. Für die PEC-Werte im Boden ist dieser Unterschied noch größer. Der EC₅₀-Wert im Bodenkontakt-Test mit *Arthrobacter globi-*

formis liegt bei ca. 8 mg/kg für AgNO₃ und bei 34 mg/kg für NM300K. Die PEC-Werte im Boden sind für alle hier betrachteten Szenarien unterhalb des µg/kg-Bereiches.

Zusammenfassung

Die Frage, inwieweit sich die Verwendung von Nanosilber in Textilien auf die Umweltkonzentrationen von Silber bzw. Nanosilber auswirkt, wurde mit der Lebenszyklusanalyse abgeschätzt. Da die eingesetzten Mengen von Nanosilber in Textilien aktuell noch sehr gering sind im Vergleich zu den Mengen von anders verwendetem Silber, wirkt sich die Verwendung der Partikel in Textilien noch kaum auf Umweltkonzentrationen von Silber aus. Erst bei einer 100- bis 1000mal größeren Einsatzmenge von Nanosilber in Textilien würden sich die abgeschätzten Umweltkonzentrationen (predicted environmental concentrations, PEC) merklich erhöhen. Da die Waschversuche von Textilien mit fest eingebundenen Partikeln keine Freisetzung von Nanopartikeln ergaben, ist bei dieser Art von Textilien nach dem realistischen Szenario kaum Umweltexposition zu erwarten. Die während des Waschvorgangs freigesetzten Silberionen werden in der Kanalisation und in der Kläranlage zum größten Teil in Silbersulfid umgesetzt. Dies ist jedoch nur ein kleiner Teil des Nanosilbers. Der größte Teil gerät mit den abgetragenen Textilien über den Müll in die Müllverbrennungsanlage. Dort verliert das Nanosilber durch die hohen Temperaturen bei der Verbrennung seine Nanoform und verbleibt zu über 99% in der Asche.

Die gemachten Abschätzungen mit dem worst-case-Szenario legen eine dringende Empfehlung für die Hersteller von Silbernanopartikeln enthaltenden Textilien nahe. Bei einer stärkeren Etablierung dieser Textilien auf dem Markt ist unbedingt darauf zu achten, dass alle Textilprodukte möglichst so hergestellt werden, dass eine Freisetzung von Silbernanopartikeln unterbunden wird, um die Exposition von Silbernanopartikeln in der Umwelt zu vermeiden.

2.1.7 Arbeitspaket 3.2: Risikobewertung

Alle in den Kapiteln 2.1.2 – 2.1.6 dargestellten Ergebnisse flossen gemeinsam mit denen anderer Partner in das Arbeitspaket „Risikobewertung“ ein. Hinzu kamen die in anderen Projekten und Gremien (v.a. nanoToxCom, SCENIHR WG „Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance“) gewonnenen Erkenntnisse aus praktischen Arbeiten und der Literatur. Die wichtigsten Schlussfolgerungen aus den von den Partnern ÖKO und VdW durchgeführten Arbeiten sind nachfolgend dargestellt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass nominale Silberkonzentrationen zumindest über die Kurzzeit-Toxizität von AgNP sehr wenig aussagen. Mit Hilfe der numerischen Speziierung können viele Effekte gut erklärt werden – entscheidende Voraussetzung ist dabei jedoch, dass die jeweiligen Randbedingungen (chemische Zusammensetzung des Umgebungsmediums) korrekt eingestellt werden. Dies trug u.a. zum Verständnis der sehr unterschiedlichen Wirkschwellen der verschiedenen Testsysteme bei. So zeigte z.B. keine der getesteten Verbindungen eine nennenswerte Wirkung auf die marinen Bakterien *Vibrio fischeri*, was sich in Meerwassermedium durch eine Ausfällung gelöster Ionen als AgCl erklären lässt (Abb. 12).

Die hier erzielten Ergebnisse zeigten eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem errechneten Anteil gelöster Silberionen und der toxischen Wirkung, z.T. aber auch deutliche Unterschiede zwischen nanopartikulärem und leicht löslichem Silber im zeitlichen Verlauf der toxischen Wirkung. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich die sehr kleinen auf die Titandioxidträger aufgebrachten AgNP bezüglich ihres Lösungsverhaltens und ihrer Wirkung wie leicht lösliches Silbernitrat verhielten. Es konnten also keine Hinweise auf einen anderen Wirkmechanismus als den gelöster Silberionen gefunden werden, wobei intrazelluläre Konzentrationen und Partikel-Zellkontakt zumindest bei Einzellern von entscheidender Bedeutung sind (Navarro et al. 2008, Bondarenko et al. 2013). Die sehr unterschiedliche Reaktionskinetik größerer AgNP ist durchaus als nano-spezifisch anzusehen.

Letzteres ist insbesondere aus der Sicht der Umweltregulierung bedeutsam: alle first-tier-Standardverfahren zur Gefährdungsabschätzung sind Kurzzeittests, die zumindest im Boden, aber auch in aquatischen Systemen (Baumann et al. 2013) in keinem Verhältnis zum tatsächlichen Gefährdungspotenzial über einen längeren Zeitraum stehen, was hier belegt werden konnte. Besonders bemerkenswert ist dabei, dass unter exakt denselben Bedingungen über unterschiedliche Zeiträume gelagerter Boden nur im 28 Tage dauernden Test mit Collembolen, nicht aber im 30 Minuten dauernden Test mit bodenlebenden Bakterien eine Wirkung erkennen ließ. Gerade das Testverfahren für die (unter Realbedingungen vermutlich am stärksten beeinträchtigten) Zielorganismen ist also denkbar ungeeignet für die Gefährdungsabschätzung von AgNP, ebenso der weit verbreitete Leuchtbakterientest mit *V. fischeri* (s.o.). Einzellige limnische Organismen wie Algen ließen dagegen in relativ kurzer Zeit (24 h bzw. 72 h) das Gefährdungspotenzial auch sehr niedriger Konzentrationen an AgNP klar erkennen (Abbildung 52, 53).

Die Lebenszyklusanalyse ergab bei den derzeit eingesetzten Mengen an AgNP eine insgesamt geringe Umweltexposition mit AgNP. Eine Anreicherung über die Schadensschwelle hinaus ist jedoch bei Ausbringung von Klärschlamm über längere Zeiträume nicht auszuschließen.

2.1.8 Arbeitspaket 4: Koordination

Partner ÖKO koordinierte den Gesamtverbund. Wesentlich wurden im Projektzeitraum folgende Aufgaben wahrgenommen:

- Organisation von und Teilnahme an Verbundtreffen (siehe Abschnitt 1.5)
- Terminabsprachen und -erinnerungen
- Kommunikation im Projekt, Pflege des Verteilers
- Koordination der Arbeitspakete, Vernetzung der Projektpartner untereinander
- Koordination der Bestellung der OECD-Standardartikel NM300K bei JRC
- Bereitstellung von Informationen zu wichtigen Tagungen, Publikationen etc.
- Koordination bzw. Anregung von Gemeinschaftspublikationen
- Konsensbildung im Projekt bei Interessenskonflikten der Partner: gemeinschaftliche Erarbeitung von sogenannten „Kernaussagen“, die bei nachfolgenden Projekttreffen aktualisiert und ergänzt wurden
- Bereitstellung und Organisation einer gemeinsamen Datenplattform über Dropbox
- Bereitstellung von Layout-Vorlagen (Poster, Vorträge) und einer Verbundpräsentation
- Kommunikation mit der DANA-Datenbank
- Teilnahme an wichtigen nationalen Treffen (u.a. Abschlusskonferenz Nano-Dialog und WING-Konferenz; beide in Berlin)
- Bereitstellung und Pflege der Projekt-Homepage <http://www.umsicht.uni-bremen.de/>
- Öffentlichkeitsarbeit (Presse, Funk, Fernsehen; sonstige Anfragen)
- Koordination der Arbeiten mit denen in anderen Projekten, insbesondere nano-ToxCom: komplementäre Fragestellungen, Synergieeffekte
- Kontaktpflege und Kommunikation mit dem Projektträger
- Sicherstellung der wissenschaftlichen Anschlussfähigkeit und Verwertung: Koordination des Verbundantrags „DENANA“ (vgl. 3.3)

Literatur

Im Rahmen von UMSICHT entstandene Publikationen der Partner VdW und ÖKO sind in blau dargestellt.

1. Altenburger R, Bödeker W, Faust M, Grimme HL. 1990. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals. Combination effect studies with pesticides in algae bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 20:98-114.
2. Baumann J, Sakka Y, Bertrand C, Köser J, Filser J. 2013. Adaptation of the *Daphnia sp.* acute toxicity test: miniaturization and prolongation for the testing of nanomaterials. *Environmental Science and Pollution Research*, DOI 10.1007/s11356-013-2094-y.
3. Benoit R, Wilkinson KJ, Sauvé S. 2013. Partitioning of silver and chemical speciation of free Ag in soils amended with nanoparticles. *Chemistry Central Journal* 7:75-81.
4. Benotti MJ, Brownawell BJ. 2007. Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry- and wet-weather conditions. *Environmental Science and Technology* 41:5795-5802.
5. Berridge MV, Tan AS. 1993. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Band 303:474-482.
6. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. 1996. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4:14-19.
7. Blaser SA, Scherlinger M, MacLeod M, Hungerbühler K. 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment* 390:396-409.
8. Bondarenko O, Ivask A, Käkinen A, Kurvet I, Kahru A. 2013. Particle-Cell Contact Enhances Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *PLoS ONE* 8:e64060. doi:10.1371/journal.pone.0064060.
9. Bott J, Störmer A, Wolz G, Franz R. 2012. Migration potential of nanoscale silver particles in food contact polyolefins. 5th International Symposium on Food Packaging, Berlin, 14.-16. November 2012.
10. Bragg PD, Rainnie DJ. 1974. The effect of silver ions on the respiratory chains of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology* 20:883-889.
11. Burkhardt M, Zuleeg S, Kägi R, Sinnet B, Eugster J, Boller M, Siegrist S. 2010. Verhalten von Nanosilber in Kläranlagen und dessen Einfluss auf die Nitrifikationsleistung in Belebtschlamm. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 22:529-540.
12. Choi O, Clevenger TE, Deng B, Surampalli RY, Ross L. 2009. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Research* 43:1886.
13. Clogston JD. NCL Method PCC 2: Measuring Zeta Potential of Nanoparticles. April 2008, revised, November 2009. Nanotechnology Characterization Laboratory, Frederick, MD 21702.
14. Cribb AE, Leeder JS, Spielberg SP. 1989. Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry* 183:195-196.
15. DIN Deutsches Institut für Normung e.V. DIN 38412-34: Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) Teil 34: Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum* (Leuchtbakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien). Beuth-Verlag, Berlin.

16. DIN Deutsches Institut für Normung e.V. DIN EN IOSO 20079: Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) - Wasserlinsen - Wachstumshemmtest. Beuth-Verlag, Berlin.
17. DIN Deutsches Institut für Normung e.V. DIN EN ISO 8692: Wasserbeschaffenheit - Süßwasseralgen - Wachstumshemmtest mit einzelligen Grünalgen. Beuth-Verlag, Berlin.
18. DIN Deutsches Institut für Normung e.V. DIN ISO 11267:2001-06 (D) Bodenbeschaffenheit - Hemmung der Reproduktion von Collembolen (*Folsomia candida*) durch Bodenschadstoffe (ISO 11267:1999). Beuth-Verlag, Berlin.
19. Dissanayake CB, Tobschall HJ, Palme H, Rast U, Spettel B. 1983. The abundance of some major and trace elements in highly polluted sediments from the Rhine river near Mainz, West Germany. *Science of the Total Environment* 29:243-260.
20. Eggenberger U, Mäder U. 2010. Charakterisierung und Alterationsreaktionen von KVA-Schlacken - KVA-Rückstände in der Schweiz. *Der Rohstoff mit Mehrwert*. BAFU 115-137.
21. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88-95.
22. Engelke M, Köser J, Zhang H, Mädler L, Filser J. 2013. A miniaturized solid contact test with *Arthrobacter globiformis* for the assessment of the environmental impact of silver nanoparticles. Submitted.
23. Fabrega J, Fawcett SR, Renshaw JC, Lead JR. 2009. Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter. *Environmental Science and Technology* 43:7285-7290.
24. Fabrega J, Luoma SN, Tyler CR, Galloway TS, Lead JR. 2011. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International* 37:517-531.
25. Faust M, Altenburger R, Bödeker W, Grimme LH. 1992. Algentoxizitätstests mit synchronisierten Kulturen. *Biologische Testverfahren*. 89. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
26. Filser J, Arndt D, Baumann J, Geppert M, Hackmann S, Luther EM, Pade C, Prenzel K, Wigger H, Arning J, Hohnholt MC, Köser J, Kück A, Lesnikow E, Neumann J, Schütrumpf S, Warrelmann J, Bäumer M, Dringen R, von Gleich A, Swiderek P, Thöming J. 2013a. Intrinsically green iron oxide nanoparticles? From synthesis via (eco-)toxicology to scenario modelling. *Nanoscale* 5:1034-1046.
27. Filser, J., Köser, J. 2013. *Environmental Impact Assessment for Nanotechnologies: Integrating the Ecological and the Chemical Perspective*. Under revision
28. Filser J, Wiegmann S, Schröder B. 2013b. Collembola in ecotoxicology - Any news or just boring routine? *Applied Soil Ecology*, in press, available online 20 August 2013.
29. Gobeil C. 1999. Silver in Sediments from the St. Lawrence River and Estuary and the Saguenay Fjord. *Environmental Science and Technology* 33:2953-2957.
30. Hackley et al. 2010, NIST-NCL PCC 1 (http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_PCC-1.pdf)
31. Hahn A, Brandes G, Wagener P, Barcikowski S. 2011. Metal ion release kinetics from nanoparticle silicone composites. *Journal of Controlled Release* 154:164-170.
32. Holt KB, Bard AJ. 2005. Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry* 44:13214-13223.

33. Hoppe M, Utermann J, Mikutta R, Guggenberger G. 2011. Mobilität von Silber und Silbernanopartikeln in Böden. Tagung: Böden verstehen, Böden nutzen, Böden fit machen, Jahrestagung der DBG 03-09-2011, Berlin, p eprints.dbges.de/622/.
34. Hund-Rinke K, Marscheider-Weidemann F, Kemper M. Beurteilung der Gesamtumweltexposition von Silberionen aus Biozid-Produkten. Forschungsbericht 360 04 020 - UB-FB 001212.
35. ISO IOfS. 1999. Soil quality - Inhibition of reproduction of *Collembola* (*Folsomia candida*) by soil pollutants. ISO 11267, Geneva, Switzerland.
36. Jander J, Blasius G. 1995. Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie. S. Hirzel Verlag Stuttgart
37. Jin X, Li M, Wang J, Marambio-Jones C, Peng F, Huang X, Damoiseaux R, Van Hoek E. 2010. High-Throughput Screening of Silver Nanoparticle Stability and Bacterial Inactivation in Aquatic Media: Influence of Specific Ions. *Environmental Science and Technology* 44:7321-7328.
38. Johnson CA, Huter C. 2010. Characterization and geochemical properties of selected incineration residues. BAFU 145-151.
39. Kägi R, Voegelin A, Sinnet B, Zuleeg S, Hagendorfer H, Burkhardt M, Siegrist S. 2011. Behavior of Metallic Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science & Technology* 45:3902-3908.
40. Kägi R, Voegelin A, Ort C, Sinnet B, Thalmann B, Krismer J, Hagendorfer H, Elumelu M, Mueller E. 2013. Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water Research* 47:3866-3877.
41. Kim B, Park C-S, Murayama M, Hochella MFJ. 2010. Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products. *Environmental Science and Technology* 44:7509-7514.
42. Lanceleur L, Schäfer J, Bossy C, Coyne A, Larrose A, Masson M, Blanc G. 2011. Silver fluxes to the Gironde Estuary - Eleven years (1999-2009) of monitoring at the watershed scale. *Applied Geochemistry* 26:797-808.
43. Lansdown ABG. 2010. A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices. *Advances in Pharmacological Sciences* Article ID 910686, 16 pages.
44. Liu D. 1989. A rapid and simple biochemical test for direct determination of chemical toxicity. *Toxicity Assessment* 4:399-404.
45. Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt R. 2010. Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. *ACS Nano* 4:6903-6913.
46. Liu J, Wang Z, Liu FD, Kane AB, Hurt RH. 2012. Chemical Transformations of Nanosilver in Biological Environments. *ACS Nano* 6:9887-9899.
47. Lorenz C, Windler L, von Goetz N, Lehmann RP, Schuppler M, Hungerbühler K, Heuberger M, Nowack B. 2012. Characterization of silver release from commercially available functional (nano)textiles. *Chemosphere* 89:817-824.
48. Luoma SN. 2008. Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges? Woodrow Wilson International Center for Scholars: Project of Emerging Nanotechnologies,, Washington D.C.
49. Mari A, Imperatori P, Marchegiani G, Pilloni L, Mezzi A, Kaciulis S, Cannas C, Meneghini C, Mobilio S, Suber L. 2010. High Yield Synthesis of Pure Alkanethiolate-Capped Silver Nanoparticles. *Langmuir* 26:15561-15566.

50. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* Band 65:55-63.
51. Mueller NC, Nowack B. 2008. Exposure Modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science and Technology* 42:4447-4453.
52. Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg R, Behra R. 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology* 42:8959-8964.
53. Nowack B, Krug HF, Height M. 2011. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environmental Science and Technology* 45:1177-1183.
54. OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Freshwater alga and cyanobacteria growth inhibition. OECD Environmental Health and Safety Publications. No. 201[adopted March 2006]. 2006. Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development. Series on Testing and Assessment.
55. OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Lemna sp. growth inhibition test. OECD Environmental Health and Safety Publications. No. 221[adopted March 2006]. 2006. Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development. Series on Testing and Assessment.
56. OECD. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Collembolen reproduction test in soil. OECD Environmental Health and Safety Publications. No. 232[adopted September 2009], 1-19. 2009. Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development. Series on Testing and Assessment.
57. Pais I, Benton Jones jr. J. 1997. *Handbook of Trace Elements*. St. Lucie Press.
58. Philips PJ, Chalmers AT, Gray JL, Kolpin DW, Foreman WT, Wall GR. 2012. Combined Sewer Overflows: An Environmental Source of Hormones and Wastewater Micropollutants. *Environmental Science and Technology* 46:5336-5343.
59. Ratte HT. 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:89-108.
60. SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks), Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. Preliminary opinion for public consultation (http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consultations/public_consultations/scenihir_consultation_17_en.htm); last access: December 16, 2013
61. Schlich K, Klawonn T, Terytze K, Hund-Rinke K. 2013. Effects of Silver Nanoparticles and Silver Nitrate in the Earthworm Reproduction Test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32:1-8.
62. Schlich K. 2013. Untersuchungen zur ökotoxikologischen Wirkung von Silbernanopartikeln – Der Weg von der Kläranlage bis zum Eintrag in landwirtschaftliche Flächen. Freie Universität Berlin.
63. Schlich K, Klawonn T, Terytze K, Hund-Rinke K. 2013. Hazard assessment of a silver nanoparticle in soil applied via sewage sludge. *Environmental Sciences Europe* 25:doi:10.1186/2190-4715-25-17.
64. Shafer MM, Overdier JT, Armstrong DE. 1998. Removal, partitioning, and fate of silver and other metals in waste water treatment plants and effluent-receiving streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:630-641.
65. Soukupova I, Beklova M. 2009. Verification of microbiotest application for assessing toxic impact of chemicals in duckweed (*Lemna minor*). *Bulletin VURH Vodnany* 45:52-55.
66. Tappin AD, Barriada JL, Braungardt CB, Evans EH, Patey MD, Achterberg EP. 2010. Dissolved silver in European estuarine and coastal waters. *Water Research* 44:4204-4216.

67. Thomson K, Liu D, Kaiser KLE. 1986. A direct resazurin test for measuring chemical toxicity. Toxicity Assessment.. Wiley Online Library, pp 407-418
68. Tiede K, Boxall AB, Wang X, Gore D, Tiede D, Baxter M, David H, Tear SP, Lewis J. 2010. Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 25:1149-1154.
69. ToxRat Solutions GmbH . Statistische Auswertung von Biotests. Online Version 2.09 und 2.10. 2010.
70. Walser T, Demou E, Lang DJ, Hellweg S. 2011. Prospective Environmental Life Cycle Assessment of Nanosilver T-Shirts. Environmental Science and Technology 45:4570-4578.
71. Wen LS, Santschi PH, Gill GA, Paternostro CL, Lehmann RD. 1997. Colloidal and particulate silver in river and estuarine waters of Texas. Environmental Science and Technology 31:723-731.
72. Wen LS, Santschi PH, Gill GA, Tang DG. 2002. Silver concentrations in Colorado, USA, watersheds using improved methodology. Environmental Toxicology and Chemistry 21:2040-2051.
73. Wilkins DK, Grimshaw SB, Receveur V, Dobson CM, Jones JA, Smith LJ. 1999. Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques. Biochemistry 38:16424-16431.
74. Windler L, Height M, Nowack B. 2013. Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. Environment International 53:62-73.
75. Xiu Z, Zhang Q, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJJ. 2012. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. Nanoletters 12:4271-4275.
76. Zeltner C. 2010. Schmelzprozesse zwischen Abfall- und Ressourcenwirtschaft - KVA-Rückstände in der Schweiz. Der Rohstoff mit Mehrwert. BAFU 103-114.
77. Zhang, X, Filser, J. 2013. Micro-optical oxygen sensors: a new contact-free approach for measuring cell density of *Chlorella vulgaris* in ecotoxicological tests. Submitted.
78. Zhao CX, He L, Qiao SZ, Middelberg APJ. 2011. Nanoparticle synthesis in microreactors. Chemical Engineering Science 66:1463-1479.

Internetquellen:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Usa> (u.a. Länder)

http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Water_statistics

<http://ec.europa.eu/eurostat/waste>

http://www.statistik-portal.de/Statistik-Portal/de_jb01_jahrtab1.asp

http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/public-health/risk_assessment_of_Biocides/doc/tgd/tgdpart2_2ed.pdf

[http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/second_regulatory_review_on_nanomaterials_-_staff_working_paper_accompanying_com\(2012\)_572.pdf](http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/second_regulatory_review_on_nanomaterials_-_staff_working_paper_accompanying_com(2012)_572.pdf)

http://www.kemi.se/Documents/Publikationer/Trycksaker/PM/PM1_12_Antibact_eng.pdf

Anhang

1 In diesem Projekt etablierte Versuchsvorschriften (SOP)

1.1 SOP zur Durchführung der Größenbestimmung mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS)

- Vor der Messung die Proben schütteln.
- Optische Prüfung der Probe (Probe im Gegenlicht betrachten) vornehmen: Im Protokoll vermerken, wenn z.B. ein Sediment oder Verunreinigung (Fasern, Grobpartikel, etc.) beobachtet werden konnten.
- Messküvette mit 2,5 mL Probe befüllen.
- Gegebenenfalls bei Gasbläschen an der Küvettenwand Küvette kurz (2 bis 3 Sekunden) in ein Ultraschallbad halten und mit einem fusselfreien Tuch trocken wischen.
- Optimale Temperatur: 25°C
- Optimale Equilibration Zeit: 15 Minuten
- Wiederholungsmessungen: 10
- Optimale Messdauer: 60 Sekunden pro Einzelmessung zur besseren Gewichtung großer Agglomerate.
- Möglichst intensitätsgewichtete Kurven zur Auswertung der Rohdaten verwenden.
- Wenn Peaks im Bereich größer 2-3 μm auftauchen, ignorieren oder von Anfang an die Auswertung auf eine maximale Partikelgröße von 2 μm begrenzen. Angabe der Grenzen im Protokoll.
- Wenn Geräte bei einem anderen (kleineren) Winkel (theta) messen, muss die Messdauer verlängert werden, da gilt: $t \sim \sin^2(\theta/2)$.
- Auswertung der Daten mit der „Cumulants Method“
- Messung von 3 unabhängigen Wiederholungen
- Experimentelle Bestimmung der Eindringtiefe („Measurement Position“) und die Festlegung auf 1,5 mm (Abstand des Streuzentrums von der laserzugewandten Küvettenwand).
- Protollierung der Amplituden der Autokorrelationsfunktion $G(2)$ der einzelnen Messungen. Zur Abschätzung wird der Wert von $G(2)$ des 3. Kanals entsprechend $\square = 3 \mu\text{s}$ abgelesen.
- Die Streuintensitäten und die Abschwächung des Lasers werden ebenfalls in das Messprotokoll eingetragen.
- Die Messung von Standardpartikeldispersionen werden mit Hintergrundelektrolyt 10 mM NaCl durchgeführt nach Empfehlung vom NIST [Hackley et al. 2010, NIST-NCL PCC 1].

1.2 SOP zur Durchführung der Zetapotentialbestimmung mit der Methode der elektrophoretischen Lichtstreuung (ELS) nach Vorschlägen des NCL [Clogston et al. 2009, NCL Method PCC-2]

- Vor der Messung schütteln
- Sind Kontamination oder Sedimentation sichtbar, Eintrag ins Messprotokoll
- Reinigung der Messzelle zunächst mit MilliQ-Wasser, dann mit Ethanol, dann wieder mit MilliQ-Wasser. (Alternativ: Verwendung von Micro90 Reinigungslösung (2%) vor jeder neuen Messreihe.)
- Filterung des Mediums mit dem die Proben angesetzt werden mit max. 0.1 μm Porengröße. (Alternativ: Weiterverwendung von 0.45 μm regenerierte Cellulose Filtern.)
- Messung des pH Wertes der Probe vor und nach jeder Messung. (Alternativ: Nur vor jeder Messung.)
- Messzelle mit einem Probenvolumen von 5 mL befüllen (für BeckmanCoulter DelsaNanoC)
- Optische Prüfung des Messvolumens der Messzelle. Sind Gasbläschen vorhanden muss die Zelle neu befüllt werden.
- Optimale Messtemperatur: 25 °C
- Optimale Equilibrierung vor der Messung: 15 min. Mindestens Equilibrierung von 2 min. bei einem Temperaturunterschied innerhalb von $\Delta T \pm 1^\circ\text{C}$.
- 3 Wiederholungen
- Kleine Spannungen an den Elektroden verwenden ($\approx 80\text{ V}$, max. 150 V, beim BeckmanCoulter DelsaNanoC: elektr. Feldstärke $E \approx 16\text{ V/cm}$)
- Mit dem Beckman-Coulter DelsaNanoC wird an fünf Messpositionen in der Zelle 40 s lang die Frequenzverschiebung Δf gemessen.
- Resultierende Messdauer: 10 min.
- Analyse der Messung mit der Lorentz-Fit-Funktion unter der Annahme eines Frequenzpeaks
- Umrechnung mit der Smoluchowski-Gleichung. Die Henry Funktion ist hier $f(\kappa a) = 1.5$ gesetzt, welches für Ionenstärken $I \geq 10\text{ mM}$ gilt.
- Messung von 3 unabhängigen Wiederholungen
- Daten die ins Messprotokoll gehören: Zetapotential inkl. Standardabweichung (und Anzahl der Wiederholungen) $\zeta \pm \Delta\zeta$, Temperatur, pH, Probenkonzentration, Medienzusammensetzung. Als zusätzliche Parameter können angegeben werden: Angewendete Näherung der Henry-Funktion, Viskosität des Mediums, dielektrische Konstante, angelegte Spannung, Gerätetyp, Messzellentyp.
- Werte des Zetapotentials im Bereich $-10\text{ mV} \leq \zeta \leq +10\text{ mV}$ werden als neutral angesehen.
- Einstellung des pH-Wertes der Probe mit Natriumhydroxid und Salzsäure mit jeweils max. 0.1 mol/L tropfenweise ($\approx 1 - 3\ \mu\text{L}$). (Alternativ: Benutzung von Salpetersäure; Vorteil: keine Fällung oder Komplexierung von Silberionen; Nachteil: bei niedrigem pH wird Ag^0 oxidiert.)

- Der im Projekt vereinbarte Polystyrol-Latex Zetapotential-Standardpartikel wird gemessen in 6.5 mM NaCl, 1.1 mM Natriumazid, 1.4 mM Natriumdodecylsulfat bei pH 9.1. Der Puffer ist 1 mM H₃BO₃/Natriumborat. Die resultierende Ionenstärke ist 10 mmol/L.
- Für die Auswertung der Standardpartikel werden die Daten für 10 mmol/L NaCl in Wasser $\eta = 0.891$ cP, $\rho = 78.6$ bei 25 °C benutzt.

1.3 SOP zur Bestimmung der Silber-Konzentration mittels Atomabsorptionsspektroskopie

1.3.1 Geräte, Verbrauchsmittel und Chemikalien

Geräte

Atomabsorptionsspektrometer (AAS)

Abzug

Thermoblock für 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße

Tischzentrifuge für 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße

Variable Einkanalpipetten 10 - 100 μ L und 100 – 1000 μ L

Vortex

Ständer für Eppendorf-Reaktionsgefäße

Ständer für 15 mL und 50 mL Zentrifugenröhrchen

Ständer für AAS—Reaktionsgefäße

Für die Stamm bzw. Standardlösungen: 3 Messkolben 1000 mL und 2 Messkolben 100 mL

Verbrauchsmittel

15 und 50 mL Einweg-Zentrifugenröhrchen

5 und 10 mL serologische Einweg-Pipetten

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 mL

Pipettenspitzen gelb und blau

Braune Flaschen aus Polyethylen, ca. 100 mL

Cups für den AAS-Autosampler

Alle Einweg-Verbrauchsmittel nur einmal benutzen!!!

Chemikalien

AgNO₃ p.a., $\geq 99,9\%$

Bidestilliertes Wasser

Salpetersäure 65% p.a. (HNO₃, $\rho = 1,4$ g/mL)

Salzsäure konzentriert 37% p.a. (HCl, $\rho = 1,18$ g/mL)

Verdünntes Königswasser (450 mL Bidest, 440 ml HCl konzentriert und 110 mL HNO₃)

1% HNO₃ (989 mL Bidest und 11 mL HNO₃)

Silberstandard (AgNO₃) für AAS mit 20 μ g/L in 1% HNO₃

Silberstammlösungen (AgNO₃) mit: 10 g/L, 1g/L, 100 mg/L, 10 mg/L in 1% HNO₃

Matrixmodifizier: Palladiumnitrat 1g/L

1% HNO₃ ultrarein für Blindwert, internen Ag-Eichstandard und Waschwasser der AAS Anlage

1.3.2 Ansetzen der Ag-Stamm, bzw. Standardlösungen nach DIN 38 406 Teil 18

Silber-Stammlösung A ($\beta(\text{Ag}) = 1000 \text{ mg/L}$)

1,5748 g AgNO_3 werden abgewogen und in einen 1 L Messkolben gefüllt. Es werden 11 mL der konzentrierten HNO_3 (65%, $d = 1.4 \text{ g/L}$) dazu gegeben und mit bidest. Wasser auf ein Liter aufgefüllt.

Silber-Stammlösung B ($\beta(\text{Ag}) = 10 \text{ g/L}$):

1,5748 g AgNO_3 werden abgewogen und in einen 100 mL Messkolben gefüllt. Es werden 1,1 mL der konzentrierten HNO_3 (65%, $d = 1.4 \text{ g/L}$) dazu gegeben und mit bidest. Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

Silber-Standardlösung I ($\beta(\text{Ag}) = 10 \text{ mg/L}$):

10 mL der Silber-Stammlösung A (oben) werden in einen 1 L Messkolben pipettiert. Es werden 11 mL der konzentrierten HNO_3 (65%, $d = 1.4 \text{ g/L}$) dazu gegeben und mit bidest. Wasser auf ein Liter aufgefüllt.

Silber-Standardlösung 0 ($\beta(\text{Ag}) = 100 \text{ mg/L}$):

10 mL der Silber-Stammlösung A (1000 mg/L) werden in einen 100 mL Messkolben pipettiert. Es werden 1,1 mL der konzentrierten HNO_3 (65%, $d = 1.4 \text{ g/L}$) dazu gegeben und mit bidest. Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

Silber-Standardlösung II ($\beta(\text{Ag}) = 100 \mu\text{g/L}$):

10 mL der Silber-Standardlösung I (oben) werden in einen 1 L Messkolben pipettiert. Dann werden 11 mL konz. HNO_3 (65%) dazu gegeben und mit bidest. Wasser aufgefüllt. Diese Lösung ist laut DIN am Meßtag frisch herzustellen.

Silber-Standardlösung III ($\beta(\text{Ag}) = 20 \mu\text{g/L}$) für den internen Standard

50 μL der Silber-Standardlösung I (10 mg/L, siehe oben) werden in einen 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Dazu werden 275 μL konz. HNO_3 gegeben und mit bidest. Wasser auf 25 mL aufgefüllt. Diese Lösung ist am Messtag frisch herzustellen.

Vorbereitung der Messkolben laut EN ISO 15587-1:2002 (Königswasser-Aufschluss): Sorgfältig waschen mit warmer 10% Salpetersäure, dann mit bidest. Wasser spülen.

Alle Silber-Lösungen in braunen Polyethylenflaschen aufbewahren.

1.3.3 Ansetzen der Ag-Eichstandards im Medium

Je 50, 100, 150 oder 200 μL der o.g. Silber-Standardlösungen (0, I,) bzw. Stammlösungen (A, B) werden mit der korrespondierenden Menge 1% HNO_3 zum Endvolumen von 1 mL in 1,5 mL Eppendorf -Reaktionsgefäßen verdünnt.

100 μL des jeweiligen Mediums (Alge, *Lemna* etc.) werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, je 10 μL der Silber-Eichstandard, bzw. 10 μL der 1% HNO_3 für den Blank, dazu pipettiert und gründlich vermischt.

1.3.4 Veraschung (um alle Rückstände aus Medium o.ä. zu entfernen)

In alle -Reaktionsgefäße mit den 100 µL Medium + 10 µL AgNO₃ Eichstandard werden 80 µL der konzentrierten Salzsäure und 20 µL der konzentrierten Salpetersäure pipettiert. Alle Reaktionsgefäße schließen, für ca. 5 Sekunden vortexen, in der Tischzentrifuge ca. 30 Sekunden bei 10.000 U/min (entspricht 6710 g) zentrifugieren. Die Reaktionsgefäße in den Thermoblock überführen und öffnen. Bei 56 °C über Nacht veraschen. Wenn danach noch Flüssigkeit in den -Reaktionsgefäße ist bei maximal 95 °C Temperatur verdampfen. Reaktionsgefäße aus dem Thermoblock nehmen und schließen, wenn sie auf RT abgekühlt sind oder sofort weiter bearbeiten.

1.3.5 Verdünnung für AAS Meßbereich

50 mL verdünntes Königswasser (22,5 mL Bidest, 22 ml HCl, 5,5 ml HNO₃) oder mehr (bei mehreren Verdünnungsschritten oder vielen Proben) ansetzen.

1 mL verdünntes Königswasser in die Eppendorf Reaktionsgefäße pipettieren, Reaktionsgefäße schließen, ca. 30 Sekunden vortexen, in die Zentrifuge überführen und 5 min bei 10.000 Umdrehungen/min (6710 g) zentrifugieren. Je 700 µl der Proben in neue Eppendorf-Cups überführen.

Gegebenenfalls weiter um Faktor 10, 100 oder 1000 mit verdünntem Königswasser verdünnen (z.B. 70 µL Probe +630 µL verd. Königswasser) bis die nominalen Endkonzentrationen von 5, 10, 15 und 20 µg/L eingestellt sind.

Je 700 µL der Proben mit der Pipette in das Autosampler Cup überführen.

1.3.6 Durchführung der Messungen am AAS Unicam 989QZ

Für das Unicam 989QZ wird eine_Hohlkathoden-Silberlampe von PerkinElmer (Part # 303-6064) benutzt. Der Lampenstrom ist auf 90% (9 mA) festgelegt. Der Monochromator wird auf $\lambda = 328.1$ nm eingestellt. Die Spaltbreite beträgt 0.5 nm. Es wird die Zeeman-Korrektur benutzt. Das verwendete Graphitrohr ist beschichtet und hat eine L'vov Plattform. Folgendes Temperaturprogramm wurde für das beschichtete Graphitrohr gewählt:

	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Aufheizung [°C/s]	Argonstrom [mL/min]
1)	120	15	10	200
2)	160	15	10	200
3)	600	15	150	200
4)	200	5	10	200
5)	1900	5		0 (Messung)
6)	2500	3	0	200

Die Proben werden mit dem Matrixmodifier Palladiumnitrat (1g/L in 1% HNO₃) zusammen gemessen. Die Probenvolumina sind 12µL plus 3µL Matrixmodifier. Die Absorption des Silberstandards mit 20 µg/L ist dann ca. 0.45 A·s (Peakfläche). Pro Probe wurden 3 Wiederholungen festgelegt. Der Akzeptanzlevel beträgt 90%.

Vor Beginn der Messung werden Absorptionswerte für den Blindwert (1% HNO₃ ultrarein), den internen Ag-Eichstandard (20 µg/L AgNO₃ und HNO₃ ultrarein) und das verdünnte Königswasser geprüft. Die interne Kalibrierung erfolgt mit dem Ag-Eichstandard (20 µg/L) mit 4 unterschiedlichen Probenvolumina, entsprechend der Ag-Konzentration von 5, 10, 15 und 20 µg/L.

1.3.7 Auswertung der Daten

Die Daten werden aus dem Textformat in ein Excel-Tabellenblatt importiert. Berechnet werden alle Konzentrationen aus der Signalfäche (A·s). Der Mittelwert der Absorption des Blanks wird von den Mittelwerten der Messdaten (aus 3 Wiederholungen/Probe) subtrahiert. Interner Standard, bzw. Kalibrierung und die anderen Messdaten werden als Funktion der Nominalkonzentration dargestellt. Für die Kalibrierung wird die Steigung ermittelt. Damit werden die reale Konzentration der anderen Proben und deren Wiederfindungsrate berechnet.

Ausgabedatum: 14.02.2012

1.4 SOP zur Reinigung von Glasgefäßen

(nach Martin Hoppe, BGR Hannover, ergänzt von Jan Köser, UFT Bremen) 01.03.2012

Die Gefäße werden in einer Kombination von Laugenbad und Säurebad gereinigt.

- 1.) Laugebad: Die Glasgefäße werden in einem Bad mit Mucosol (3%) mindestens über Nacht stehen gelassen bei Raumtemperatur. (Laut Hersteller Merz hat die 3% Verdünnung des Mucosol einen pH-Wert von 11.7 bei 20 °C).
- 2.) Nach dem Spülen der Gefäße mit reichlich Leitungswasser werden die Gefäße in einer Spülmaschine gereinigt.
- 3.) Säurebad: Dann werden die Gefäße in ein Säurebad (HNO_3 2%) mindestens über Nacht bei Raumtemperatur gelegt.
- 4.) Spülen mit reichlich entionisiertem Wasser und zum Schluss mit bidest. Wasser.

Die Lösungen in den Bädern werden bitte jedes Mal neu angesetzt und nach der Benutzung entsorgt.

Diese Vorgehensweise hat für Gefäße, die mit Silbernanopartikeldispersionen (JRC NM300K) bis zu einer Konzentration von 50 mg/L in Kontakt gekommen sind, keine messbare Kontamination ergeben.

Für höhere Konzentrationen von Silbernanopartikeldispersionen (>50 mg/L) kann als Säurebad sicherheitshalber HNO_3 10% benutzt werden. Danach bitte sehr ausgiebig mit entionisiertem Wasser spülen. Zum Schluß wieder mit bidest. Wasser spülen.

Größere Glasgefäße, die nicht in die Bäder passen, werden so hoch mit den jeweiligen Lösungen befüllt, dass die vorherige Füllhöhe der Silbernanopartikeldispersionen gut überschritten wird.

3 Berichtsblatt / Document Control Sheet

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Abschätzung der Umweltgefährdung durch Silber-Nanomaterialien: vom chemischen Partikel zum technischen Produkt (UMSICHT)	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Köser, Jan, Engelke, Maria, Kück, Andrea, Lesnikov, Elena, Arning, Jürgen, Thöming, Jorg, Filser, Juliane	5. Abschlussdatum des Vorhabens April 2013
	6. Veröffentlichungsdatum geplant
	7. Form der Publikation Schlussbericht; zusätzlich Teile in Fachzeitschriften
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universität Bremen, UFT – Zentrum für Umweltforschung und nachhaltige Technologien, Leobener Str., 28359 Bremen	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 03X0091A
	11. Seitenzahl 101
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 78
	14. Tabellen 16
	15. Abbildungen 56
16. Zusätzliche Angaben Folgebericht zu Zwischenberichten des gleichnamigen Vorhabens	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung: Silbernanopartikel (AgNP) werden in immer mehr verbrauchernahen Produkten verwendet und können so in die Umwelt gelangen. Mögliche daraus resultierende Risiken sind nicht hinreichend verstanden und können je nach Art der Partikel und des jeweiligen Umgebungsmediums sehr verschieden sein. Verschiedene AgNP wurden über Nasssynthese und mit Hilfe der Mikroreaktionstechnik hergestellt. Durch Optimierung des Verfahrens wurde eine kontinuierliche Herstellung von Silbernanopartikeln in den benötigten Mengen und mit reproduzierbaren Qualitätsmerkmalen möglich. Die Variation der Coatings wurde anschließend diskontinuierlich durchgeführt. Diese Partikel sowie nasschemisch produzierte OECD-Standard-AgNP, über Projektpartner mit Hilfe von Flammenspraypyrolyse hergestellte Kompositpartikel aus Titandioxid mit oberflächlich aufgetragenen AgNP und Silbernitrat als Referenz wurden in verschiedenen aquatischen und terrestrischen Standard-Testsystemen untersucht, die z.T. optimiert bzw. miniaturisiert wurden. Die Messgrößen beinhalteten das Wachstum von Algen und Wasserlinsen, die Aktivität ausgewählter Enzyme (u.a. von terrestrischen und marinen Bakterien) sowie die Reproduktion von Collembolen und Daphnien. Die Partikel in den jeweiligen Testmedien wurden über UV-vis-Spektrum, dynamische Lichtstreuung und Zetapotential charakterisiert. Die Freisetzung von Silberionen aus den AgNP und deren weiteres Schicksal (Speziierung) wurden für die verschiedenen Umweltmedien mit Membranfiltration experimentell bestimmt und mit numerischen Methoden simuliert. Die überraschend gute Übereinstimmung zeigt, dass die Speziierung sehr verlässlich durch die Thermodynamik der Reaktionssysteme vorhergesagt werden kann, wenn bestimmte Redoxgleichgewichte als kinetisch gehemmt angenommen werden. Das Partikelverhalten, insbesondere die Speziierung, änderte sich je nach Testmedium deutlich. Auffällig war dies im Daphnien-Kulturmedium, in dem die Partikel agglomerierten. Die Sensitivität der Testsysteme unterschied sich sehr stark; Tests mit Süßwasserorganismen waren deutlich empfindlicher als Tests mit Boden- oder marinen Organismen. Meist war Silbernitrat um etwa eine Größenordnung toxischer als AgNP, dies galt jedoch nicht für TiO ₂ -AgNP und Langzeitwirkungen von AgNP-dotiertem Klärschlamm auf Collembolen. Die Lebenszyklusanalyse ergab bei den derzeit eingesetzten Mengen an AgNP eine insgesamt geringe Umweltexposition mit AgNP. Eine Anreicherung über die Schadensschwelle hinaus ist jedoch bei Ausbringung von Klärschlamm über längere Zeiträume nicht auszuschließen.	
19. Schlagwörter Silbernanopartikel – Herstellung – Charakterisierung – Umweltverhalten – Wirkungsschwellen – Testverfahren - Lebenszyklusanalyse	
20. Verlag	21. Preis

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN intended	2. type of document (e.g. report, publication) final report	
3. title "Environmental hazard and risk assessment of silver nanomaterials: from chemical particles to technological products ,		
4. author(s) (family name, first name(s)) Köser, Jan Engelke, Maria Kück, Andrea Lesnikov, Elena Arning, Jürgen Thöming, Jorg Filser, Juliane	5. end of project April 2013	
	6. publication date intended	
	7. form of publication final report; additionally parts in professional journals	
8. performing organization(s) (name, address)	9. originator's report no.	
	10. reference no. 03X0091A	
	11. no. of pages 101	
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 78	
	14. no. of tables 16	
	15. no. of figures 56	
16. supplementary notes ---		
17. presented at (title, place, date) ---		
18. abstract Silver nanoparticles (AgNP) are used more and more in products convenient for consumers and therefore can end in the environment. Risks possibly resulting therefrom are not sufficiently understood and can be very different – depending on the kind of particles and the respective environmental medium. Various AgNP have been produced by means of wet synthesis and microreaction technique. A continuous production of AGNP in required quantities and with reproducible quality features could be achieved by optimization of the procedure. Subsequently, the variation of the coatings was carried out discontinuously. These particles as well as wet-chemically produced AgNP according to OECD-standard, composite particles (AgNP-doped titanium dioxide produced by project partners using flame spray pyrolysis) and silver nitrate as reference were tested using different aquatic and terrestrial standard test methods which partly were optimized respectively minaturized. The measurements included the growth of algae and duckweed, the activity of selected enzymes (e. g. of terrestrial and marine bacteria) as well as the reproduction of springtails and daphnids. The particles in the respective test media have been characterized via UV-vis-spectrum, dynamic light scattering and zeta potential. The release of silver ions from the AgNP and their further destination (speciation) in the different environmental media were experimentally identified with membrane filtration and simulated with numerical methods. The surprisingly good conformity shows that the thermodynamics of reaction kinetics can be reliably predicted by speciation if certain redox equilibriums are assumed as kinetically inhibited. Particle behavior, particularly speciation, considerably varied between test systems, e.g. in Daphnia culture medium where particles agglomerated. The sensitivity of test systems showed pronounced differences, tests with limnic organisms being clearly more sensitive than with soil or marine organisms. Usually silver nitrate was one order of magnitude more toxic than AgNP. This was however not the case for TiO ₂ -AgNP and long-term effects of AgNP-spiked sewage sludge on Collembola. Life cycle assessment at present use overall rendered low environmental exposure with AgNP. An accumulation beyond toxic thresholds can however not be excluded when sewage sludge is applied over longer periods of time.		
19. keywords silver nanoparticles – production – characterization – environmental behaviour – effect thresholds – test method – life-cycle analysis		
20. publisher	21. price	