

TEXTE

06/2013

Prüfung zweier ausgewählter Nanomaterialien (Silber und Titandioxid) hinsichtlich ihrer ökotoxikologischen Langzeitwirkungen

Anpassung der Prüfverfahren

Kurzfassung

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungskennzahl 3709 65 418
UBA-FB 001658/KURZ/E

**Prüfung zweier ausgewählter
Nanomaterialien (Silber und
Titandioxid) hinsichtlich ihrer
ökotoxikologischen Langzeitwirkungen -
Anpassung der Prüfverfahren**

Kurzfassung

von

Dr. Christoph Schäfers
Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME,
Schmallenberg

und

Dr. Mirco Weil
ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

UMWELTBUNDESAMT

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter <http://www.uba.de/uba-info-medien/4435.html> verfügbar.

Die in der Studie geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

ISSN 1862-4804

Durchführung der Studie: Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME
57392 Schmallenberg

ECT Oekotoxikologie GmbH
65439 Flörsheim

Abschlussdatum: Juli 2012

Herausgeber: Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel.: 0340/2103-0
Telefax: 0340/2103 2285
E-Mail: info@umweltbundesamt.de
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>
<http://fuer-mensch-und-umwelt.de/>

Redaktion: Fachgebiet IV 2.2 Arzneimittel, Wasch- und Reinigungsmittel
Doris Völker

Dessau-Roßlau, März 2013

1 Einleitung

Das Verhalten und die Wirkung von Nanopartikeln in der Umwelt sind noch nicht ausreichend erforscht, um eine umfangreiche Risikobeurteilung durchzuführen [1–3]. Ein Ansatz, diese Wissenslücken zu reduzieren, ist die Untersuchung ausgewählter Nanopartikel durch Mitgliedsstaaten der OECD im Rahmen der "Working-Party on Manufactured Nanomaterials". Dabei repräsentiert Deutschland einen Sponsor für nanopartikuläres Titandioxid (nTiO₂) und muss eine Umweltbewertung durchführen, für nanopartikuläres Silber (nAg) ist Deutschland Co-sponsor und trägt zur Erstellung einer Umweltbewertung bei. Für diese Umweltbewertung werden existierende Daten aus ökotoxikologischen Versuchen zusammengefasst und Bereiche identifiziert, in denen noch keine Daten vorliegen. Bisher liegen wenige Daten zur chronischen Toxizität von nTiO₂ und nAg vor. Deshalb wurden im Laufe des in diesem Bericht dargestellten Teilprojekts Versuche zur chronischen Toxizität von nTiO₂ auf den sedimentbewohnenden Wurm *Lumbriculus variegatus* und die terrestrisch lebende Milbe *Hypoaspis aculeifer* durchgeführt. In einem weiteren Teilprojekt wurde die chronische Toxizität von nAg auf frühe Lebensstadien des Fisches *Danio rerio* untersucht. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse mit anderen Studien zu gewähren, wurden die Versuche basierend auf den entsprechenden OECD-Richtlinien durchgeführt. Begleitend zu den Versuchen wurden Untersuchungen zum Agglomerationsverhalten der Partikel in den Expositionsmedien, den eingesetzten Konzentrationen und der Aufnahme der Partikel in die Testorganismen durchgeführt.

Testmaterial

Die in diesem Bericht dargestellten Versuche wurden mit nanopartikulärem Titandioxid P25 (NM-105) und Nanosilber (NM-300 K) durchgeführt.

Die Dispersionen, die zur Applikation des NM-105 in das terrestrische und das aquatische Testsystem verwendet wurden, wurden durch Einwaage einer entsprechenden Menge des Testmaterials und Zugabe des entsprechenden Volumens deionisierten Wassers hergestellt. Anschließend wurde die Dispersion für eine Minute bei 900 Umdrehungen pro Minute auf einem Magnetrührer gerührt und im Anschluss in einem Ultraschallbad für drei Minuten behandelt [4].

Messung der Partikelgrößen und Metallgehalte

Während der Expositionen wurden Messungen zum Verhalten (z. B. Agglomerationszustand) der Partikel in den Testmatrizes durchgeführt. Zur Überprüfung der eingesetzten Partikelkonzentrationen im Wasser wurden die Gesamtmetallkonzentrationen analytisch überprüft. Die Agglomeratgrößenverteilung wurde mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Außerdem wurden Testorganismen aus dem Sediment-Kontakt-Test hinsichtlich der Aufnahme von NM-105 in den Organismus untersucht.

2 Sediment-Kontakt-Test mit *Lumbriculus variegatus*

Für die Untersuchung der Wirkung von NM-105 auf den aquatischen sedimentbewohnenden Oligochaet *Lumbriculus variegatus* wurden zwei Haupttests nach OECD 225 [5] durchgeführt. Die Applikation von NM-105 erfolgte dabei abweichend zur entsprechenden Richtlinie [5] über die Wasserphase und nicht über das Sediment.

Am Vortag des Expositionsbeginns wurden die Testgefäße mit Sediment gefüllt. Die Hälfte des finalen Volumens des überstehenden Wassers wurde vorsichtig auf das Sediment gegeben. Anschließend wurden die Würmer in die Testgefäße eingesetzt. Die Testgefäße wurden über Nacht unter Testbedingungen

inkubiert, damit die Würmer sich eingraben konnten. Am nächsten Tag erfolgte Exposition gegenüber NM-105 durch Applikation der Dispersionen. Nach Zugabe der Dispersionen wurden die Testmedien kurz mit einem Glasstab gerührt. Die Tests wurden anschließend unter den in Tabelle 1 genannten Bedingungen inkubiert.

Tabelle 1: Expositionsbedingungen im Sediment-Kontakt-Test mit *Lumbriculus variegatus*.

Testorganismus:	<i>Lumbriculus variegatus</i> (Müller), adulte Würmer mit synchronisiertem Reproduktionszyklus
Anzahl Testorganismen je Gefäß:	10 Würmer je Testgefäß; Testbeginn 10 d nach Synchronisation
Wasserkörper:	Für die Haltung der Lumbriculiden und in den Tests wurde rekonstituiertes Wasser nach [6] verwendet. Im ersten Haupttest mit <i>L. variegatus</i> wurde neben rekonstituiertem Wasser auch das am IME üblicherweise in Tests eingesetzte Medium verwendet. Dabei handelt es sich um aktivkohlefiltriertes, aufgehärtetes und sauerstoffgesättigtes Leitungswasser.
Sediment:	Kunstsediment nach [5]
Testdauer:	28 Tage
Endpunkte:	Überleben, Reproduktion und Biomasse (Trockengewicht) Zusätzlich wurde in Wurmern aus dem zweiten Haupttest die Titankonzentration gemessen.
Biologische Parameter:	Anzahl der Würmer, Trockengewicht der Würmer in jedem Replikat
Testgefäße:	Glasgefäße, 250 mL mit Plastikdeckel
Sediment pro Testgefäß:	80 g Frischgewicht
Sedimenthöhe pro Testgefäß:	ca. 1,5 cm
Volumen des Wasserkörpers:	180 mL
Belüftung der Testgefäße:	durchgängige Belüftung während Konditionierungs-, Äquilibrierungs- und Expositionsphase; Kontrolle: täglich an Werktagen
Fütterung während der Exposition:	Futter in Sediment (Brennnessel- und Cellulosepulver)
Wasserwechsel:	statisches Testsystem; regelmäßiger Ausgleich von verdunstetem Wasser
Validität:	In den beiden Haupttests mit <i>L. variegatus</i> wurden alle in der Richtlinie [4] genannten Validitätsparameter erfüllt.
Temperatur:	20,8 - 21,5°C (n = 54)
Lichtregime:	16 Licht : 8 dunkel

Ergebnisse der Haupttests mit *L. variegatus*

Die im überstehenden Medium gemessenen Agglomeratgrößen lagen bei Testbeginn zwischen 402 und 1325 nm. Sieben Tage nach Beginn der Exposition unterscheiden sich die gemessenen Partikelgrößen nicht von den in den Kontrollen gemessenen Werte. Dies deutet auf ein vollständiges Sedimentieren der Partikel aus der Wasserphase hin.

Das untersuchte Nanomaterial NM-105 hatte im ersten Haupttest bis zur höchsten Testkonzentration von 100 mg/L keinen signifikanten Einfluss auf die beiden erhobenen Endpunkte in den Lumbriculiden.

Mit dem zweiten Haupttest sollten die Ergebnisse des ersten Haupttests bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde ein Limit-Test mit der höchsten Testkonzentration (100 mg/L), in der im vorhergehenden Versuch kein Effekt auftrat, und einer Kontrolle durchgeführt. Die zu Testbeginn mittels chemischer Analyse gemessenen Konzentrationen stimmen gut mit den nominalen Konzentrationen überein. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und der Behandlung (100 mg/L).

Der Endpunkt Gewicht wurde als Frischgewicht bestimmt, außerdem wurden alle Würmer einer Konzentrationsstufe vor der Messung gepoolt, um sie anschließend direkt zur chemischen Analytik der Titankonzentration weiterzugeben. Die chemische Analytik der Würmer ergab die folgenden Ergebnisse: $100 \pm 1 \mu\text{g Titan/g Wurm}$ (Trockengewicht) in den Kontrollen und $112 \pm 12 \mu\text{g Titan/g Wurm}$ (Trockengewicht) in der Behandlung (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und der Behandlung.

3 Reproduktionstest mit *Hypoaspis aculeifer*

Der Einfluss von NM-105 auf das Überleben und die Reproduktion der terrestrisch lebenden Raubmilbe *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* CANESTRINI (Acari: Laelapidae) wurde für jeweils 14 Tage in einem Dosis-Findungstest und zwei Haupttests nach OECD 226 [7] untersucht (Tabelle 2).

Tabelle 2: Expositionsbedingungen in den Reproduktionstests mit *Hypoaspis aculeifer*.

Testorganismus:	<i>Hypoaspis aculeifer</i> (Canestrini), synchronisiertes Alter
Anzahl Testorganismen je Gefäß:	10 adulte, gravide Weibchen je Testgefäß, 28 – 35 Tage alt
Substrat:	Kunsterde nach OECD 226 (2008)
Testdauer:	14 Tage
Endpunkte:	Reproduktion, Überleben
Biologische Parameter:	Anzahl juvenile Milben, Anzahl adulte Milben in jedem Replikat
Testgefäße:	Glasgefäße, 200 mL ; Abdeckung mit perforiertem Parafilm
Substrat pro Testgefäß:	20 g (Trockengewicht)
Fütterung während der Exposition:	3, 7 und 10 Tage nach Expositionsbeginn mit Milben der Art <i>Tyrophagus putrescentiae</i>
Validität:	In dem Dosis-Findungstest und den beiden Haupttests mit <i>H. aculeifer</i> wurden alle in der Richtlinie [6] genannten Validitätsparameter erfüllt
pH-Wert:	6,1 – 6,7
Bodenfeuchte:	48,3 – 56,9% der WHKmax
Temperatur:	20,2 – 21,3°C
Lichtregime:	16 : 8 h hell-dunkel-Rhythmus Beleuchtungsstärke: 541 – 703 lx

Die Testkonzentrationen 1 und 10 mg/kg wurden durch Applikation von 20 mL bzw. 50 mL Dispersion hergestellt. Die Kunsterde war zum Zeitpunkt der Applikation vorbefeuchtet, die endgültige Feuchte der Kunsterde wurde durch Applikation der Dispersion auf 40 - 60% der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt [8]. Die Testkonzentrationen 100 und 1000 mg/kg wurden durch Mischen des pulverförmigen Testmaterials in das Substrat hergestellt, die Feuchte von 40 - 60% der maximalen Wasserhaltekapazität wurde vor Applikation des Pulvers eingestellt. Um einen möglichen Einfluss der Applikationsmethode auf die Toxizität des Testmaterials erfassen zu können, wurde die Testkonzentration 10 mg/kg zusätzlich mittels Applikation des Pulvers hergestellt. Anschließend wurde die erforderliche Menge des Substrates (20 g TG je Prüfgefäß) eingewogen und zehn adulte Weibchen aus den vorbereiteten Synchronisationszuchten eingesetzt.

3.1 Ergebnisse des Dosis-Findungstests mit *Hypoaspis aculeifer*

Der Vergleich der Ergebnisse aus der Exposition gegenüber NM-105 mit der Kontrolle zeigt signifikante Effekte des Testmaterials auf die Anzahl juveniler Milben in der höchsten Testkonzentration (1000 mg/kg). Die niedrigste untersuchte Testkonzentration (1 mg/kg) hatte signifikante Effekte auf die Anzahl juveniler Milben und das Überleben der adulten Milben. In den mittleren untersuchten Testkonzentrationen (10 und 100 mg/kg) wurde für keinen der untersuchten Endpunkte ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt.

3.2 Ergebnisse der Haupttests mit *Hypoaspis aculeifer*

Im ersten Haupttest ergaben sich für keinen der erhobenen Endpunkte signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und den Behandlungen.

Der zweite Haupttest wurde wie geplant zur Bestätigung der vorher erhaltenen Ergebnisse als Limit-Test durchgeführt. Da die beiden bisher durchgeführten Tests allerdings nicht absolut gleiche Ergebnisse erbrachten, wurden zwei Testkonzentrationen und eine Kontrolle untersucht. Der Vergleich der Ergebnisse aus der Exposition gegenüber NM-105 mit der Kontrolle zeigt signifikante Effekte des Testmaterials auf die Anzahl juveniler Milben in beiden untersuchten Testkonzentrationen (1 und 1000 mg/kg). Es gab keinen Effekt auf das Überleben der adulten Milben im Vergleich mit der Kontrolle (Abbildung 1).

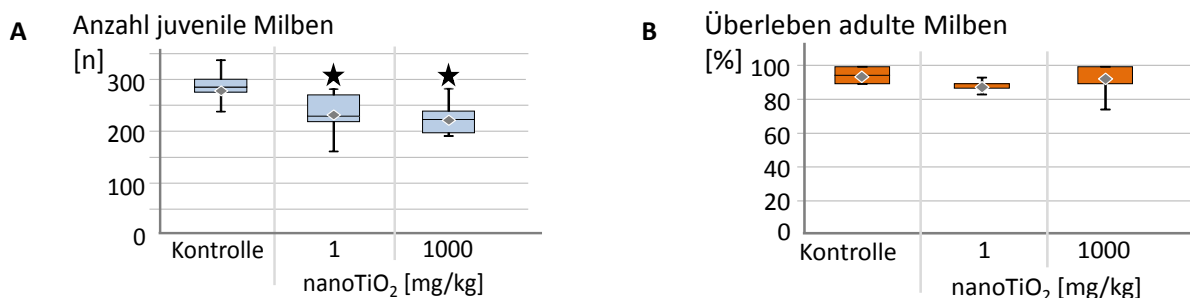


Abbildung 1: Ergebnisse des zweiten Haupttests mit *Hypoaspis aculeifer*.

A: Anzahl der juvenilen Milben.

B: Überleben der adulten Milben bezogen auf Zahl der eingesetzten Milben.

Die Boxen stellen die beiden mittleren Quartile dar, zwischen den Boxen liegt der Median; die Balken markieren minimale und maximale Werte; ◆: Mittelwert; n = 8 (Kontrolle und Behandlungen). ★: Signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrolle (Student t-Test; $p \leq 0,05$).

4 Zusammenfassung der Langzeittests mit Titandioxid

In allen Tests, die in diesem Bericht dargestellt sind, wurden die in den entsprechenden Richtlinien genannten Validitätsparameter erfüllt. Die während den Expositionen gemessenen physikalisch-chemischen Parameter liegen innerhalb der empfohlenen Bereiche. In den jeweiligen Tests mit beiden Organismen zeigen die Messungen der Partikelgröße, dass die Applikation des Nanomaterials in die Testsysteme reproduzierbar gelang. Die zu Beginn des Sediment-Tests gemessenen Konzentrationen stimmen gut mit den nominalen Konzentrationen überein.

Im Test mit dem aquatischen sedimentbewohnenden Wurm *Lumbriculus variegatus* traten nach 28-tägiger Exposition keine signifikanten Effekte auf die Reproduktion und die Biomasse der Würmer auf. Die Analyse der Titankonzentrationen in den Testorganismen nach Testende zeigte keinen signifikanten Unterschied in Würmern, die gegenüber 100 mg/L NM-105 exponiert waren im Vergleich zur Kontrolle.

Der Test mit der terrestrischen Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* führte nicht zu eindeutigen Ergebnissen, da in den Tests unterschiedliche Ergebnisse ermittelt wurden. Im Vorversuch zur Ermittlung eines geeigneten Testkonzentrationsbereichs wurden Effekte in der niedrigsten und der höchsten untersuchten Konzentration festgestellt (1 und 1000 mg/kg). Da in diesem Test die Überlebensrate der adulten Milbe bei 1 mg/kg im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Konzentrationen reduziert war, wurde vermutet, dass die eingesetzten Testorganismen möglicherweise aus nicht bestimmten Gründen außerhalb des Testsystems (z. B. Verletzung des Tieres bei Einsetzen ins Testgefäß) vor der Reproduktion starben. Im ersten Haupttest wurde dann derselbe Konzentrationsbereich untersucht; es wurden keine signifikanten Effekte auf die erhobenen Endpunkte Überleben und Reproduktion festgestellt. Der zweite Haupttest sollte diese Ergebnisse bestätigen. Allerdings wurden hier leichte, signifikante Effekte durch NM-105 in den beiden untersuchten Konzentrationen 1 und 1000 mg/kg auf die Reproduktion der Milben festgestellt. Der Unterschied der Anzahl an Nachkommen zur Kontrolle ist jedoch deutlich schwächer als im Dosis-Findungstest. Im Gegensatz zum Dosis-Findungstest war die Überlebensrate der adulten Milben in diesem Test aber nicht signifikant niedriger als in der Kontrolle oder der anderen untersuchten Testkonzentration.

Die Ergebnisse des aquatischen Tests mit *L. variegatus* sind vergleichbar mit Ergebnissen aus Studien mit dem ebenfalls in Sediment-Wasser-Systemen durchgeführten Test mit *Chironomus riparius*, die in dem Partnerprojekt (FKZ 3709 64 416) erhoben wurden.

Die Unterschiede im Auftreten von signifikanten Effekten in den verschiedenen Tests mit *H. aculeifer* sind vermutlich durch das Testdesign beeinflusst. In allen drei Tests ist die Reproduktion bei 1 mg NM-105/kg niedriger als in der entsprechenden Kontrolle. In den beiden Haupttests ist der Unterschied zwischen Reproduktion in der Kontrolle und bei 1 mg/kg sehr ähnlich. Durch die Verwendung von acht Replikaten im zweiten Haupttest wurde die Power des Tests deutlich erhöht, so dass bei der statistischen Auswertung der Daten signifikante Unterschiede bei geringeren Unterschieden festgestellt werden, als bei Verwendung einer niedrigen Replikatzahl. Da der Test im Standard-Design alle Validitätskriterien gut erfüllt, ist von einer NOEC von ≥ 1000 mg/kg auszugehen.

5 Fisch Early Life Stage-Test mit *Danio rerio* und Nanosilber

Für die Untersuchung der Wirkung von Nanosilber (NM-300 K) auf die frühen Lebensstadien von Fischen wurden zwei Haupttests mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) nach OECD 210 [9] durchgeführt. Da die Dosierung in einem Durchflusssystem von Nanopartikeln je nach dispersiven, adsorptiven und elektrostatischen Eigenschaften problematisch sein kann, wählten wir semistatische Expositionsbedingungen in großen Aquarien (240 L ständig bewegtes Testmedium), in die Brutkäfige für die als Pseudoreplikate fungierenden Versuchsgruppen (je 20 befruchtete Eier) eingehängt wurden. Zur Minimierung von Stress für die frühen Lebensstadien wurde der Wechsel des Expositionsmediums alle 7 Tage vorgenommen, indem die Tiere in ihren Brutkäfigen in frisch angesetzte Aquarien überführt wurden. In einem Orientierungstest über 7 Tage wurden die Stabilität der Partikelgröße (70-80 % der Partikel während der ersten 5 Tage konstant mit einer Größe von 50-60 nm bestimmt) und Homogenität der Verteilung (Aquarienmitte, Brutschalen: mittlere Konzentrationen 82-114% der Nominalkonzentration) bestätigt.

Tabelle 3: Testbedingungen für die Early Life Stage Tests mit *Danio rerio* und Nanosilber.

Testorganismus:	<i>Danio rerio</i> , Cyprinidae, Teleostii Der verwendete Stamm (Herkunft: West Aquarium GmbH, 37431 Bad Lauterberg) wird am Fraunhofer IME ohne Einkreuzung seit über 20 Jahren kultiviert. Er ist wildtypnah und entspricht in seiner Embryonal- und Sexualentwicklung Hisaoka et al. [10, 11] und Takahashi [12].
Testdauer:	35 Tage
Testgefäße:	Glasaquarien mit 240 L Testdispersion (unbelüftet)
Wasserkörper:	Aktivkohlefiltertes, aufgehärtetes und sauerstoffgesättigtes Leitungswasser, ständig bewegt durch vier eckständige Pumpen auf dem Aquarienboden.
Temperatur, Lichtregime:	26 ± 1°C; 14 h Licht : 10 h Dunkelheit
Anzahl der Testorganismen zu Teststart:	20 frisch befruchtete Eier je Pseudoreplikate (Brutkäfig)
Wasserwechsel:	Alle 7 Tage Transfer der Brutkäfige in neu angesetzte Aquarien
Endpunkte:	Schlupf, Überlebensrate, Größe bei Testende (Länge, Gewicht)
Fütterung während der Exposition:	Ab Tag 6: Aufzuchtfutter (Tetra, AZ 000, Tetra-Werke, Melle) zweimal täglich <i>ad libitum</i> ; ab Tag 16: Gemahlene TetraMin Flockenfutter zweimal täglich <i>ad libitum</i> ; ab Tag 9: Zufütterung von <i>Artemia salina</i> -Nauplien
Konzentrationsfindung:	Fischembryotest über 48 h: NOEC survival: 200 µg nAg/L; NOEC Herzschlagfrequenz: 100 µg nAg/L
Testdesign:	Orientierungstest: 1 Aquarium mit 4 Brutkäfigen; 400 µg nAg/L Haupttest 1: Je 1 Aquarium mit 4 Brutkäfigen; 200, 100, 50, 25 und 12.5 µg nAg/L, Kontrolle und Dispergent-Kontrolle Haupttest 2: Je 2 Aquarien mit 6 Brutkäfigen; 100, 50 und 12.5 µg nAg/L, Kontrolle
Analytik des Wasserkörpers:	Gesamtsilber in Beckenmitte vor und nach Medienwechsel
Validität:	In den beiden Haupttests wurden die Validitätskriterien der OECD TG 210 [9] nur vom zweiten Haupttest vollständig erfüllt. Die Ergebnisse des ersten Haupttests lieferten jedoch wertvolle Informationen und bestätigten die Ergebnisse des zweiten Tests.
Zusatztest:	Exposition von juvenilen Tieren über 21 Tage bei 25 und 100 µg nAg/L; Untersuchung der Aufnahme und Verteilung von Silber in den Gewebefractionen 1) Kopf und Haut/Kiemen, 2) Magen/Darm, 3) Filet. Messung von Gesamtsilber und gelöstem Silber im Wasser.

5.1 Ergebnisse des ersten Haupttests mit *Danio rerio*

Die mittleren Gesamtsilberkonzentrationen wurden in allen Behandlungen mit 70 % ± 2 % der Nominalkonzentrationen gemessen. In Übereinstimmung mit dem vorab durchgeführten Fischembryotest betrug die NOEC für den Schlupf 200 µg nAg/L (nominal). Bei 400 µg nAg/L waren im Orientierungstest wie im Fischembryotest Wirkungen aufgetreten. Die niedrigste Testkonzentration (12.5 µg nAg/L) und die Dispergant-Kontrolle gingen aufgrund einer zeitlich befristeten Kontamination des Leitungswassers verloren. Diese beeinflusste auch die Überlebensrate der Larven in der Kontrolle, die mit 61 % unter dem Qualitätskriterium der Richtlinie [9] von 70 % blieb. Die Testkonzentrationen von 25 bis 200 µg nAg/L zeigten 100 % Schlupf und eine Konzentrationsabhängigkeit der Überlebensrate geschlüpfter Larven. In 200 µg nAg/L starben alle Larven nach Transfer in neues Testmedium an Tag 7. In 100 µg nAg/L begann erhöhte Mortalität an Tag 14 und ergab bei Versuchsende eine Überlebensrate von 45 %. 50 µg nAg/L führten zu ähnlichen Ergebnissen wie in der Kontrolle (Effekt unklar), während 25 µg nAg/L die Überlebensrate eindeutig nicht negativ beeinflussten. Hinsichtlich des Wachstums (gemessen als Länge und Gewicht) war bereits bei

25 µg/L eine Reduktion gegenüber der Kontrolle signifikant. Wegen der Unsicherheiten der Aussage wurden im zweiten Haupttest drei statt wie geplant zwei Konzentrationen in zwei echten und je 6 Pseudoreplikaten untersucht.

5.2 Ergebnisse des zweiten Haupttests mit *Danio rerio*

Die mittleren Gesamtsilberkonzentrationen wurden in allen Behandlungen mit $47 \% \pm 6 \%$ der Nominalkonzentrationen gemessen. Während der Intervalle zwischen den Medienwechseln nahmen die Konzentrationen ab. Offensichtlich hatte sich die Pumpenleistung im Vergleich zum ersten Haupttest verschlechtert. Wie im ersten Haupttest war der Schlupf in nahezu allen Pseudoreplikaten 100 %. Die Überlebensrate nach Schlupf betrug in allen Pseudoreplikaten außer in der höchsten Testkonzentration 75-100 %. 100 µg nAg/L verursachten in einem Aquarium in vier Pseudoreplikaten erhöhte Sterblichkeiten nach Transfer in frisches Testmedium an Tag 7. Die anderen acht Pseudoreplikate zeigten eine Überlebensrate vergleichbar mit der der anderen Behandlungen (70-95 %). Durch die hohe Überlebensrate und geringe Variabilität der anderen Behandlungen war die mittlere Überlebensrate von 70,3 % in der höchsten Konzentration statistisch signifikant niedriger. Länge und Gewicht waren bereits bei 50 µg nAg/L signifikant reduziert (NOEC: 12,5 µg nAg/L).

Die überlebenden Fische wurden auf ihre Gesamtsilberkonzentration untersucht. Die Konzentration stieg mit steigender Konzentration im Medium. Wie für die meisten Metalle nahm jedoch die relative Anreicherung mit zunehmender Konzentration im Außenmedium ab.

Für beide Haupttests wurden Endpunktberechnungen auf Basis der gemessenen Durchschnittskonzentrationen vorgenommen (Tabelle 4). Der offensichtlich erhöhte Stress der Versuchsbedingungen im 1. Haupttest führte zu schlechteren Überlebensleistungen in der Kontrolle (unterhalb des Validitätskriteriums), aber auch zu schärferen Effekten beim Wachstum (Länge). Die Ergebnisse beider Tests stimmten gut überein, die statistische Trennschärfe reicht aus, um Abweichungen oberhalb von 7 % von der Kontrolle signifikant werden zu lassen.

Tabelle 4: Überblickstabelle zu Wirkungen in den Early Life Stage-Tests mit *Danio rerio* und Nanosilber. Berechnungen basieren auf gemessenen Durchschnittskonzentrationen (µg Ag/L).

	LOEC (Effect)	NOEC (Effect)	EC ₅₀	95%-Vertrauensbereich	EC ₁₀
Schlupf					
Orientierungstest	400 (80%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1. Haupttest	n.d.	136 (0%)	n.d.	n.d.	n.d.
2. Haupttest	n.d.	> 47 (0%)	n.d.	n.d.	n.d.
Überlebensrate					
1. Haupttest	69 (27%)	34 (0%)	72	67-77	53
2. Haupttest	47 (20%)	23 (0%)	62	56-68	41
Länge					
1. Haupttest	18 (19%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2. Haupttest	23 (8%)	5,9 (2%)	n.d.	n.d.	n.d.
Gewicht					
1. Haupttest	18 (23%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2. Haupttest	23 (26%)	5,9 (7%)	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: nicht durchführbar

5.3 Ergebnisse des zusätzlichen Aufnahme- und Verteilungstests mit *Danio rerio*

Mit dem Ziel der Untersuchung der wesentlichen Aufnahmerouten und der Verteilung von Nanosilber in Fischen wurde in den Testsystemen ein weiterer Test mit größeren juvenilen Tieren in 25 und 100 µg nAg/L durchgeführt, um eine differenzielle Analyse verschiedener Gewebefractionen zu ermöglichen. Von den 15 Fischen pro Behandlung wurden nach 21 Tagen Exposition Gewebefractionen von je drei Fischen gepoolt und auf ihren Gesamtsilbergehalt untersucht (Tabelle 5). Für die Gewebefractionen „Kopf und Haut“ und „innerer Fisch“ einschließlich Filet und innerer Organe wurden ähnliche Gesamtsilberkonzentrationen innerhalb jeder Behandlung festgestellt. Der Magen-/ Darmtrakt zeigte demgegenüber etwa vierfach höhere Werte in Kontrollfischen und 45fach höhere Werte in mit Nanosilber behandelten Fischen. So ist nur ein kleiner Silberanteil in Fischen des 2. Haupttests auf die Aufnahme von gelösten Silberionen über die Kiemen, der Großteil aber auf die Aufnahme von Partikeln in den Darm zurückzuführen. Nanopartikel im Darm verbleiben zum größten Teil dort, ohne in den Körper aufgenommen zu werden. Sie mögen aber einen Beitrag zur leichten Silberakkumulation im inneren Fisch beitragen, indem sie als Quelle gelöster Ionen dienen.

Tabelle 5: Zusätzlicher Aufnahmetest mit *Danio rerio*: Gesamtsilberkonzentrationen in verschiedenen Gewebefractionen (µg/kg).

	Kontrolle			25 µg nAg/L			100 µg nAg/L		
	Kopf & Haut	Magen & Darm	Innerer Fisch	Kopf & Haut	Magen & Darm	Innerer Fisch	Kopf & Haut	Magen & Darm	Innerer Fisch
MW	18,7	63,7	11,3	134	5003	116	559	20334	415
SD	4,0	23,2	3,8	28,4	1210	120	71,2	11816	190
CV %	21,6	36,4	33,6	21,2	24,2	104	12,7	58,1	45,8

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

5.4 Zusammenfassung der Langzeittests mit Nanosilber, Schlussfolgerungen

Im zweiten, validen Haupttest wurde eine NOEC von 5.9 µg nAg/L bestimmt (gemessene Gesamtsilberkonzentration), die auf Wachstumseffekten (Gesamtlänge) beruhte. Die Schwellenkonzentration für akute Wirkungen auf Dottersacklarven wurde mit der 100 µg nAg/L – Behandlung bestimmt (mittlere gemessene Gesamtsilberkonzentration von etwa 60 µg/L). Diese Wirkung war wahrscheinlich auf die Exposition gegenüber gelösten Silberionen direkt nach dem Medienwechsel zurückzuführen, da zu diesem Zeitpunkt die Komplexbildung durch organischen Kohlenstoff aus Futterresten und Faeces noch gering war. Der zur Konzentrationsfindung durchgeführte Fischembryotest war in der Lage die Empfindlichkeit des Endpunktes Schlupf (NOEC: 100 µg/L) vorauszusagen, nicht aber die Empfindlichkeit späterer Lebensstadien. Im Vergleich zu Literaturdaten von Fish Early Life Stage und juveniler Empfindlichkeit gegenüber Silber-Nanopartikeln stellen die präsentierten Daten die empfindlichsten populationsrelevanten Endpunkte dar (z. B. NOEC für Wachstum in Schafskopfelritzen ≥ 6.2 µg/L [13]). Das Versuchsdesign (semistatische Exposition, Wasserbewegung, Medienwechsel alle 7 Tage) scheint daher für die Testung von Nanomaterialien geeignet zu sein. Die Gesamtsilberkonzentration in den Fischen stieg mit steigender Gesamtsilberkonzentration im Testmedium. In einem Zusatzexperiment wurde gezeigt, dass sich das meiste angereicherte Silber im Magen-/Darmtrakt befand und somit über die Ingestion von Partikeln geschehen war. Pseudoreplikate (mehrere Brutkäfige in einem einzigen Becken pro Konzentration) beinhalten das Risiko einer starken Beeinflussung der Testaussage durch ungleiche Bedingungen in den statischen Systemen (s. Haupttest 1). Deshalb sind mindestens zwei echte Replikate (die mehrere Pseudoreplikate enthalten können) bevorzugt. Sie können statistisch verglichen und zusammengefasst werden, wenn sie sich nicht signifikant unterscheiden (s. Haupttest 2).

6 Literatur

- [1] A. Kahru, K. Savolainen, "Potential hazard of nanoparticles: from properties to biological and environmental effects," *Toxicology*, vol. 269, no. 2–3, pp. 89-91, Mar. 2010.
- [2] K. Savolainen, H. Alenius, H. Norppa, L. Pylkkänen, T. Tuomi, G. Kasper, "Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies - A review," *Toxicology*, vol. 269, no. 2–3, pp. 92-104, Mar. 2010.
- [3] C. H. Arnaud, "Probing nanotoxicity," *Chemical & Engineering News*, vol. 88, no. 13, pp. 32-34, Mar. 2010.
- [4] K. Hund-Rinke, "TiO₂ nanoparticles - relationship between dispersion preparation method and ecotoxicity in the algal growth test", *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung : UWSF. Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie*, vol. 22, no. 5, pp. 517-528, 2010.
- [5] OECD, "OECD guideline for testing of chemicals. 225. Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test using spiked sediment," Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France, 2007.
- [6] OECD, "OECD guideline for testing of chemicals. 203. Fish, acute toxicity test.," Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France, 1992.
- [7] OECD, "OECD guideline for testing of chemicals. 226. Predatory mite (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) reproduction test in soil," Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France, 2008.
- [8] K. Hund-Rinke, T. Klawonn, "Investigation of two widely used nanomaterials (TiO₂, Ag) in standardized ecotoxicological test.," Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Schmallenberg, Germany, Final report to the Umweltbundesamt.
- [9] OECD, "OECD guideline for testing of chemicals. 210. Fish, early life stage toxicity test", Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France, 1992.
- [10] K. K. Hisaoka, H. I. Battle, "The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan)", *J. Morph.*, vol. 102, pp. 311-328, 1958.
- [11] K. K. Hisaoka, C. F. Firlit, "Further studies on the embryonic development of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan)", *J. Morph.*, vol. 107, pp. 205-225, 1960.
- [12] H. Takahashi, „Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*“, *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, vol. 28, no. 2 , pp. 57-65, 1977.
- [13] R. J. Griffitt, N. J. Brown-Peterson, D. A. Savin, C. S. Manning, I. Boube, R. A. Ryan, M. Brouwer, „Effects of chronic nanoparticulate silver exposure to adult and juvenile Sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*)“, *ET&C*, vol. 31, no. 1, pp. 160-167, 2012.