

Transmissionselektronenmikroskopie von Nanomaterialien sowie Untersuchungen zu deren Wirkung auf Mikroalgen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Susanne Straskraba
aus Offenbach

Frankfurt am Main (2019)

(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

Gutachter: Prof. Dr. Claudia Büchel
Prof. Dr. Bruno Streit

Datum der Disputation: 13.03.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Allgemeine Einführung	1
1.1 Nanotechnologie und Nanomaterialien	1
1.1.1 Terminologie und Definitionen	1
1.1.2 Eigenschaften.....	2
1.1.3 Produktion und Anwendungsbereiche	3
1.1.4 Standards und Richtlinien	5
1.2 Risiken der Nanotechnologie	7
1.2.1 Toxizität von Nanomaterialien.....	7
1.2.2 Nanomaterialien in der Umwelt	9
Teil I Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Nanomaterialien .	11
2 Einleitung (Teil I)	11
2.1 Forschungsprojekt NanoUmwelt	11
2.2 Transmissionselektronenmikroskopie.....	11
2.3 Zielsetzung.....	12
3 Material und Methoden (Teil I)	13
3.1 Untersuchte Nanomaterialien und Mikropartikel	13
3.2 Materialcharakterisierung und -vorbereitung	15
3.2.1 Größenmessung	15
3.2.2 Optische Beurteilung	16
3.2.3 Materialstabilität gegenüber Chemikalien	16
3.3 Synthetische Partikel in umweltrelevanten Matrices.....	17
3.3.1 Umweltkompartimente	17
3.3.2 Proben von Organismen	18
3.4 Untersuchung von Zellkulturen und Gewebe	19
3.4.1 Darmbarriere	19
3.4.2 Stammzellen	20
3.4.3 Sphäroide	20
3.4.4 Plazentabarriere.....	21
4 Ergebnisse (Teil I)	22
4.1 Materialcharakterisierung und -vorbereitung	22
4.1.1 Größenmessung.....	22
4.1.2 Optische Beurteilung	23
4.1.3 Materialstabilität gegenüber Chemikalien	31
4.2 Synthetische Partikel in umweltrelevanten Matrices.....	32
4.2.1 Umweltkompartimente	32
4.2.2 Proben von Organismen	36
4.3 Untersuchung von Zellkulturen und Gewebe	37

4.3.1	Darmbarriere	37
4.3.2	Stammzellen	37
4.3.3	Sphäroide	37
4.3.4	Plazentabariere.....	39
5	Diskussion (Teil I).....	42
5.1	Materialcharakterisierung und –vorbereitung.....	42
5.1.1	Charakterisierung von Nanomaterialien.....	42
5.1.2	Materialstabilität gegenüber Chemikalien	45
5.1.3	Fazit.....	46
5.2	Synthetische Partikel in umweltrelevanten Matrices.....	46
5.2.1	Vorkommen von Nanomaterialien in der Umwelt	46
5.2.2	TEM-Nachweis von Nanomaterialien	47
5.2.3	Fazit.....	49
5.3	Untersuchung von Zellkulturen und Gewebe	50
5.3.1	Nachweisproblematik der zellulären Aufnahme von Nanomaterialien	50
5.3.2	Mikropartikel in Zellen.....	50
5.3.3	Nanopartikel in Zellen.....	51
5.3.4	Fazit.....	52
5.4	Schlussfolgerungen	52
Teil II Untersuchung der Wirkung von Nanomaterialien auf Mikroalgen		54
6	Einleitung (Teil II).....	54
6.1	In-vivo-Laboruntersuchungen.....	54
6.2	Algen als Testorganismen.....	54
6.3	Zielsetzung.....	55
7	Material und Methoden (Teil II)	56
7.1	Nanomaterialien	56
7.2	Versuchsorganismen	57
7.2.1	Auswahl der Arten	57
7.2.2	Haltungsbedingungen	59
7.3	Versuche.....	60
7.3.1	Etablierung der Absorptionsmessung.....	60
7.3.2	Toxizitätsuntersuchung.....	61
7.3.3	Elektronenmikroskopische Zelluntersuchung.....	68
7.3.4	Beschattungseffekt	70
7.4	Statistik	70
7.4.1	Etablierung der Absorptionsmessung.....	71
7.4.2	Toxizitätsuntersuchung.....	71
7.4.3	Beschattungseffekt	73
8	Ergebnisse (Teil II).....	74
8.1	Umrechnung der Absorption in die Zellzahl.....	74

8.2	Beschattungseffekt	76
8.3	Toxizitätsuntersuchung	79
8.3.1	Silber-Nanopartikel und Silbernitrat	80
8.3.2	Titandioxid-Nanopartikel	100
8.3.3	Polystyrol-Nanopartikel	115
8.3.4	EC ₅₀ , LOEC, NOEC	129
8.4	Elektronenmikroskopische Zelluntersuchung	134
8.4.1	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	135
8.4.2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	138
8.4.3	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	142
9	Diskussion (Teil II)	145
9.1	Umrechnung der Absorption in die Zellzahl	145
9.2	Absorptionsverhalten der Nanopartikel	145
9.2.1	Silber-Nanopartikel und Silbernitrat	146
9.2.2	Titandioxid-Nanopartikel	147
9.2.3	Polystyrol-Nanopartikel	149
9.2.4	Einfluss der Oberflächenmodifikation	149
9.2.5	Fazit	150
9.3	Beschattungseffekt	151
9.4	Toxizitätsuntersuchung und elektronenmikroskopische Zelluntersuchung	152
9.4.1	Bewertung der Endpunkte und Testverfahren	152
9.4.2	Toxizität der Testsubstanzen	160
9.4.3	Wirkung der Testsubstanzen	166
9.4.4	Einfluss der Partikelmodifikationen	176
9.4.5	Bewertung der Testorganismen	179
9.4.6	Stimulationseffekt	182
9.5	Schlussfolgerungen	185
10	Zusammenfassung	187
11	Literaturverzeichnis	189
Anhang	207

Abkürzungsverzeichnis

AbfKlärV	Klärschlammverordnung
Ag	Silber
Ag-COOH	Mit Carboxylgruppen oberflächenmodifizierte Silber-Nanopartikel
Ag-n	Unmodifizierte Silber-Nanopartikel
Ag-NH ₂	Mit Aminogruppen oberflächenmodifizierte Silber-Nanopartikel
Ag-NP	Silber-Nanopartikel
AgPure	Unmodifizierte Silber-Nanopartikel
APHA	American Public Health Association
AWWA	American Water Works Association
BeWo-Zellen	Humane Trophoblasten
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
Chl a	Chlorophyll a
Chl b	Chlorophyll b
Chl c	Chlorophyll c
CLSM	Konfokalmikroskopie (engl.: <i>Confocal laser scanning microscopy</i>)
CNT	Kohlenstoff-Nanoröhrchen (engl.: <i>Carbon nanotubes</i>)
CNT-COOH	Mit Carboxylgruppen oberflächenmodifizierte Kohlenstoff-Nanoröhrchen
CNT-n	Unmodifizierte Kohlenstoff-Nanoröhrchen
CNT-NH ₂	Mit Aminogruppen oberflächenmodifizierte Kohlenstoff-Nanoröhrchen
DaNa	Wissenschaftsplattform Nanopartikel
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DüMV	Düngemittelverordnung
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ECHA	Europäische Chemikalienagentur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EDX	Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (engl.: <i>Energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EK	Europäische Kommission
Empa	Eidgenössische Materialprüfungs- und Forschungsanstalt
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
EU	Europäische Union
F ₀	Grundfluoreszenz
F _m	Maximale Fluoreszenz
F _{m'}	Maximale Fluoreszenz bei Licht
F _v	Variable Fluoreszenz
GESTIS	Gefahrenstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung
hMSC	Humanen mesenchymalen Stammzellen (engl.: <i>Human mesenchymal stem cells</i>)
HMWVL	Hessisches Ministerium für Wirtschaft, Verkehr und Landesentwicklung
HPE-Zellen	Humane plazentale Endothelzellen (engl.: <i>Human placental endothelial cells</i>)
IBMT	Institut für Biomedizinische Technik
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl.: <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ISO	International Organization for Standardization
LK	Lösemittelkontrolle
LOEC	Niedrigste Testkonzentration, die einen signifikanten Effekt auslöst (engl.: <i>Lowest observed effect concentration</i>)
LUBW	Landesanstalt für Umwelt, Messung und Naturschutz Baden-Württemberg
ML	Messlicht
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NK	Negativkontrolle

NOEC	Höchste Testkonzentration, die keinen signifikanten Effekt auslöst (engl.: <i>No observed effect concentration</i>)
NOM	Natürlich vorkommendes kohlenstoffbasiertes Material (engl.: <i>Natural organic matter</i>)
NP	Nanopartikel
NPQ	Nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung (engl.: <i>Non photochemical quenching</i>)
OD	Optische Dichte
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PEC	Erwartete Umweltkonzentration (engl.: <i>Predicted environmental concentration</i>)
PEN	Project on Emerging Nanotechnologies
PQ	Photochemische Fluoreszenzlöschung (engl.: <i>Photochemical quenching</i>)
PS	Polystyrol
PS II	Photosystem II
PS-COOH	Mit Carboxylgruppen oberflächenmodifizierte Polystyrol-Nanopartikel
PS-n	Unmodifizierte Polystyrol-Nanopartikel
PS-NH ₂	Mit Aminogruppen oberflächenmodifizierte Polystyrol-Nanopartikel
PS-NP	Polystyrol-Nanopartikel
r ²	Bestimmtheitsmaß
REACH	Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>Reactive oxygen species</i>)
SAG	Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen
SCENIHR	Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks
SD	Standardabweichung (engl.: <i>Standard deviation</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SLB	Sättigender Lichtblitz
SRU	Sachverständigenrat für Umweltfragen

TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TiO ₂ -COOH	Mit Carboxylgruppen oberflächenmodifizierte Titandioxid-Nanopartikel
TiO ₂ -n	Unmodifizierte Titandioxid-Nanopartikel
TiO ₂ -NH ₂	Mit Aminogruppen oberflächenmodifizierte Titandioxid-Nanopartikel
TiO ₂ -NP	Titandioxid-Nanopartikel
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl.: <i>United States of America</i>)
WPMN	Working Party on Manufactured Nanomaterials
WWICS	Woodrow Wilson International Center of Scholars

1 Allgemeine Einführung

1.1 Nanotechnologie und Nanomaterialien

1.1.1 Terminologie und Definitionen

Die sogenannte Nanotechnologie umfasst die Entwicklung, Untersuchung und Anwendung von Strukturen, welche in mindestens einer Dimension eine Größe von 1 bis 100 Nanometern aufweisen (ISO, 2015a; 2015b). Sie wird oft als Schlüsseltechnologie bezeichnet, da sie ein, in den letzten zwei Jahrzehnten, stetig zunehmendes technisches und wirtschaftliches Potenzial aufweist (PICCHIETTI et al., 2017; KELLER et al., 2013). Die Besonderheit von sogenannten Nanomaterialien liegt in ihren veränderten physikalischen und chemischen Eigenschaften, welche durch ihre geringe Größe bedingt sind (CAO, 2004).

Derzeit existiert keine international gültige Definition des Begriffs „Nanomaterial“ (BOVERHOF et al., 2015). Eine häufig verwendete Begriffsfestlegung, auf welche sich auch in dieser Arbeit bezogen wird, ist die der Europäischen Kommission (EK): „Ein Nanomaterial ist ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben“ (EK, 2011). Diese Definition umfasst auch natürlich vorkommende und zufällig hergestellte Nanomaterialien, Nanotechnologie und Forschung konzentrieren sich jedoch hauptsächlich auf die gezielte Herstellung und Untersuchung synthetischer Nanomaterialien (NOWACK & BUCHELI, 2007). Diese lassen sich in Nanoobjekte und nanostrukturierte Materialien unterteilen (ISO, 2015a). Einzelne Objekte werden als Nanoobjekte bezeichnet, sofern sie mindestens ein nanoskaliges Außenmaß aufweisen (ISO, 2015b). Nanostrukturierte Materialien besitzen hingegen eine interne oder oberflächliche Nanostruktur (ISO, 2015a). Nanoobjekte werden darüber hinaus anhand ihrer Form in drei Gruppen eingeteilt. Objekte, deren drei Außenmaße im Nanomaßstab vorliegen, werden unter dem Begriff Nanopartikel (NP) zusammengefasst. Nanofasern werden durch zwei nanoskalige Außenmaße und ein wesentlich größeres Außenmaß in der dritten Dimension definiert. Nanoplättchen weisen schließlich nur ein nanoskaliges Außenmaß auf (ISO, 2015b). Eine Übersicht der Bezeichnung verschiedener Nanomaterialien ist Abb. 1 zu entnehmen.

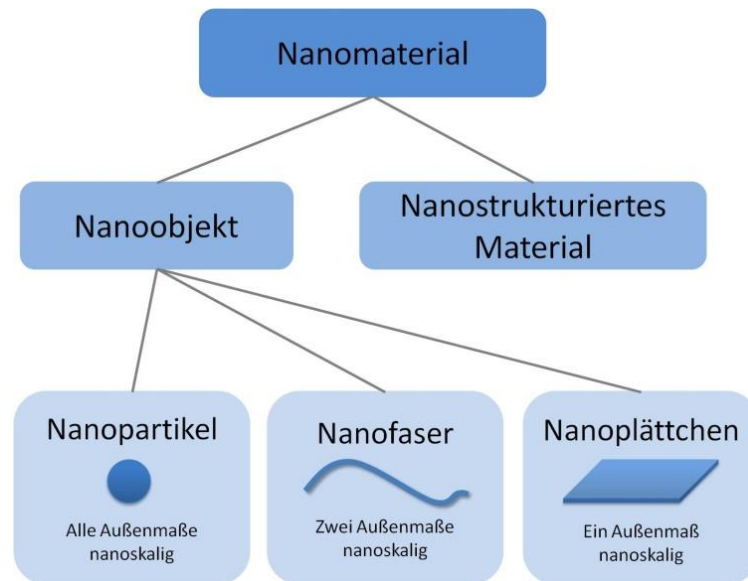


Abb. 1) Übersicht über die Unterteilung von Nanomaterialien.

1.1.2 Eigenschaften

Nanoobjekte lassen sich nach ihrer chemischen Zusammensetzung aufteilen, wobei sie aus einem einzigen Element wie Silber (Ag) oder aber aus Verbindungen wie beispielsweise Polystyrol (PS) bestehen können (JU-NAM & LEAD, 2008). Organische und dementsprechend kohlenstoffbasierte Nanoobjekte sind z. B. Kohlenstoff-Nanoröhrchen (CNT; engl.: *Carbon nanotubes*) und Fullerene (HANDY et al., 2008). Anorganische Nanomaterialien bestehen aus Metallen oder Metalloxiden wie z. B. Gold oder Titandioxid (TiO₂) (KLAINÉ et al., 2008).

Materialien im Nanomaßstab haben, verglichen mit ihren Ausgangsstoffen, oftmals grundlegend andere Eigenschaften. Die Reduktion der Teilchengröße in den nanoskaligen Bereich hat eine im Verhältnis zum Volumen, größere Oberfläche der Nanoform gegenüber makroskaligen Strukturen zur Folge. Dies und die insgesamt geringe Größe der Teilchen können sich unter anderem auf chemische Eigenschaften wie Reaktivität, katalytisches Verhalten, Löslichkeit und Stabilität auswirken, jedoch auch auf physikalische Parameter wie die Leitfähigkeit und Belastbarkeit (CAO, 2004). Auch die biologische Aktivität kann durch veränderte Membrangängigkeit und Diffusions-eigenschaften beeinflusst werden (VÖLKER, 2013; LUTHER, 2007). Oft können diese spezifischen Eigenschaften von Nanoobjekten genutzt werden, um Materialien und Produktfunktionen zu verbessern.

Durch die bereits beschriebene große Oberfläche von Nanoobjekten neigen diese dazu, sich zusammenzulagern. Die dabei aus den Primärpartikeln entstehenden, sogenannten Sekundärpartikel können auf zwei Arten gebildet werden und werden dementsprechend als Aggregate oder Agglomerate bezeichnet. Bei der Entstehung eines Aggregates können die Nanoobjekte durch kovalente Bindungen miteinander verbunden werden oder ihre Oberflächenstrukturen verzahnen

sich durch komplexe physikalische Verhakungen. Die Oberfläche eines Sekundärpartikels ist in diesem Fall wesentlich kleiner als die Summe der Oberflächen der einzelnen Nanoobjekte. Aggregate sind sehr stabil und nicht mehr in ihre ursprünglichen Primärpartikel zerlegbar. Binden sich Nanoobjekte hingegen nur durch Van-der-Waals-Kräfte oder einfaches Verhaken, werden sie als Agglomerat bezeichnet und die Oberfläche des Sekundärpartikels ähnelt der Summe der Oberflächen der einzelnen Bestandteile. Agglomerate können, im Gegensatz zu Aggregaten, durch geeignete Verfahren wieder in ihre Primärbestandteile zerlegt werden (LÖVESTAM et al., 2010; ISO, 2008).

Da für die optimale Funktion von Nanomaterialien oftmals eine gleichmäßige und stabile Dispersion notwendig ist, muss die Verklumpung der Primärpartikel verhindert werden. Dies kann z. B. durch eine Beschichtung der Nanoobjektoberfläche erreicht werden. Durch die Modifikation mit oberflächengebundenen Molekülen, können die Partikel sterisch voneinander ferngehalten oder elektrostatisch aufgeladen werden, sodass sie sich bei gleicher Oberflächenladung gegenseitig abstoßen (HOSOKAWA et al., 2012; JU-NAM & LEAD, 2008). Auch andere Materialeigenschaften, wie z. B. die Biokompatibilität von NP, können durch die Funktionalisierung der Oberfläche verändert werden und erweitern somit die Einsatzmöglichkeiten der Nanotechnologie (FERREIRA et al., 2018).

1.1.3 Produktion und Anwendungsbereiche

Die gezielte Herstellung von synthetischen Nanomaterialien kann allgemein über zwei verschiedene Wege erfolgen. Beim Top-down-Verfahren werden durch Prozesse wie Ätzen, Mahlen, etc. Nanoobjekte aus größeren Materialteilen hergestellt, was allerdings zu einer relativ breiten Partikelverteilung führen kann (RAAB et al., 2008). Das Bottom-up-Verfahren nutzt hingegen die Grundsätze der atomaren Selbstorganisation. Es beruht auf dem Aufbau von Nanoobjekten aus Atomen und Molekülen, welche sich entweder selbständig positionieren (self assembly) oder durch äußere Einflüsse gezielt positioniert werden (positional assembly) (JU-NAM & LEAD, 2008; RAAB et al., 2008).

Die Entwicklung der Nanotechnologie schreitet seit einigen Jahren immer schneller voran, was zu einer steigenden Zahl an Nanomaterialien führt, die aus der Forschung in die Produktion übergehen und kommerziell genutzt werden können. Dies resultiert in einem wachsenden Markt und in ansteigenden Produktionsmengen (PEN, 2019; VANCE et al., 2015; KELLER et al., 2013). Vielversprechende Forschungsergebnisse und die vielfältigen Anwendungsoptionen machen die Entwicklung neuer Nanomaterialien zudem wirtschaftlich sehr attraktiv, wodurch in Zukunft damit zu rechnen ist, dass die Produktvielfalt und die Produktionsmengen weiterhin ansteigen werden. Das Umweltbundesamt spricht der Nanotechnologie das Potenzial zur grundlegenden Veränderung ganzer Technikfelder zu und erwartet Innovationen in unterschiedlichsten Bereichen von der Medizin bis zur Umwelttechnik (BECKER et al., 2009).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, genaue Aussagen über die Produktionsmengen von Nanomaterialien zu treffen, da die Markttransparenz sehr gering ist (PETERS et al., 2018; SRU, 2011). Es steht keine nach Makro- und Nanoform aufgeschlüsselte Datenbasis zur Verfügung, da Hersteller und Anwender derzeit nicht verpflichtet sind, Angaben zur Menge der produzierten und eingesetzten Nanomaterialien zu machen. Dennoch gibt es Schätzungen bezüglich der Nanomaterialproduktion. MÖLLER et al. (2013) ermittelten ein ungefähres Weltmarktvolumen von 2 - 15 Mrd. US-Dollar. Laut einer Umfrage bei Unternehmen ist der weltweit am meisten produzierte NP mit bis zu 10 000 t pro Jahr TiO_2 . Die verbreitetste Partikelart in Konsumgütern ist Nanosilber, dessen Produktion mit 100 t pro Jahr deutlich unter der von TiO_2 -Nanomaterial liegt (PICCINNO et al., 2012). Allein in Deutschland geben 1 908 Einrichtungen an, Nanotechnologie zu verwenden (BMBF, 2019).

Die Nanotechnologie ist ein Querschnittsthema, das verschiedenste Forschungs- und Entwicklungsbereiche miteinander verbindet und ein extrem breites Anwendungsspektrum bietet. In der Industrie werden Nanoobjekte verwendet, um Produktionsprozesse effektiver zu gestalten und Materialeigenschaften zu verbessern. So kann z. B. durch den Einsatz von nanoskaligen Chemikalien eine höhere Wirksamkeit und damit verbunden eine Energie- und Materialersparnis erzielt werden. Baustoffe können durch die Modifikation mit Nanomaterialien stabiler und langlebiger gemacht werden. In der Luftfahrt- und Automobilindustrie werden Nanoverbundmaterialien eingesetzt, um das Gewicht von Bauteilen zu reduzieren und ihre Widerstandsfähigkeit zu steigern. Durch Materialverbesserungen mit Hilfe von Nanofasern können z. B. leistungsfähigere Elektrodenmaterialien hergestellt werden (BMBF, 2014; LUBW, 2011).

Seit mehr als zehn Jahren werden Medikamente mit Nanoanteilen in der Medizin eingesetzt. Ihr Vorteil liegt hierbei in der Optimierung von Aufnahme und Bioverfügbarkeit und der zielgenauen Medikamentenabgabe im Körper, was die Wirksamkeit solcher Arzneien entsprechend verbessert (BMBF, 2014). Da einige NP zudem in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, bietet sich die Möglichkeit, neurologische Erkrankungen in Zukunft gezielter behandeln zu können. Auch das zielgerichtete Aufspüren von Tumoren und deren Behandlung stellen vielversprechende Forschungsansätze dar. Implantate mit nanostrukturierter Oberfläche weisen eine verbesserte Biokompatibilität auf und sind zudem stabiler und haltbarer (ETHERIDGE et al., 2013; JORDAN et al., 2007).

In Konsumgütern und damit in privaten Haushalten tauchen Nanomaterialien besonders im Zusammenhang mit ihrer teils desinfizierenden Wirkung auf. Sie sind häufig als antibakterielle Komponente in Verpackungen, Körperpflegeprodukten, Reinigungs- und Waschmitteln enthalten. Als Beschichtung sollen sie die Oberflächenhygiene von Küchenutensilien, Kühlschränken und Waschmaschinen verbessern. Sportbekleidung soll durch die Verarbeitung von Nanomaterialien

länger keimfrei und damit geruchsneutral bleiben (WALZ et al., 2014; GERANIO et al., 2009). Vor allem im Outdoorbereich werden Nanomaterialien eingesetzt, um Stoffe zu imprägnieren, sodass diese wasser-, fett- und schmutzabweisend werden und zudem ihre Beständigkeit gegenüber UV-Strahlung zu erhöhen (SCHNEIDER, 2012).

In Lebensmitteln und Kosmetika verbessern nanoskalige Partikel als Rieselhilfe oder Verdickungsmittel die Konsistenz der Produkte. Darüber hinaus dienen sie als Färbemittel (SRU, 2011). Auch im Bereich erneuerbarer Energien und Umweltechnik werden Nanomaterialien erfolgreich eingesetzt. Bei der Wasseraufbereitung und Luftreinigung finden nanoskalige Filtersysteme und nanoporöse Membranen Verwendung (LUBW, 2011; SRU, 2011). Verbesserte und haltbarere Materialien machen Photovoltaikanlagen und Windkraftträder effizienter (LUBW, 2011). Durch den gezielten und bedarfsgerechten Einsatz von Düngemitteln und Pestiziden in Nanoform kann eine Verringerung der Schadstoffbelastung von Boden und Gewässern erreicht werden (MÖLLER et al., 2013).

Neben den genannten Beispielen für den Einsatz von Nanomaterialien, gibt es noch viele weitere Nutzungsmöglichkeiten. Durch die ständigen Modifikationen und Neuentwicklungen auf diesem Gebiet, wird auch das Anwendungsspektrum ständig erweitert. Insgesamt bietet die Nanotechnologie in vielen Bereichen die Möglichkeit Material, Energie und Kosten einzusparen (MÖLLER et al., 2014). Durch Materialverbesserungen wird im Allgemeinen die Lebensdauer von Produkten erhöht, was schließlich den Ressourcenverbrauch reduzieren kann. Insgesamt hat die Nanotechnologie das Potenzial Prozesse im Sinne des Umweltschutzes zu verbessern und ist damit eine wichtige Zukunftstechnologie.

1.1.4 Standards und Richtlinien

REACH

Auf dem europäischen Markt sind tausende von Chemikalien im Gebrauch. So sind beispielsweise bei der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA) derzeit mehr als 20 000 Substanzen registriert (ECHA, 2018). Sie finden unter anderem in Alltagsprodukten Verwendung und haben damit mitunter täglich Kontakt zu Menschen und Umwelt. Nur von einem Bruchteil dieser Chemikalien ist umfassend bekannt, welche Auswirkungen sie auf den Naturhaushalt haben und inwiefern die menschliche Gesundheit durch sie beeinträchtigt werden kann. Durch die Europäische Chemikalienverordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH; engl.: *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) (EU, 2006), welche seit 2007 in Kraft ist, sind in der Europäischen Union (EU) hergestellte oder importierte Chemikalien registrierungspflichtig. Die Hersteller müssen mittels standardisierter Testverfahren die Giftigkeit und damit das Risikopotenzial der jeweiligen Substanz beurteilen. Längerfristig sollen somit für Mensch und Umwelt gefährliche Chemikalien durch alternative Substanzen substituiert werden,

welche weniger schädlich sind (EU, 2006). Auch Nanomaterialien fallen unter diese Verordnung (EU, 2006). Sie werden allerdings nicht als eigenständige Substanzen angesehen, da sie in der Regel die gleiche chemische Zusammensetzung wie ihre Ausgangsmaterialien aufweisen. Die zurzeit vorhandenen Prüfrichtlinien wurden ursprünglich vor allem für lösliche Stoffe entwickelt. Die Testprinzipien sind zwar auf Nanomaterialien anwendbar, berücksichtigen jedoch keine nanospezifischen Parameter wie Größe, Form und Oberflächeneigenschaften (OECD, 2012a). Diese Parameter können jedoch potenziell zu einer veränderten Wirkung auf Menschen und Umwelt führen (WALZ et al., 2014). Mit den derzeitigen Vorgaben wird das tatsächliche Gefahrenpotenzial von Nanomaterialien somit nicht systematisch erfasst. Um das Risiko von synthetischen Nanomaterialien umfassend bewerten zu können, sollen die Testrichtlinien an die nanospezifischen Besonderheiten der Substanzen angepasst werden. Im Jahr 2006 wurde daher die Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN) gegründet (OECD, 2018). Innerhalb dieser Arbeitsgruppe wurden bereits erste Ansätze zur Testung und Bewertung der Sicherheit von Nanomaterialien entwickelt (HUND-RINKE et al., 2016).

Sonderregelungen für Nanomaterialien

Für Produktgruppen, denen gegenüber Menschen und Umwelt besonders stark exponiert sind, existieren einige Sonderregelungen, so auch speziell für Nanomaterialien. Seit 2013 müssen innerhalb der EU Kosmetikprodukte und Biozide und seit 2014 Lebensmittel besonders deklariert werden, falls diese Nanomaterialien enthalten (EU, 2009; 2011; 2012). Laut diesen gesetzlichen Regelungen muss die betreffende Substanz in der Inhaltsstoffliste mit dem Begriff „nano“ gekennzeichnet sein.

Nanomaterialien werden von der Europäischen Kommission zwar nicht als grundsätzlich gefährlich eingestuft, das Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) beschäftigt sich jedoch mit der zukünftigen Handhabung dieser Materialien (EK, 2018). Da es keine einheitliche, übergreifende Kennzeichnungspflicht für nanotechnologiebasierte Produkte gibt, sind diese für den Verbraucher oft nicht erkennbar. Konsumgüter aus der Textilbranche enthalten beispielsweise häufig Nanomaterialien denen gegenüber der Endverbraucher direkt exponiert ist. Daher gibt es mehrere Projekte, die eine Katalogisierung nanohaltiger Produkte vornehmen. Das Woodrow Wilson International Center of Scholars (WWICS) und das Project on Emerging Nanotechnologies (PEN) stellen seit 2005 ein öffentlich einsehbares Verzeichnis von nanomaterialienenthaltenden Verbraucherprodukten zur Verfügung (VANCE et al., 2015). Während dieses Verzeichnis zu Beginn nur 54 Produkte führte (WALZ et al. 2014), sind es 2019 mehr als 1 800 (PEN, 2019).

1.2 Risiken der Nanotechnologie

Die Entwicklung von Nanomaterialien gilt als Zukunftstechnologie mit einem großen Potenzial zur Ressourcenschonung (WALZ et al., 2014). Allerdings kann auch die Produktion nanoskaliger Stoffe den Einsatz von erheblichen Mengen an Energie, Wasser und umweltgefährlichen Chemikalien notwendig machen (GREBLER & NENTWICH, 2011). Zudem fehlen für die meisten Nanomaterialien Lebenszyklusanalysen, die den tatsächlichen Energie- und Ressourcenbedarf von der Herstellung bis zur Entsorgung zeigen (SRU, 2011; VON GLEICH et al., 2007). Langfristig könnte ein sogenannter Rebound-Effekt eintreten. Die von Nanomaterialien verursachte Effizienzsteigerung in der Produktion vieler Konsumgüter könnte deren Preise senken und damit den Konsum insgesamt erhöhen. Dies wiederum würde die positiven Effekte der Nanomaterialien auf den Ressourcenverbrauch aufheben (SRU, 2011; VON GLEICH et al., 2007). Ein umweltschonender Effekt von Nanomaterialien ist bisher nicht bestätigt und muss in den nächsten Jahren genauer untersucht werden. Ein weiteres Problem weitgehend unbekanntes Ausmaßes stellen mögliche negative Effekte von Nanoobjekten auf Menschen und Umwelt dar.

1.2.1 Toxizität von Nanomaterialien

Exposition des Menschen

Nanoobjekte werden seit Jahren produziert und in verschiedensten Bereichen des Alltags eingesetzt. Daher wird davon ausgegangen, dass der Mensch als Hersteller, Verarbeiter und Verwender von Nanomaterialien, diesen gegenüber in besonders hohem Maß exponiert ist (ORTHEM, 2007). Da Nanoobjekte aufgrund ihrer geringen Größe potenziell von Organismen aufgenommen werden können, geht ein erhöhtes Risiko von jenen Nanoobjekten aus, die nicht in eine Produktmatrix integriert sind und somit eine höhere Bioverfügbarkeit aufweisen (MÖLLER et al., 2013). Potenzielle Aufnahmepfade von Nanostrukturen sind das Einatmen von Stäuben und Aerosolen, die orale Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt durch Nahrungsmittel sowie die dermale Aufnahme über Körperpflegeprodukte. Bereits vor über einem Jahrzehnt kam daher die Frage nach der Sicherheit und Unbedenklichkeit der eingesetzten Materialien auf (BOXALL et al., 2007).

Prognosen zur Toxizität

Es besteht die Vermutung, dass Nanomaterialien aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften für den Menschen schädlicher sind als ihre Ausgangsmaterialien (KAHRU & DUBOURGUIER, 2010). Obwohl die Giftigkeit eines Materials üblicherweise unabhängig von dessen Form ist, kann bei Nanomaterialien durch die geringe Größe von einer höheren Bioverfügbarkeit im Vergleich zu Makromaterialien ausgegangen werden. Durch das erheblich größere Oberfläche-Volumen-Verhältnis werden schädliche Effekte des Materials zudem eventuell deutlich verstärkt. Nanomaterialien gelangen in Kompartimente des Körpers, welche von den Ausgangsmaterialien nicht erreicht werden. So können

sie mitunter Membranen passieren und somit in das Innere von Zellen gelangen (BARILLET et al., 2010, BHATTACHARY et al., 2009). Strukturelle Ähnlichkeit zu bekanntermaßen gesundheitsgefährdenden Stoffen lassen zudem Analogieschlüsse auf mögliche Wirkungen und Risiken zu. So lässt die Lungengängigkeit von Feinstaub und Ultrafeinstaub auf ein ähnliches Verhalten bei synthetischen Nanomaterialien schließen (GAZSÓ, 2007). Ein weiteres Beispiel sind CNT, welche morphologisch den beim Einatmen kanzerogen wirkenden Asbestfasern ähneln. Aufgrund dieser Prognosen beschäftigt sich eine Vielzahl von Studien mit dem Nachweis der durch Nanomaterialien ausgelösten toxischen Effekte.

Effekte von Nanomaterialien

Die Bewertung der Toxizität von Nanomaterialien gestaltet sich bisher schwierig, da oft stark voneinander abweichende oder gar widersprüchliche Ergebnisse ermittelt werden. Dies liegt zum Teil an der Beeinflussung von Messmethoden durch die besonderen physikochemischen Eigenschaften der Nanomaterialien. Hierbei sind unter anderem die Beeinflussung von absorptionsbasierten Messmethoden durch die Anwesenheit lichtabsorbierender Partikel sowie die Veränderung von Versuchsmedien durch die hohe Adsorptionsfähigkeit von Nanomaterialien zu nennen (KROLL et al., 2009). Zum anderen weisen verschiedene Partikel sehr große Unterschiede hinsichtlich ihrer Toxizität auf (BAHADAR et al., 2016). Häufig kann eine Zunahme der Toxizität bei gleichbleibender Gesamtmasse und abnehmendem Teilchendurchmesser festgestellt werden (BAHADAR et al., 2016; WALZ et al., 2014). Ein Großteil der Studien umfasst allerdings ausschließlich In-vitro-Tests, sodass sich die Ergebnisse nicht direkt auf lebende Organismen übertragen lassen.

Durch In-vitro-Versuche mit Säugerzelllinien konnte gezeigt werden, dass NP Zellmembranen passieren und ins Zellinnere gelangen können. Dort lösen sie teilweise Entzündungsprozesse aus, haben gentoxische Effekte und führen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; engl.: *Reactive oxygen species*) (BARILLET et al., 2010; FOLDBJERG et al., 2010; BHATTACHARY et al., 2009).

Eine Aufnahme von Nanomaterialien über die Lunge ist als sehr wahrscheinlich anzusehen, da durch Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass verschiedene NP die Lungenepithelschicht überwinden können (BACHLER et al., 2015; THORLEY et al., 2014). Bei Nagetieren konnten im Zusammenhang mit Nanomaterialien Entzündungsreaktionen in der Lunge nachgewiesen werden (SCHWOTZER et al., 2017). Auch eine Aufnahme über den Verdauungstrakt von Säugern konnte in vivo und in vitro gezeigt werden (BRAAKHUIS et al., 2015; WALCZAK et al., 2015; JANI et al., 1990). Es wird allerdings wahrscheinlich nur ein Bruchteil der verabreichten Menge tatsächlich aufgenommen. Der Großteil des Materials wird wieder ausgeschieden (JONES et al., 2015). Bei Mäusen konnte eine Aufnahme von Nanomaterialien über die Haut festgestellt werden (TAK et al., 2015). Ein Eindringen von Nanomaterialien erfolgte allerdings nur entlang der Haarfollikel. Insgesamt stellt die Haut von Säugetieren scheinbar eine gute Barriere gegen NP dar und ist als Aufnahmepfad weitgehend

vernachlässigbar (FRÖHLICH & ROBLEGG, 2016; POLAND et al., 2013). Befinden sich Nanomaterialien allerdings im Blutkreislauf von Säugetieren, können sie sich im gesamten Organismus verteilen und sind in vielen Organen wie Leber, Niere, Herz und Gehirn nachweisbar (DE JONG et al., 2008; TAKENAKA et al., 2001).

Für den Menschen stellen Nanomaterialien somit nicht nur eine technologische Errungenschaft dar, sondern auch ein noch weitgehend unbekanntes, gesundheitliches Risiko. Das Risikopotenzial bei Freisetzung der synthetischen Materialien für den Naturhaushalt sowie das Verhalten in verschiedenen Umweltkompartimenten ist zurzeit nicht abschätzbar.

1.2.2 Nanomaterialien in der Umwelt

Eintragspfade

Durch die Zunahme der Anwendung von Nanomaterialien in Konsumgütern und die steigenden Produktionszahlen (PEN, 2019) muss mit einer zunehmenden Freisetzung der Substanzen in der Umwelt gerechnet werden (MACKEVICA et al., 2016; BECKER et al., 2009; KAEGI et al., 2008). Potenzielle Eintragspfade, über welche die Materialien in die Umwelt gelangen können, werden von PETERS et al. (2018) zusammengefasst und sind im Folgenden beschrieben. Es besteht die Gefahr, dass durch die produzierende und verarbeitende Industrie Nanomaterialien freigesetzt werden. Auch durch Unfälle kann es zu einer unbeabsichtigten Kontamination der Umwelt kommen. In privaten Haushalten und besonders in Siedlungsschwerpunkten wie Städten ist mit einer erhöhten Freisetzung von Nanomaterialien z. B. durch Oberflächenabfluss von Hausfassaden zu rechnen. Ein direkter Eintrag in die Umwelt erfolgt in Oberflächengewässern durch die Verwendung von Sonnencreme mit Nanomaterialien als mineralischem UV-Filter. Auf landwirtschaftlich genutzten Flächen werden Nanomaterialien als Dünger oder Pestizid oft direkt ausgebracht (PETERS et al., 2018). Zudem können die Substanzen durch die Verwendung von Klärschlamm als Dünger auf Agrarflächen gelangen (MAHDI et al., 2017; GOTTSCHALK et al., 2009). Die Einleitung von Abwässern und Kläranlagen-Abflüssen in Oberflächengewässer wird als bedeutendster Eintragspfad in die Umwelt angesehen (LOMBI et al., 2012; BENN & WESTERHOFF, 2008; BLASER et al., 2008). Da Nanomaterialien in vielen Körperpflegeprodukten, Textilien und als Beschichtung bei Geräten und Küchenutensilien verwendet werden, besteht ein hohes Risiko, dass sie ins Abwasser und somit in Kläranlagen gelangen. Diese sind bisher nicht für eine gezielte Eliminierung der winzigen Partikel ausgelegt. Dennoch wird gemäß einer Untersuchung von WESTERHOFF et al. (2011) ein Großteil der im Zufluss vorkommenden TiO₂-NP in konventionellen Kläranlagen zurückgehalten, sodass im Abfluss nur noch sehr geringe Konzentrationen nanoskaliger TiO₂-Partikel nachweisbar sind. Dieses Verhalten lässt sich ggf. auch auf andere Nanomaterialien übertragen.

Auswirkungen auf Organismen

Die Erwartung, dass synthetische Nanomaterialien vor allem in aquatischen Systemen auftauchen werden, spiegelt sich in den Studien zur Erforschung der Ökotoxizität wider. Es werden überwiegend aquatische Krebstiere, Algen und Fische im Rahmen von Laborversuchen untersucht (KAHRU & DUBOURGUIER, 2010). Besonders häufig getestete Nanomaterialien sind hierbei TiO₂-, Zinkoxid- und Silber-NP sowie Fullerene (KAHRU & DUBOURGUIER, 2010).

Die Ergebnisse von Laboruntersuchungen zeigen, dass Nanomaterialien und besonders NP von vielen Organismen unterschiedlicher Trophieebenen aufgenommen werden (SKJOLDING et al., 2016) und das Potenzial aufweisen, sich in den Organismen anzureichern (BECKER et al., 2009). Allerdings ist weitgehend unklar, in welchem Umfang sie in den Organismus verlagert und in die Zellen aufgenommen werden (BEDDOES et al., 2015). Nanomaterialien können nachweislich schädliche Wirkungen auf aquatische Organismen wie Fische und Wasserflöhe haben, jedoch auch auf Bodenorganismen wie Asseln, Kompostwürmer und Bodenbakterien. Bei Pflanzen können sie zudem unter anderem negative Effekte hinsichtlich des Wurzelwachstum verursachen (BECKER et al., 2009).

Auftreten von Nanomaterialien in der Umwelt

Voraussagen über das Verhalten von Nanomaterialien in der Umwelt sind schwierig, da z. B. keine Verteilungskoeffizienten bestimmt werden können. So sind beispielsweise anhand des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, welcher genutzt wird, um das Umweltverhalten organischer Chemikalien vorauszusagen, keine Rückschlüsse über Nanomaterialien möglich, da diese sich nicht lösen und ihr Verhalten extrem von den vorliegenden Versuchsbedingungen abhängig ist (PRAETORIUS et al., 2014). Auch die weitgehend unbekanntes Produktionsmengen erschweren die Prognose von Umweltkonzentrationen. Dennoch werden anhand von Modellen Berechnungen zu umweltrelevanten Konzentrationen durchgeführt, welche derzeit sehr geringe Mengen von Nanomaterialien in der Umwelt erwarten lassen (MCGILLICUDDY et al., 2017; BLASER et al., 2008).

Ein direkter Nachweis in der Umwelt erfolgte bisher nur durch sehr wenige Studien (PETERS et al., 2018; KAEGI et al., 2008). Er gestaltet sich schwierig, da die erwarteten und bisher gefundenen Umweltkonzentrationen sehr niedrig sind und sich die Materialien darüber hinaus unter natürlichen Einflüssen verändern können (PETERS et al., 2018; MCGILLICUDDY et al., 2017; NEALE et al., 2013). Nanomaterialien stellen somit ein Risiko noch weitgehend unbekanntes Ausmaßes für die Umwelt dar. Im Sinne einer praktizierbaren Risikobewertung ist es somit wichtig, Methoden zur umfangreichen Charakterisierung und zum Nachweis der Materialien zu finden, das Verhalten von Nanoobjekten in der Umwelt aufzuklären und ihre Wirkung auf Organismen zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit dient dem Ziel, die Forschung in diesem Bereich voranzubringen.

Teil I

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Nanomaterialien

2 Einleitung (Teil I)

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung und dem Nachweis verschiedener Nanomaterialien unter Verwendung der Transmissionselektronenmikroskopie.

2.1 Forschungsprojekt NanoUmwelt

Da bezüglich der Auswirkungen von synthetischen Nanomaterialien Forschungsbedarf besteht, fördert das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) entsprechende Vorhaben (BMBF, 2016). Eines dieser Projekte war „NanoUmwelt“ (Fördernummer 03X0150), dessen Ziel die Risikoanalyse synthetischer Nanomaterialien in der Umwelt war. Vom 01.10.2014 bis zum 31.12.2017 wurden im Rahmen des Projektes Nanomaterialien standardisiert synthetisiert und charakterisiert sowie Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Nanoobjekten in unterschiedlichen Umweltkompartimenten entwickelt. Anhand von human- und ökotoxikologischen Testverfahren wurden die Effekte von Nanomaterialien im Niedrigdosisbereich untersucht. Das Konsortium des Projekts bestand aus 11 Partnern aus Forschung und Industrie (DaNa 2.0, 2018a).

Die Goethe-Universität Frankfurt war als Projektpartner an „NanoUmwelt“ beteiligt. Das Institut für Molekulare Biowissenschaften und speziell die Abteilung „Pflanzliche Zellphysiologie“ stellte mit der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Proben eine hochauflösende, optische Bestimmungsmethode zur Verfügung.

2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Nanoobjekte sind durch ihre geringe Größe mit bloßem Auge oder der Lichtmikroskopie nicht erkennbar. Da ihre Eigenschaften jedoch maßgeblich durch Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit beeinflusst werden (ALBANESE et al., 2012; CAO, 2004), ist eine visuelle Darstellung sehr hilfreich. Die Transmissionselektronenmikroskopie bietet durch ihr hohes Auflösungsvermögen die Möglichkeit hierzu.

Das erste Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurden zu Beginn der 1930er Jahre entwickelt (KNOLL & RUSKA, 1932) und gegen Ende des Jahrzehnts konnten Bakterien als erste biologische Proben untersucht werden (VON BORRIES & RUSKA, 1939; VON BORRIES et al., 1938). Auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie erfolgen bis heute Weiterentwicklungen, sodass inzwischen Auflösungen von weniger als 0,1 nm möglich sind (WEN & MA, 2018; SAWADA et al., 2015).

Das Funktionsprinzip des TEM ähnelt dem eines Lichtmikroskops und beruht auf der Durchstrahlung einer Probe. Während in der Lichtmikroskopie das Auflösungsvermögen durch die Wellenlänge des Lichts auf 200 nm begrenzt ist, kann mit Elektronenmikroskopen dank der deutlich kürzeren Wellenlänge von Elektronen eine mehr als tausendfach höhere Auflösung erreicht werden.

Zur Erzeugung des Elektronenstrahls wird in einem Hochvakuum eine Kathode erhitzt. Die emittierten Teilchen werden von einem elektromagnetischen Linsensystem zu einem gleichmäßigen Strahl gebündelt, der sehr dünne Proben passieren kann. Die Elektronen durchdringen die Probe entweder unbeeinflusst oder werden an Bestandteilen der Probe gestreut, wobei die Streuung mit der Höhe der Ordnungszahl des durchdrungenen Probenatoms zunimmt. Atome mit einer hohen Kernladungszahl führen wegen der starken Streuung zu einer Abschwächung der durchdringenden Elektronenstrahlung. Auf einem beschichteten Leuchtschirm werden die entsprechenden Stellen dunkel dargestellt, während elektronenarme Probenbereiche heller erscheinen. So entsteht ein Abbild der Elektronendichte der Probe in Graustufen, dessen Vergrößerung durch ein weiteres Linsensystem unterhalb des Objekts erfolgt (THOMAS & GEMMING, 2013).

Im TEM können unterschiedliche Arten von Proben abgebildet werden. Durch simples Auftragen und Trocknen können unbelebte Materialproben betrachtet werden. Biologische Proben müssen in der Regel in Harze eingebettet, ausgehärtet und sehr dünn geschnitten werden, um ein aussagekräftiges Bild zu erhalten und das Innere von Zellen sichtbar machen zu können (THOMAS & GEMMING, 2013). Das TEM ist zudem ein in der Forschung häufig eingesetztes Instrument zur Charakterisierung von Nanomaterialien (MENON et al., 2017; PICCHIETTI et al., 2017; MAYHEW et al., 2009; CHITHRANI et al., 2006).

2.3 Zielsetzung

In diesem ersten Teil der vorliegenden Dissertation wurden synthetisierten Nanomaterialien mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Ziel der durchgeführten Versuche ist es, die Eignung des TEM zur Charakterisierung und zum Nachweis von Nanomaterialien in Umwelt- und Organismenproben zu bewerten.

3 Material und Methoden (Teil I)

In diesem Kapitel erfolgt zunächst eine Vorstellung der verwendeten synthetischen Partikel und Nanofasern sowie die Erläuterung der Versuche, welche zur Charakterisierung der Materialien durchgeführt wurden. Anschließend werden die Untersuchungen beschrieben, welche dem Nachweis von Nanomaterialien in umweltrelevanten Matrices wie Umweltproben und Organismen dienen. Zuletzt wird die Durchführung der Versuche erläutert, anhand derer die Aufnahme von synthetischen Partikeln durch Zellen untersucht wurde.

3.1 Untersuchte Nanomaterialien und Mikropartikel

Im Projekt NanoUmwelt wurde unter anderem die Synthese und Modifikation von Nanomaterialien untersucht. Der Fokus bei der Auswahl der herzustellenden Nanoobjekte lag dabei auf kommerziell bedeutsamen und schwer abbaubaren synthetischen Nanomaterialien. Es wurden metallische und kunststoffbasierte Partikel sowie mehrwandige Nanoröhrchen aus Kohlenstoff hergestellt.

Silber-Nanopartikel (Ag-NP) werden aufgrund ihrer keimhemmenden Wirkung häufig und in verschiedenen Bereichen eingesetzt (SARAVANAN et al., 2018; GOMAA, 2017). Sie sind beispielsweise in medizinischen Wundauflagen und Textilien sowie als Beschichtung in Kühlschränken und Waschmaschinen enthalten. Dadurch, dass die Partikel seit Jahrzehnten auf dem Markt sind und ein breites Anwendungsspektrum aufweisen, stehen viele Erkenntnisse aus durchgeführten Studien zur Verfügung (DaNa 2.0, 2018b).

Nanopartikel aus Titandioxid (TiO_2 -NP) sind ebenfalls weit verbreitet und vergleichsweise gut untersucht. Sie zählen zu den am meisten produzierten Nanomaterialien weltweit (PICCINNO et al., 2012). Durch ihre Anwendung in Sonnencremes und anderen Körperpflegeprodukten des täglichen Gebrauchs kommt der Mensch mit diesen NP häufig in direkten Kontakt. Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet für TiO_2 -NP ist der Einsatz in Wand- und Fassadenfarben (DaNa 2.0, 2018c).

Verglichen mit den vorangegangenen Materialien gibt es derzeit für Polystyrol-Nanopartikel (PS-NP) mengenmäßig deutlich weniger konkrete Anwendungen. Sie werden unter anderem zur Verbesserung der Stabilität und Haltbarkeit von Materialien sowie als Transporter für Medikamentenwirkstoffe im Körper eingesetzt (NOLTE et al., 2017; HMWVL, 2009). Den Materialien wird zudem ein hohes Entwicklungspotenzial zugesprochen. Die Partikel und andere nanoskalige Kunststoffe sind trotz ihrer zur Zeit geringen Einsatzmenge von großem Interesse für die Umweltforschung, da sie auch sekundär durch den Abbau von Plastik in der Umwelt entstehen können (LAMBERT & WAGNER, 2016; LAMBERT et al., 2013).

Kohlenstoff-Nanoröhrchen werden aufgrund ihrer Stabilität zur Verbesserung anderer Materialien z. B. bei Sportgeräten oder in der Automobilherstellung eingesetzt. Wegen ihrer Leitfähigkeit finden

sie zudem in elektronischen Geräten Verwendung. Durch ihre vielfältigen Eigenschaften haben die Fasern ein außerordentlich hohes Entwicklungspotenzial und werden kontinuierlich modifiziert (DaNa 2.0, 2018d). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Asbest waren sie bereits häufig Gegenstand toxikologischer Untersuchungen (ÖNER et al., 2015; DONALDSON et al., 2013).

Von der PlasmaChem GmbH wurden verschiedene Nanopartikel und -fasern sowie mikroskalige Partikel aus den genannten Materialien synthetisiert und den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde als Referenzmaterial das von der RAS AG hergestellte AgPure verwendet. Da Nanomaterialien häufig oberflächenfunktionalisiert werden, um ihre Eigenschaften an die jeweiligen Anforderungen anzupassen, wurden von den hergestellten unmodifizierten Nanoobjekten mit neutraler Oberfläche zusätzlich modifizierte Formen mit funktionellen Gruppen hergestellt. Zur Erzeugung einer negativen Oberflächenladung wurden Carboxy- und für eine positive Ladung Aminogruppen an die Partikeloberflächen gebunden.

Die unmodifizierten Ag-NP entstanden durch die Reaktion von Silbernitrat und Polyvinylpyrrolidon. Zur Herstellung der funktionalisierten Formen wurden zunächst hydrophobe Basispartikel aus Silbernitrat und Oleylamin synthetisiert. Durch Ligandenaustausch wurden mit 3-Mercaptopropionsäure Partikel mit einer negativ geladenen Oberfläche erzeugt. Mit Cysteamin wurden die Partikel mit positiver Oberflächenladung hergestellt. Die TiO₂-Grundpartikel entstanden durch die Hydrolyse von Titan-tetrachlorid und die anschließende Stabilisierung mit Salpetersäure. Über die schrittweise Beladung der Oberfläche wurden mit Zitronensäure carboxylierte Partikel und mit Aminopropyltrimethoxysilan aminierte Partikel hergestellt. Die PS-Partikel wurden durch Emulsionspolymerisation aus Styrol, Divinylbenzol und Natrium-Dodecylbenzensulfonat hergestellt. Zur besseren Detektierbarkeit wurde während der Synthese zudem der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G beigemischt. Die Oberflächenfunktionalisierung wurde durch die Zugabe von Acrylsäure bei den carboxylierten Partikeln und 2-(Diethylamino)ethylacrylat bei den aminierten Partikeln erreicht. Zur Herstellung der mehrwandigen Kohlenstofffasern wurden kommerziell erhältliche CNT wiederholt partiell oxidiert und mit Salz- und Salpetersäure gewaschen. Um eine ungeladene Partikeloberfläche zu erhalten, wurden Styrol-Copolymere an die π -System angebonden. Diese Grundfasern wurden durch das Anfügen von Maleinsäureanhydrid an die Copolymere zu CNT mit oberflächengebundenen Carboxylgruppen modifiziert. Durch die Zugabe von Diethylaminoethylacrylat entstanden CNT mit angehängten Aminogruppen.

Eine Übersicht der hergestellten Nanomaterialien sowie der im Folgenden für sie verwendeten Bezeichnungen ist in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1) Übersicht über Grundmaterial, Form, Modifikation und Benennung der von PlasmaChem synthetisierten Nanomaterialien, sowie der AgPure-Nanopartikel der RAS GmbH.

Material	Form	Modifikation	Oberflächenladung	Bezeichnung
Silber	Nanopartikel	keine	neutral	Ag-n
		keine	neutral	AgPure
		Carboxygruppe	negativ	Ag-COOH
		Aminogruppe	positiv	Ag-NH ₂
Titandioxid	Nanopartikel	keine	neutral	TiO ₂ -n
		Carboxygruppe	negativ	TiO ₂ -COOH
		Aminogruppe	positiv	TiO ₂ -NH ₂
Polystyrol	Nanopartikel	keine	neutral	PS-n
		Carboxygruppe	negativ	PS-COOH
	Aminogruppe	positiv	PS-NH ₂	
	Mikropartikel	Carboxygruppe	negativ	PS-COOH-600
Kohlenstoff	Nanofasern	keine	neutral	CNT-n
		Carboxygruppe	negativ	CNT-COOH
		Aminogruppe	positiv	CNT-NH ₂

3.2 Materialcharakterisierung und -vorbereitung

Die im Folgenden beschriebene Charakterisierung der Nanomaterialien hinsichtlich Größe, Form und Verhalten ist äußerst wichtig, um eine sinnvolle Bewertung der eigenen Versuchsergebnisse und den Vergleich mit anderen Studien vornehmen zu können.

3.2.1 Größenmessung

Die von PlasmaChem hergestellten Materialien wurden in wässrigen Suspensionen geliefert und gelagert. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte die Vorbereitung und Analyse der Materialien mittels TEM immer nach dem im Folgenden beschriebenen Schema.

Vor jeder Verwendung der Stammsuspensionen wurden diese 15 min im Ultraschallbad bei einer Leistung von 42 W/L behandelt. Diese Mischmethode sollte eine gleichmäßige Verteilung der Partikel in der Flüssigkeit sowie den Zerfall von zwischenzeitlich gebildeten Sekundärpartikeln gewährleisten, sodass definierte Konzentrationen der Nanomaterialien hergestellt werden konnten. Die Ultraschallbehandlung wurde ausgewählt, da sie eine weit verbreitete Methode zur Vorbereitung

von Nanomaterialien ist (TAUROZZI et al., 2011). Mit Reinstwasser (Wasser für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, VWR Chemicals) erfolgte eine Verdünnung der Nanomaterialien auf 10 µg/mL. Jeweils 2 µL der verdünnten Proben wurden auf Kupferplättchen mit ovalen Aussparungen (Single Slot Grids) aufgetragen, welche mit einem dünnen Pioloformfilm bespannt waren, der vom Elektronenstrahl des TEM passiert werden kann. Im Fall der titandioxidbasierten Nanomaterialien wurden zusätzlich Proben auf Kupfernetze mit einem Kohlefilm aufgetragen. Die Proben wurden bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie mit dem Philips CM 12 TEM bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV untersucht wurden. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte anhand von Aufnahmen, welche mit der Kamera Erlangshen ES500W von Gatan gemacht wurden. Mit dem Programm ImageJ 1.45s wurden die Größen von jeweils 100 Objekten vermessen. Bei den sphärischen und unregelmäßig geformten Partikeln wurde der maximale Durchmesser der Einzelobjekte angegeben. Für die drei Nanofasern erfolgte aufgrund von Verarbeitungs- und Darstellungsproblemen keine Größenmessung mittels TEM.

Aus den 100 Messungen wurde für jeden Partikeltyp der arithmetische Mittelwert (MW) gebildet und die Standardabweichung (SD; engl.: *Standard deviation*) berechnet.

3.2.2 Optische Beurteilung

Durch die Analyse der erzeugten Aufnahmen konnte die Verteilung der Nanoobjekte auf dem Film sowie ihre Neigung zur Bildung von Sekundärpartikeln beschrieben werden. Des Weiteren erfolgte eine Charakterisierung von Partikelform und -elektronendichte. Die Anwesenheit von sichtbaren Fremdstoffen in der Probe wurde ebenfalls vermerkt.

3.2.3 Materialstabilität gegenüber Chemikalien

Im Rahmen des Projekts NanoUmwelt, sollten Zellproben auf in die Zellen aufgenommene Nanomaterialien überprüft werden. Um derartige biologischen Proben im TEM untersuchen zu können, müssen sie zunächst entwässert, in Kunstharz eingebettet und geschnitten werden. Hierbei werden einige Chemikalien eingesetzt, von denen bekannt ist, dass sie als Lösemittel für PS fungieren können, denn das Polymer ist gegenüber vielen organischen Lösemitteln nicht stabil (GESTIS, 2018). Daher musste geprüft werden, ob die PS-Partikel unter dem Einfluss der eingesetzten Chemikalien Anzeichen von Auflösung zeigen und demnach in der Probe eventuell nicht mehr nachweisbar wären, obwohl sie von den Zellen aufgenommen wurden.

Die PS-n wurden in diesem Versuch den Chemikalien Ethanol, Aceton und Propylenoxid ausgesetzt, welche typischerweise bei der Einbettung von organischem Material in Epoxidharze eingesetzt werden. Zunächst wurde eine wässrige Suspension mit einer Konzentration von 50 µg PS/mL hergestellt. Sie wurde auf vier Aliquote, bestehend aus 1 mL aufgeteilt und bei 6,2 rcf für 20 min

zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Medium entfernt und das Pellet in 250 μL Reinstwasser sowie in den drei zu untersuchenden Chemikalien resuspendiert. Die Proben wurden 30 min lang leicht geschüttelt, noch einmal zentrifugiert und die Flüssigkeit durch Reinstwasser ersetzt. Anschließend erfolgte eine fünfzehnminütige Ultraschallbehandlung bei 42 W/L. 2 μL Suspension wurden entnommen und auf Grids getrocknet, welche anschließend im TEM untersucht wurden. Mit der Kamera wurden Bilder von den Partikeln aufgenommen, anhand derer Unterschiede in Form und Verhalten beurteilt wurden.

3.3 Synthetische Partikel in umweltrelevanten Matrices

Der Nachweis von synthetischen Nanomaterialien in der Umwelt ist aufgrund der umgebenden komplexen Matrices schwierig. Es sollte überprüft werden, ob mittels TEM in Realproben aus der Umwelt synthetische Nanoobjekte nachweisbar sind. Zudem wurden einige Proben mit Nanomaterialien versetzt und geprüft, ob eine Wiederfindung mit dem Elektronenmikroskop möglich ist und wie sich die Partikel in den Umweltproben verhalten. Untersucht wurden Boden- und Fließgewässerproben sowie Fischgewebe und humane Körperflüssigkeiten.

3.3.1 Umweltkompartimente

Im Folgenden wird das Vorgehen hinsichtlich der beiden untersuchten Umweltkompartimente Boden und Wasser näher erläutert.

Boden

Es ist möglich, dass synthetische Nanomaterialien in Böden eingetragen werden. Ein Beispiel dafür sind Düngemittel in Nanoform, welche auf landwirtschaftlich genutzten Flächen ausgebracht werden (THAKUR et al., 2018). Die im Projekt untersuchte Bodenprobe wurde von der Universität Trier im Mai 2013 auf einer Ackerfläche nördlich der Stadt entnommen. Die obersten 30 cm des Lehmbodens wurden abgetragen, vollständig durch ein Sieb mit 2 mm großen Öffnungen gesiebt und bei 6 °C gelagert. Die Universität Trier führte mit diesem Boden eine Perkolationsstudie mit zum Teil umweltrelevanten Ag-COOH-Konzentrationen durch. Aufgabe der Universität Frankfurt war es zu überprüfen, ob diese Konzentrationen mittels TEM im Boden nachweisbar sind und ob sich somit das TEM zur Analyse solcher Umweltproben methodisch eignet. Dazu wurde nach dem Erhalt der Probe, der Boden in Reinstwasser suspendiert (5 mg/mL), um eine für das TEM ausreichend dünne Probenschicht zu erzeugen. Die Suspension wurde für 15 min im Ultraschallbad behandelt und für die Untersuchung im TEM vorbereitet. Die Ag-COOH wurden mit der restlichen Boden-Wasser-Suspension auf die Konzentrationen 100; 10; 1; 0,1 und 0,01 μg Ag-COOH/g Boden verdünnt (gespikte Proben). Proben dieser Suspensionen wurden nach der Standard-Methode vorbereitet und ebenso wie die reinen Bodenproben (ungespikte Proben) mittels TEM untersucht. Während anhand der gespikten Proben geprüft wurde, ob eine Wiederfindung mittels Elektronenmikroskopie möglich

ist, wurden die ungespikten Proben auf die Anwesenheit von in der Umwelt vorkommenden Nanomaterialien untersucht.

Wasser

Ein weiteres wichtiges Umweltkompartiment, welches untersucht wurde, war ein Fließgewässer. Aus dem Rhein bei Worms wurden über einen Zeitraum von zehn Monaten mehrere 28-Tage-Mischproben entnommen. Diese wurden parallel an 4 Stellen des Flussquerschnittes abgeleitet. Mittels Zentrifugation (16,2 rcf, 10 min) wurden die enthaltenen Feststoffe von der Flüssigkeit getrennt. Das Pellet wurde in einem geringeren Reinstwasservolumen resuspendiert, sodass eine fünffache Anreicherung der Feststofffraktion erreicht wurde. Die Suspensionen wurden anschließend nach Standardprotokoll für das TEM vorbereitet und auf das Vorhandensein von Nanomaterialien untersucht. Zusätzlich wurden nicht angereicherte Rheinwasserproben mit Ag-, TiO₂- und PS-NP versetzt (jeweils 10 µg/mL). Mit Hilfe des TEM wurde das Verhalten der NP in der umgebenden Matrix dokumentiert.

3.3.2 Proben von Organismen

Es wurden humane Blut- und Urinproben, sowie Gewebe und Blutproben von Fischen untersucht, welche vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) bereitgestellt wurden.

Humane Körperflüssigkeiten

Das Fraunhofer IBMT erhielt im Rahmen einer Kooperation mit dem Umweltbundesamt Blut- und Urinproben, welche bei einer Probenahme für die Umweltprobenbank des Bundes freiwilligen Probanden entnommen worden waren. Die Blutproben wurden bei der Entnahme in Gefäße mit Ethylendiamintetraazetat (EDTA) überführt und somit der Gerinnung vorgebeugt. Jeweils eine Blut- und Urinprobe wurde in tiefgefrorenem Zustand der Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt. Um sie mittels TEM betrachten zu können, wurde zunächst die Erzeugung einer ausreichend geringen Probendicke untersucht. Hierfür wurden 100-, 50-, 25- und 1-prozentige Verdünnungen hergestellt und für die Untersuchung mittels TEM vorbereitet. Die 1-prozentigen Proben wurden schließlich auf die Anwesenheit von Nanomaterialien überprüft.

Fischgewebe und -blut

Von Mitarbeitern des Fraunhofer IBMT wurden im Jahr 2015 Brassen (*Abramis brama*) aus der Saar gefangen. Die Organe Leber, Milz und Darm sowie Proben der Muskulatur und des Blutes wurden entnommen. Zum Aufbrechen der Zellstruktur wurden die Gewebe kleingeschnitten und Trypsin-EDTA im Verhältnis 1:2 zum Verdau zugesetzt, wodurch die Zellmembranen zerstört wurden. Die Proben wurden für 16 h unter rotierenden Bewegungen bei 37 °C inkubiert. Darauf folgte die Homogenisierung mit einem Ultra-Turrax® mit Dispergier-Werkzeug. Die Proben wurden

tiefgefroren an die Universität Frankfurt verschickt. Das homogenisierte Gewebe wurde auf 20 µg/mL mit Reinstwasser verdünnt. Das Blut musste auf 1 µg/mL verdünnt werden, um eine für die Untersuchung mittels TEM taugliche Probendicke zu erhalten. Die Proben wurden auf die Anwesenheit von Nanomaterialien untersucht.

Das homogenisierte Muskelgewebe der Fische wurde zudem mit Ag-n und PS-n versetzt. Hierfür wurde das biologische Material zunächst mit Wasser auf 20 µg Gewebe/mL verdünnt. Anschließend wurden die Nanomaterialien hinzugefügt, sodass ihre Konzentration letztendlich 500 µg/mL unverdünntem Muskelgewebe betrug.

3.4 Untersuchung von Zellkulturen und Gewebe

Die Versuche wurden mit humanen Darm- und Stammzellkulturen sowie Gewebestücken von Schweinedünndärmen, welche durch das Fraunhofer IBMT zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt. Die Eidgenössische Materialprüfungs- und Forschungsanstalt (Empa) stellte zudem Proben eines humanen Plazentabarriere-Modells zur Verfügung.

3.4.1 Darmbarriere

In zwei Versuchen des Fraunhofer IBMT wurden im Zuge des Projekts NanoUmwelt Säugerdarmzellen untersucht. Aus den Experimenten sollten Schlüsse bezüglich der möglichen Aufnahme von Nanomaterialien über das Darmgewebe in den Organismus gezogen werden. In einem In-vitro-Experiment wurden Co-Kulturen humaner Caco-2- und HT29-MTX-E12-Zellen auf Glasdeckgläschen angezogen und für 72 h gegenüber Ag-NH₂ und PS-NH₂ (jeweils 10 µg Ag/mL) exponiert.

Bei einem Ex-vivo-Versuch wurden noch funktionsfähige Schweinedünndarmstücke in eine Ussing-Kammer eingespannt, welche der Untersuchung der Durchlässigkeit lebenden Gewebes dient. Die Zellen der Darminnenseite wurden jeweils 4 h lang gegenüber Ag-NH₂ oder PS-NH₂ exponiert, wobei die Ag- bzw. PS-Konzentration jeweils 10 µg/mL betrug.

Die Vorbereitung der Zellen und Gewebe für das TEM begann beim Fraunhofer IBMT mit der Fixierung der Proteine des organischen Materials. Hierfür wurden 398 mL bidestilliertes Wasser mit 5 g Paraformaldehyd auf 75 °C erhitzt. Die milchige Lösung wurde mit Natronlauge geklärt und zügig abgekühlt. Anschließend wurden 150 mL 0,4 molarer Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,3 sowie 2 mL 0,5-prozentige Calciumchlorid-Lösung und 50 mL 25-prozentige Glutaraldehyd-Lösung hinzugegeben. Die Proben wurden darin eine Stunde lang unter leichtem Schütteln fixiert, zweimal mit einem Puffer gereinigt und in diesem gekühlt an die Universität Frankfurt verschickt. Der Waschpuffer bestand aus 500 mL bidestilliertem Wasser, in dem 5,3 g Natriumdihydrogenphosphat-

Monohydrat und 28 g Dikaliumhydrogenphosphat gelöst wurden. Der pH-Wert des Puffers wurde schließlich auf 7,3 eingestellt.

An der Universität Frankfurt angekommen, wurden die Proben mit Osmiumtetroxid (OsO_4) behandelt, um die enthaltenen Lipide zu fixieren. Hierfür wurde das organische Material 30 min lang in einer 2-prozentigen OsO_4 -Lösung leicht geschüttelt und anschließend zweimal mit dem zuvor hergestellten Puffer gewaschen. In einer aufsteigenden Ethanol-Reihe wurden die Proben entwässert, wofür sie jeweils einmal für 10 min in 30-, 50-, 70-, 90- und zweimal in 100-prozentigem Alkohol leicht geschüttelt wurden. Die Proben wurden daraufhin zweimal 10 min in Propylenoxid und danach für 16 h in einem 1:1-Gemisch aus Propylenoxid und dem Epoxidharz Araldit eingelegt. Anschließend wurden sie für 2 h in reines Araldit überführt und nach Ablauf dieser Zeit mit frischem Harz überschichtet. Nach weiteren 2 h Einwirkdauer, wurden die Gewebestücke in BEEM®-Kapseln gelegt und mit Araldit bedeckt. Auf die Deckgläschen wurden ebensolche Kapseln mit erwärmtem und bereits zähflüssigem Araldit gestülpt. Alle Proben wurden bei 60 °C für 48 h ausgehärtet. Mit einem Mikrotom (Ultracut S, Reichert) wurden von der Technischen Assistentin Marion Basoglu Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 40 nm angefertigt und auf Single Slot Grids übertragen. Zur besseren Darstellung von Proteinen und Lipiden wurde eine Doppelkontrastierung mit Schwermetalllösungen durchgeführt. Die Schnitte wurden für 12 min bei Dunkelheit in Uranylacetat-Lösung (5 % in Methanol) getaucht und danach mit verdünntem Methanol und Wasser gewaschen. Das Bleicitrat, welches für den zweiten Kontrastierungsvorgang benötigt wurde, entsprach in Herstellung und Zusammensetzung den Angaben der Veröffentlichung von REYNOLDS (1963). Die Grids wurden für 8 min darin eingetaucht und anschließend mit Wasser und Natronlauge (NaOH) gewaschen. Nach 1 h Trocknungsdauer konnten die Präparate mittels TEM untersucht werden.

3.4.2 Stammzellen

Vom Fraunhofer IBMT wurde ein Versuch mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC; engl.: *Human mesenchymal stem cells*) mit adipogener Differenzierung durchgeführt. Diese wurden auf Deckgläschen angezogen und 21 Tage lang mit Ag-COOH, Ag-NH₂, PS-COOH und PS-NH₂ bei einer Konzentration von 1 µg/mL kultiviert. Die Fixierung, Entwässerung, Einbettung und das Schneiden der Proben erfolgten auf die gleiche Weise wie für die Darmzellen bereits beschrieben.

3.4.3 Sphäroide

Ein weiterer vom Fraunhofer IBMT durchgeführter Versuch untersuchte die Aufnahme von Nano- und Mikropartikeln durch Sphäroide. Die ca. 1000 µm großen Zellkörperchen, bestanden ebenfalls aus adipogen differenzierten hMSC. Die Zellen wurden für 21 Tage mit Ag-COOH, PS-COOH und PS-COOH-600 bei einer Konzentration von 1 µg/mL kultiviert und anschließend wie die vorherigen organischen Proben für das TEM vorbereitet.

3.4.4 Plazentabarriere

Die Empa entwickelte ein Co-Kultur-Translokationsmodell, um den Transport von Nanomaterialien über die humane Plazentabarriere in vitro untersuchen zu können (AENGENHEISTER et al., 2018). Hierfür wurden auf der apikalen Seite einer porösen Membran Trophoblasten (BeWo-Zellen) und auf ihrer basolateralen Seite einschichtig plazentale Endothelzellen (HPE-Zellen; engl.: *Human placental endothelial cells*) angezogen. Im Rahmen von NanoUmwelt wurden von der Empa mit diesem Modell Versuche mit Ag-COOH, Ag-NH₂, PS-COOH, PS-NH₂ und PS-COOH-600 durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen betragen bei den Silbermaterialien 5 µg/mL und bei den PS-Partikeln 10 µg/mL. Versuche mit einer deutlich höheren Konzentration (100 µg/mL) wurden zudem mit den PS-COOH und PS-COOH-600 durchgeführt. Die Testdauer betrug jeweils 24 h.

Die Membranen mit den anhaftenden Zellschichten wurden von der Empa nach eigenen Rezepten mit Glutaraldehyd (3 %) in 0,1 molarer Natrium-Cacodylat-Pufferlösung fixiert und mit 0,2 molarem Natrium-Cacodylat-Puffer gewaschen. Die Proben sowie Puffer zur weiteren Behandlung wurden der Universität Frankfurt gekühlt übermittelt und entsprechend der vorherigen Versuche weiterverarbeitet.

Durch die Untersuchungen der verschiedenen Zellproben mittels TEM, sollte die Eignung der in dieser Arbeit angewandten Methode als Nachweis für die Aufnahme von NP in Zellen festgestellt werden.

4 Ergebnisse (Teil I)

In diesem Kapitel werden die im Rahmen der durchgeführten Versuche erstellten TEM-Bilder abgebildet und beschrieben sowie die aus ihnen ermittelten Messwerte aufgeführt.

4.1 Materialcharakterisierung und -vorbereitung

4.1.1 Größenmessung

Die von den beiden Herstellern angegebenen Größen für die verschiedenen Ag-NP stimmten sehr genau mit den gemessenen Werten überein. Die Abweichungen lagen unter 10 % (Tab. 2). Die unmodifizierten TiO₂-n setzten sich vorrangig aus sehr kleinen NP sowie wenigen, aber im Vergleich etwas größeren Nanoobjekten zusammen. Als gemessene Größe wurde der Durchschnittswert der kleinen Partikel gewählt, da diese bei weitem den Hauptteil der Gesamtpartikelzahl ausmachten. Eine genaue Messung der beiden modifizierten TiO₂-NP war nicht möglich, da aufgrund der geringen Größe keine scharfen Aufnahmen erzeugt werden konnten. Eine Abschätzung der Partikelgröße legte jedoch nahe, dass die einzelnen Objekte kleiner als 2 nm waren. In jedem Fall waren alle TiO₂-NP mit einer Abweichung von über 65 % deutlich kleiner, als vom Hersteller angegeben. Die PS-n waren etwa 5 % größer als die Überprüfung des Herstellers ergab. Eine ebenfalls relativ niedrige Abweichung von 17,5 % zu den Angaben des Herstellers, wiesen die Mikropartikel auf, welche damit etwas kleiner als erwartet waren. Bei den modifizierten PS-Partikeln waren die Abweichungen mit jeweils über 50 % deutlich höher. Während die PS-COOH kleiner als erwartet waren, wiesen die PS-NH₂ einen größeren Durchmesser auf.

Die Größenverteilung zwischen den einzelnen Partikeltypen variierte deutlich (Tab. 2). Die unmodifizierten Ag-n, AgPure und PS-n wiesen eine relative SD zwischen 33 und 37 % auf. Bei den TiO₂-n war sie mit rund 28 % des MW noch etwas niedriger. Die beiden modifizierten Ag-NP waren bezüglich ihrer Größe etwas diverser, wobei die Ag-NH₂ mit rund 55 % die breiteste Verteilung aufwiesen. Die geringste prozentuale SD hatten mit knapp 4 % die PS-COOH-600. Bei den modifizierten PS-NP lag sie bei unter 20 %.

Tab. 2) Größenangaben der Hersteller zu den Nanoobjekten und Ergebnisse der Größenmessung mittels TEM sowie die relative Standardabweichung und die Abweichung der selbst gemessenen Werte von den Herstellerangaben.

Partikelbezeichnung	Größe laut Hersteller	Gemessene Größe [MW ± SD]	Relative SD	Abweichung von Herstellerangabe
Ag-n	10,0 nm	9,65 ± 3,45 nm	35,8 %	-3,50 %
AgPure	10,0 nm	10,8 ± 3,52 nm	32,6 %	+8,00 %
Ag-COOH	6 nm	5,69 ± 2,28 nm	40,1 %	-5,17 %
Ag-NH ₂	6 nm	6,16 ± 3,37 nm	54,7 %	+2,67 %
TiO ₂ -n	4-8 nm	1,95 ± 0,54 nm	27,7 %	-67,5 %
TiO ₂ -COOH	4-8 nm	< 2 nm	k. A.	> -66,7 %
TiO ₂ -NH ₂	4-8 nm	< 2 nm	k. A.	> -66,7 %
PS-n	31,0 nm	32,6 ± 11,9 nm	36,5 %	+5,16 %
PS-COOH	68,0 nm	41,3 ± 7,91 nm	19,2 %	-64,7 %
PS-NH ₂	57,7 nm	86,6 ± 11,2 nm	12,9 %	+50,1 %
PS-COOH-600	600 nm	495 ± 20,0 nm	4,04 %	-17,5 %

4.1.2 Optische Beurteilung

Silber-Nanopartikel

Die Betrachtung der Ag-NP zeigte eine sehr gleichförmige Verteilung der Ag-n und AgPure, während die modifizierten Ag-NP sich eher zusammenlagerten (Abb. 2a, Abb. 3a, Abb. 4a, Abb. 5a). Die Ag-COOH formten verzweigte Strukturen mit freien Flächen dazwischen, während die Ag-NH₂ teilweise über 100 nm große Sekundärpartikel bildeten. Es traten jedoch auch lockere Gruppierungen mit erkennbaren Einzelpartikeln auf. Die Primärpartikel der Ag-n, AgPure und Ag-COOH lagen einzeln vor (Abb. 2b, Abb. 3b, Abb. 4b). Die Ag-n und AgPure lagerten sich locker zu Gruppen zusammen. Die dunkel erscheinenden Ag-COOH waren von helleren, diffusen Schlieren umgeben, innerhalb derer kleinere, helle NP erkennbar waren. Bei der Vergrößerung einer Ansammlung von Ag-NH₂ war erkennbar, dass die einzelnen Nanoobjekte dicht beieinander lagen und teilweise optisch nicht voneinander abgrenzbar waren (Abb. 5b). Die Partikelform war

bei allen vier Ag-Nanomaterialien ähnlich. Die Umriss waren glatt und unregelmäßig rundlich bis oval. Die Elektronendichte variierte von grau bis schwarz. Sie war nicht gleichmäßig, einige Partikel wiesen dunkle Streifen oder Flecken auf.

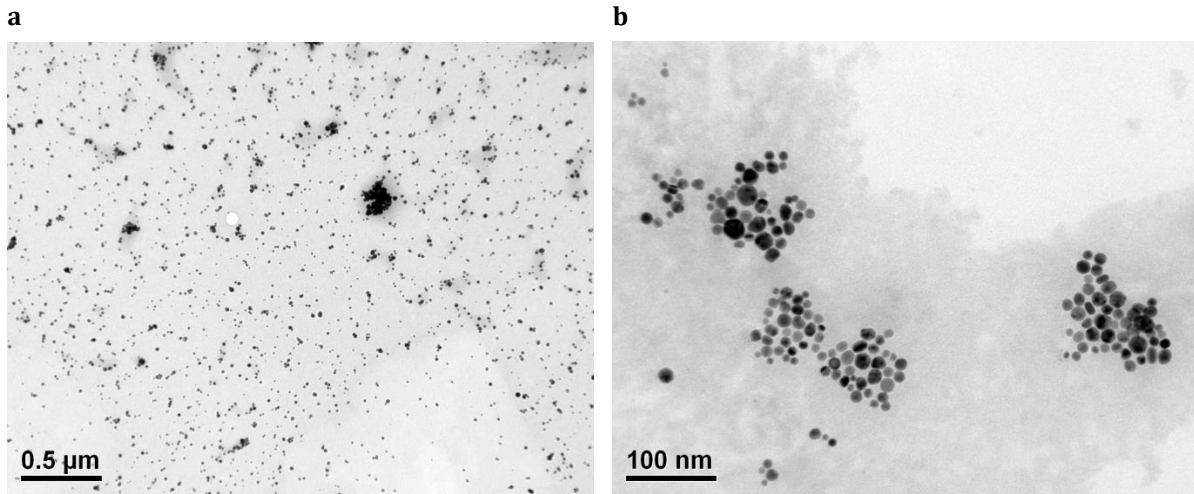


Abb. 2) TEM-Aufnahmen von Ag-n bei einer Konzentration von 10 µg Ag/mL Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

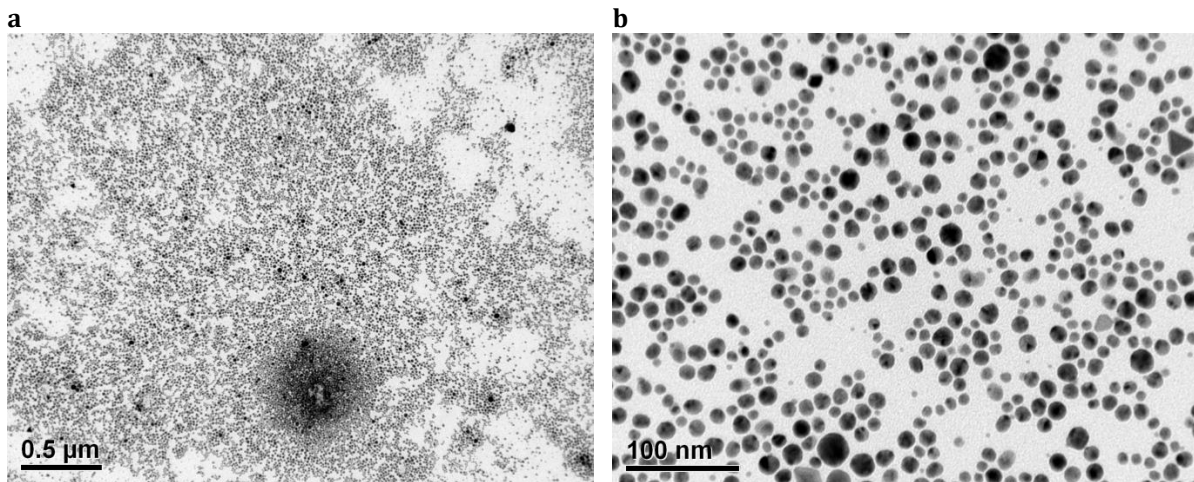


Abb. 3) TEM-Aufnahmen von AgPure bei einer Konzentration von 10 µg Ag/mL Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

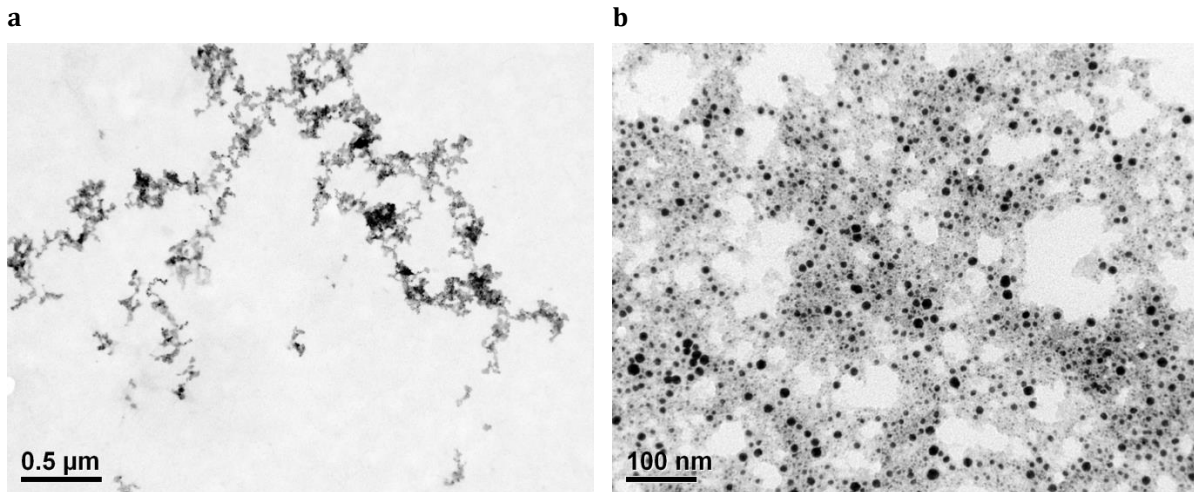


Abb. 4) TEM-Aufnahmen von Ag-COOH bei einer Konzentration von 10 µg Ag/mL Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

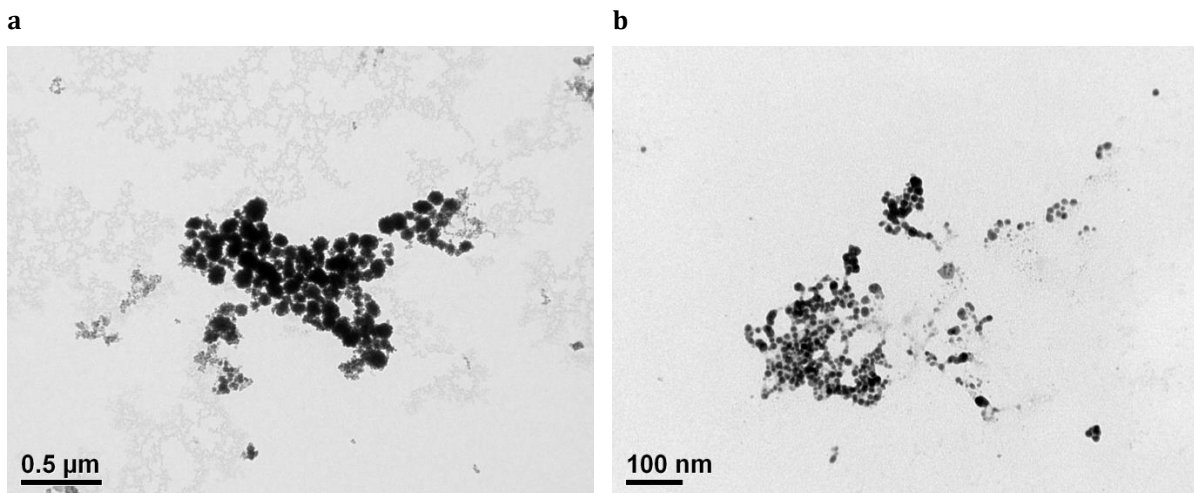


Abb. 5) TEM-Aufnahmen von Ag-NH₂ bei einer Konzentration von 10 µg Ag/mL Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

Titandioxid-Nanopartikel

Die Untersuchung der TiO₂-n und TiO₂-NH₂ zeigte, dass sich die Nanomaterialien zu verzweigten Strukturen auf dem üblicherweise verwendeten Pioloformfilm zusammenlagerten (Abb. 6a, Abb. 8a). Diese wurden von freien Flächen unterbrochen. Im Fall der TiO₂-COOH waren strukturierte, graue Schemen identifizierbar (Abb. 7a). Die Struktur war flächiger als bei den beiden anderen Partikeltypen. Bei höheren Vergrößerungen der drei Materialien auf Kohlefilmen zeigten sich teils unscharfe, sehr kleine Einzelpartikel (Abb. 6b, Abb. 7b, Abb. 8b). Zwischen den in der Regel sehr kleinen TiO₂-n und TiO₂-NH₂ waren zudem größere Einzelpartikel erkennbar. Die TiO₂-n und TiO₂-COOH lagen größtenteils einzeln vor, wobei letztere lockere Ansammlungen

bildeten. Die $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$ lagen sehr dicht bei- und übereinander und waren kaum voneinander abgrenzbar. Die Umrisse der einzelnen Objekte der drei Nanomaterialien waren unregelmäßig und eckig bis rundlich geformt. Sie zeigten sich im Elektronenmikroskop grau bis schwarz und ungleichmäßig kontrastiert.

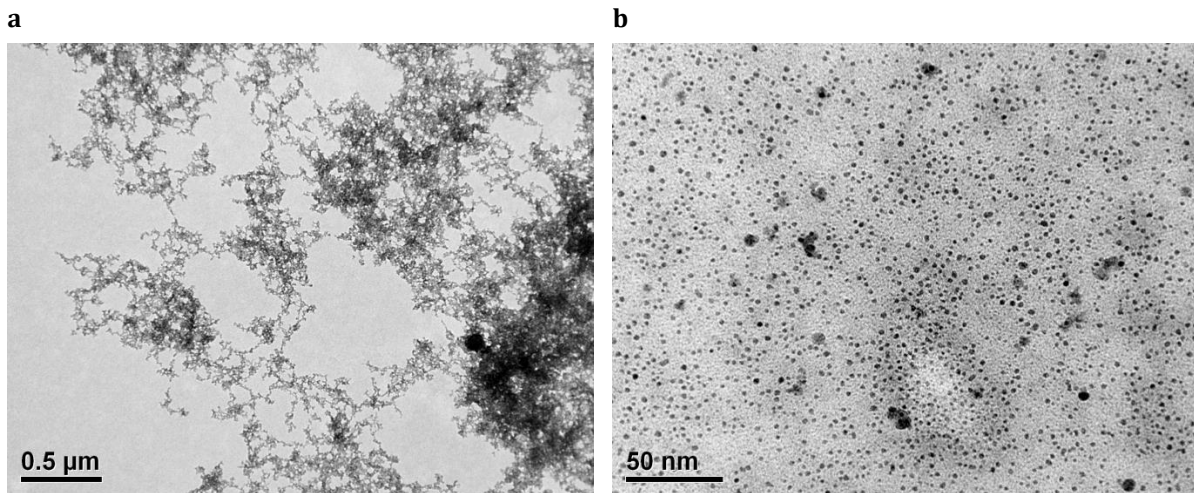


Abb. 6) TEM-Aufnahmen von $\text{TiO}_2\text{-n}$ bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$ Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme auf pioloformbefilmtem Single Slot Grid, (b) Detailaufnahme auf Kupfernetz mit Kohlefilm.

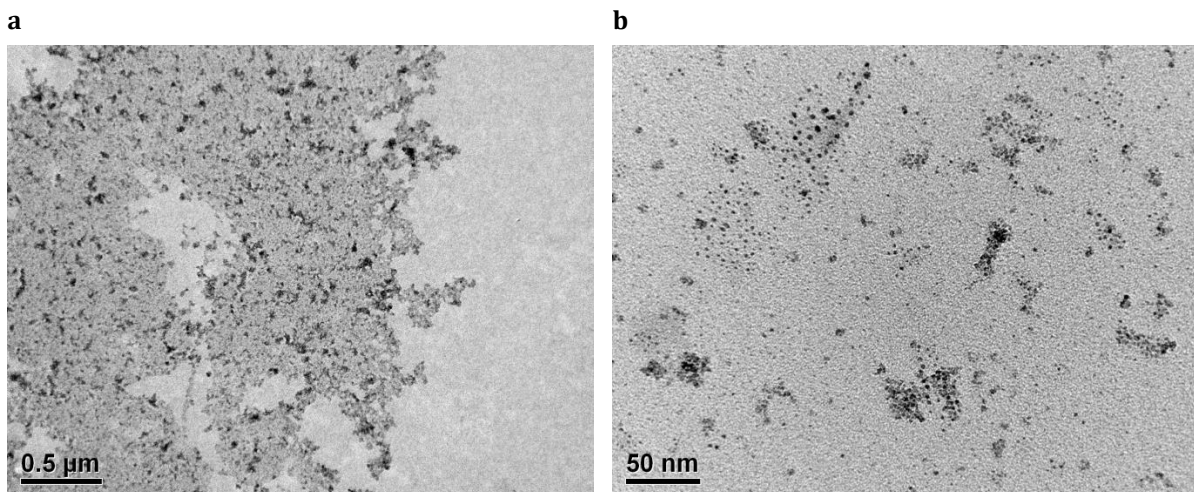


Abb. 7) TEM-Aufnahmen von $\text{TiO}_2\text{-COOH}$ bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$ Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme auf pioloformbefilmtem Single Slot Grid, (b) Detailaufnahme auf Kupfernetz mit Kohlefilm.

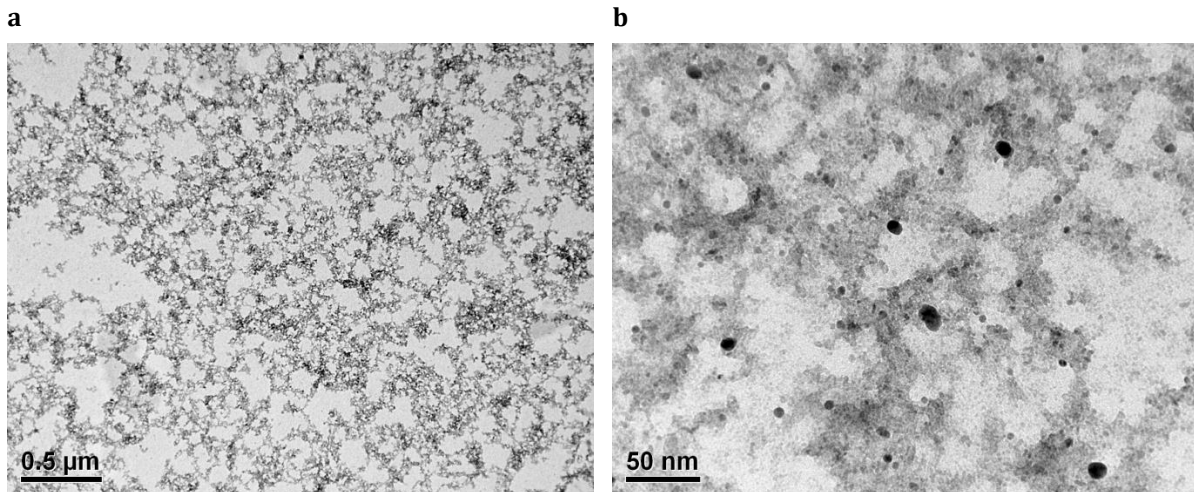


Abb. 8) TEM-Aufnahmen von $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$ bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$ Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme auf pioloformbefilmtem Single Slot Grid, (b) Detailaufnahme auf Kupfernetz mit Kohlefilm.

Polystyrol-Partikel

Die PS-n und PS-COOH waren relativ gleichmäßig über den Film verteilt (Abb. 9a, Abb. 10a). Sie lagen sowohl komplett isoliert als auch dicht beieinander vor. Die PS-NH₂ lagerten sich zu lockeren Gruppen zusammen, wobei diese von einzelnen Partikeln umgeben waren (Abb. 11a). Eine gleichförmige Verteilung wurde bei diesen Partikeln wie auch bei den PS-COOH-600 nicht erreicht (Abb. 12a). Die Mikropartikel bildeten kettenförmige Anordnungen oder traten als dreidimensionale Gebilde auf. Bei höheren Vergrößerungen zeigte sich, dass alle vier Typen eine sehr glatte Oberfläche und einen gleichmäßig runden Umriss aufwiesen (Abb. 9b, Abb. 10b, Abb. 11b, Abb. 12b). Bei den nanoskaligen Materialien unterschieden sich die Einzelpartikel in ihrer Größe teilweise deutlich voneinander, während die Mikropartikel einen sehr einheitlichen Durchmesser aufwiesen. Die Elektronendichte der PS-Partikel wurde im TEM als gleichmäßig grau dargestellt, wobei größere Partikel dunkler wirkten. Zu den Rändern hin verringerte sich die Elektronendichte und die Färbung der einzelnen Nanoobjekte wurde etwas heller.

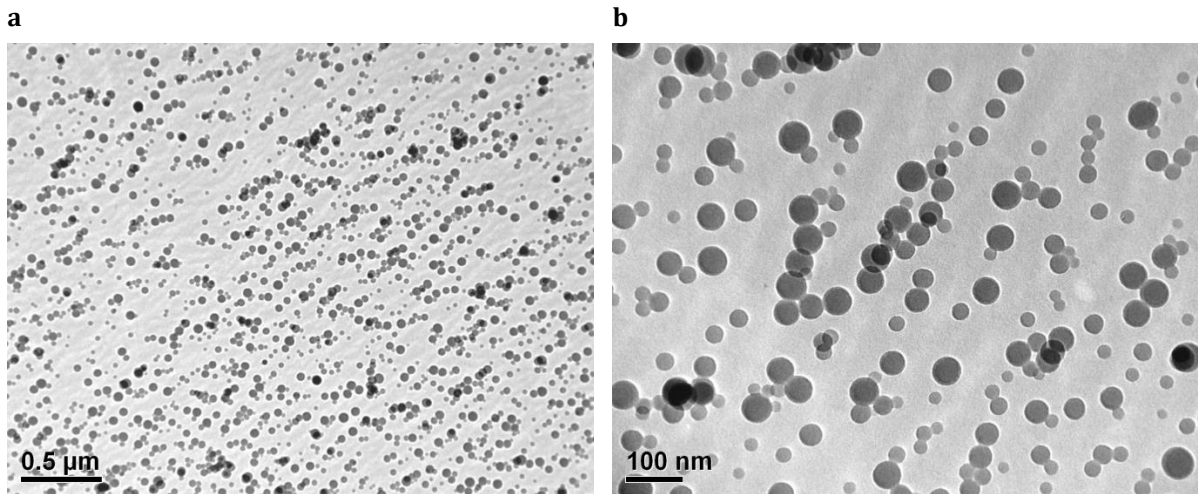


Abb. 9) TEM-Aufnahmen von PS-n bei einer Konzentration von 10 µg PS/mL Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

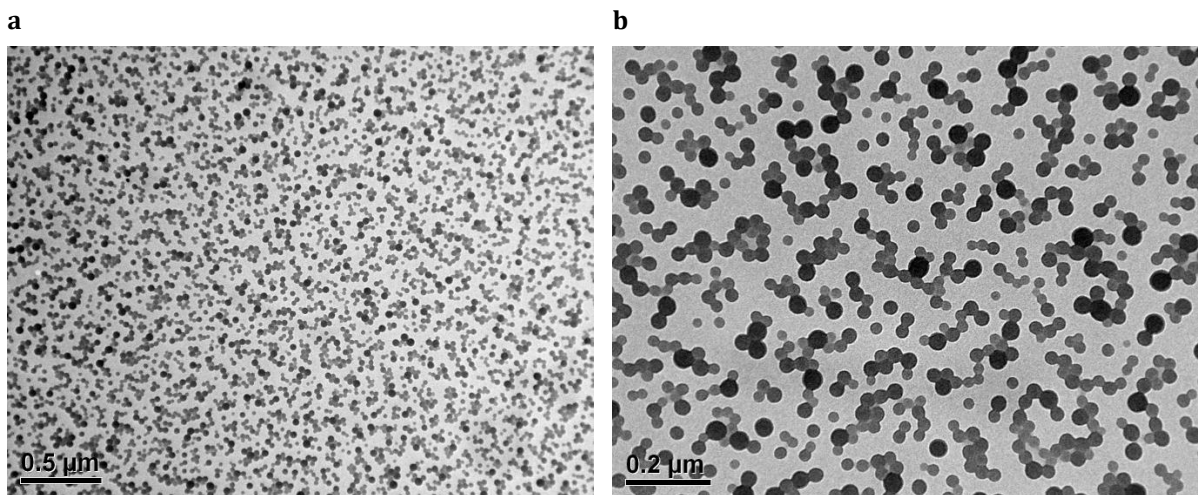


Abb. 10) TEM-Aufnahmen von PS-COOH bei einer Konzentration von 10 µg PS/mL Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

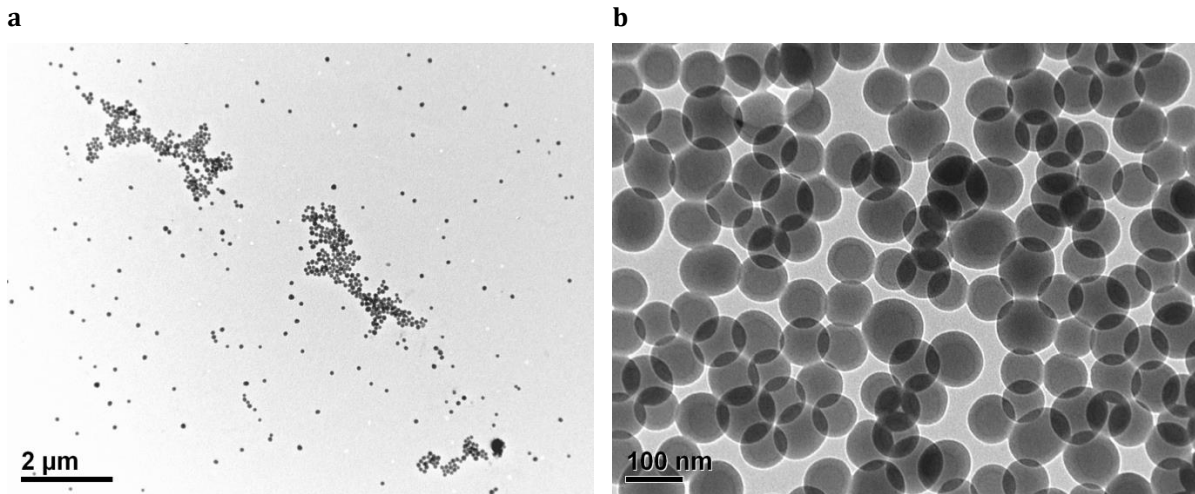


Abb. 11) TEM-Aufnahmen von PS-NH₂ bei einer Konzentration von 10 µg PS/mL Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

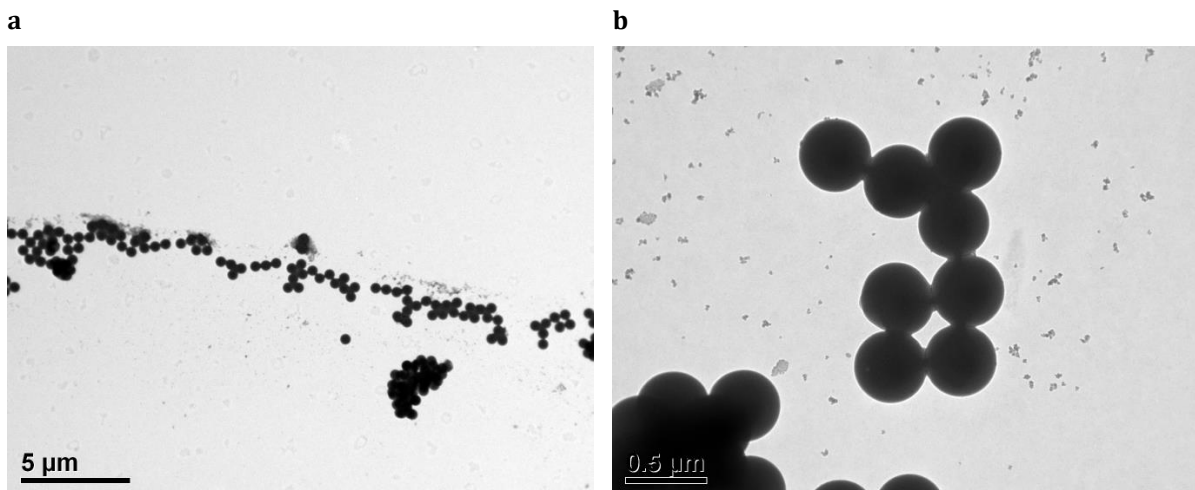


Abb. 12) TEM-Aufnahmen von PS-COOH-600 bei einer Konzentration von 10 µg PS/mL Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

Kohlenstoff-Nanofasern

Alle drei untersuchten Nanofasertypen bildeten Zusammenlagerungen. Während die CNT-n und CNT-NH₂ in dichten Knäuel vorlagen, an deren Rändern einzelne Nanofasern sichtbar wurden (Abb. 13a, Abb. 15a), waren die CNT-COOH etwas homogener mit mehr Abstand zwischen den Einzelfasern verteilt (Abb. 14a). Die Nahaufnahmen zeigten Nanoobjekte von sehr variabler Dicke und Länge, wobei die Faserlänge ein Vielfaches des Durchmessers betrug (Abb. 13b, Abb. 14b, Abb. 15b). Die äußeren Ränder der einzelnen Fasern hoben sich dunkel vom Inneren ab. Der Durchmesser der Fasern war sehr variabel.

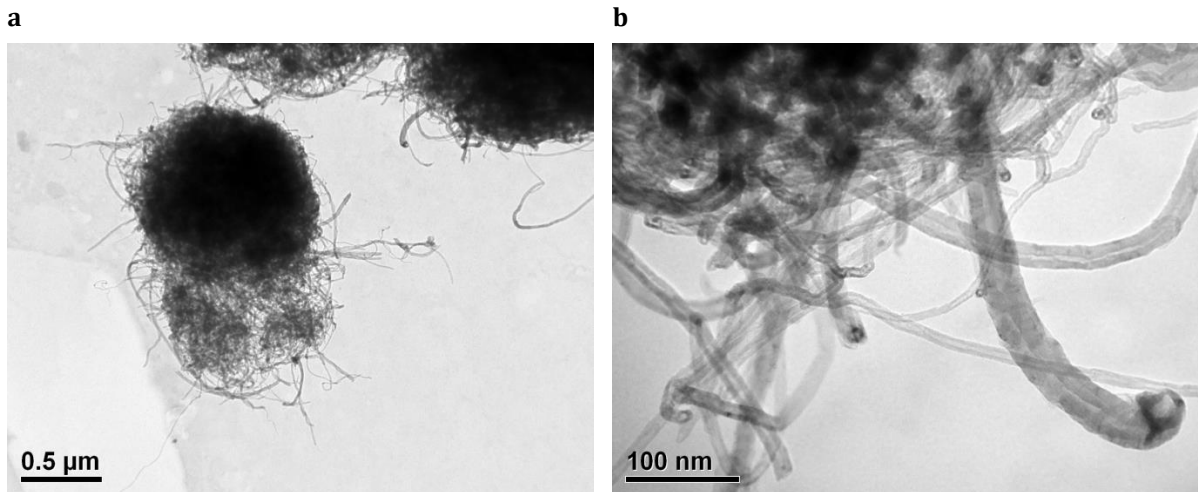


Abb. 13) TEM-Aufnahmen von CNT-n unbekannter Konzentration in Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

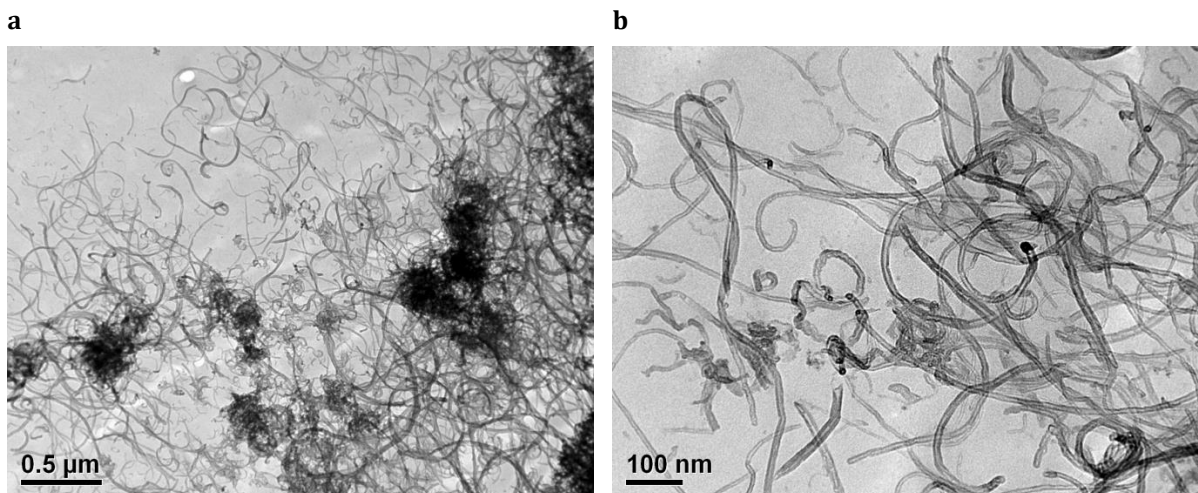


Abb. 14) TEM-Aufnahmen von CNT-COOH unbekannter Konzentration in Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

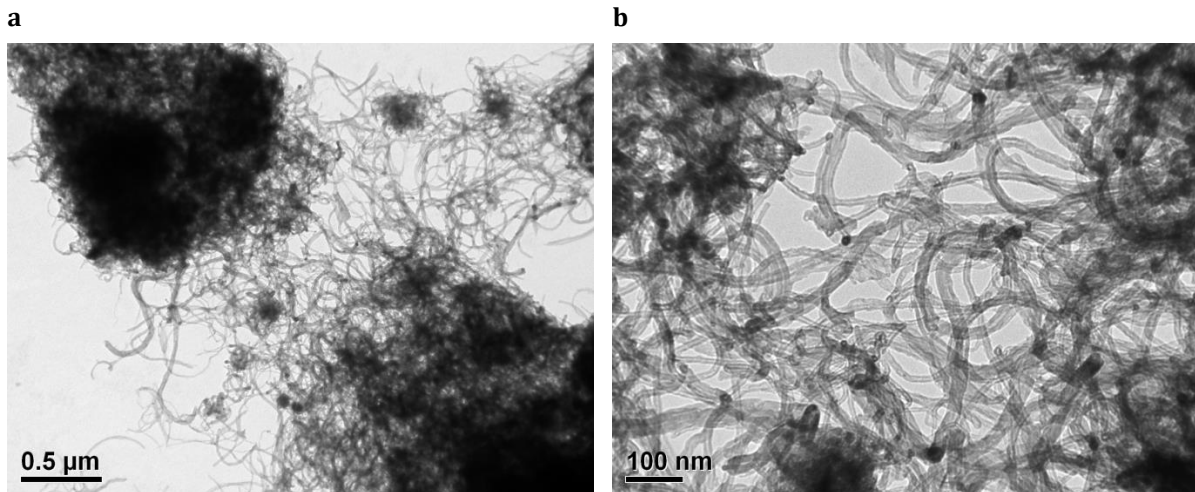


Abb. 15) TEM-Aufnahmen von CNT-NH₂ unbekannter Konzentration in Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

4.1.3 Materialstabilität gegenüber Chemikalien

Die Kontrollpartikel, welche lediglich mit Wasser behandelt wurden, wiesen eine runde Form und eine glatte Oberfläche auf (Abb. 16a). Sie lagerten sich locker zusammen, waren jedoch anhand ihrer Umrisse gut voneinander abgrenzbar. Die Partikel aus der Ethanolbehandlung ähnelten denen der Kontrolle (Abb. 16b). Die PS-Partikel, welche in Kontakt mit Aceton und Propylenoxid gekommen waren, ballten sich deutlich dichter zusammen (Abb. 16c, d). Sie waren teilweise nicht voneinander abgrenzbar und erschienen als miteinander verschmolzen. Die Form der Nanoobjekte war unregelmäßiger und sie waren zum Teil verformt. Hinsichtlich der ungefähren Anzahl der auftretenden Partikel war kein Unterschied zur Kontrollbehandlung erkennbar.

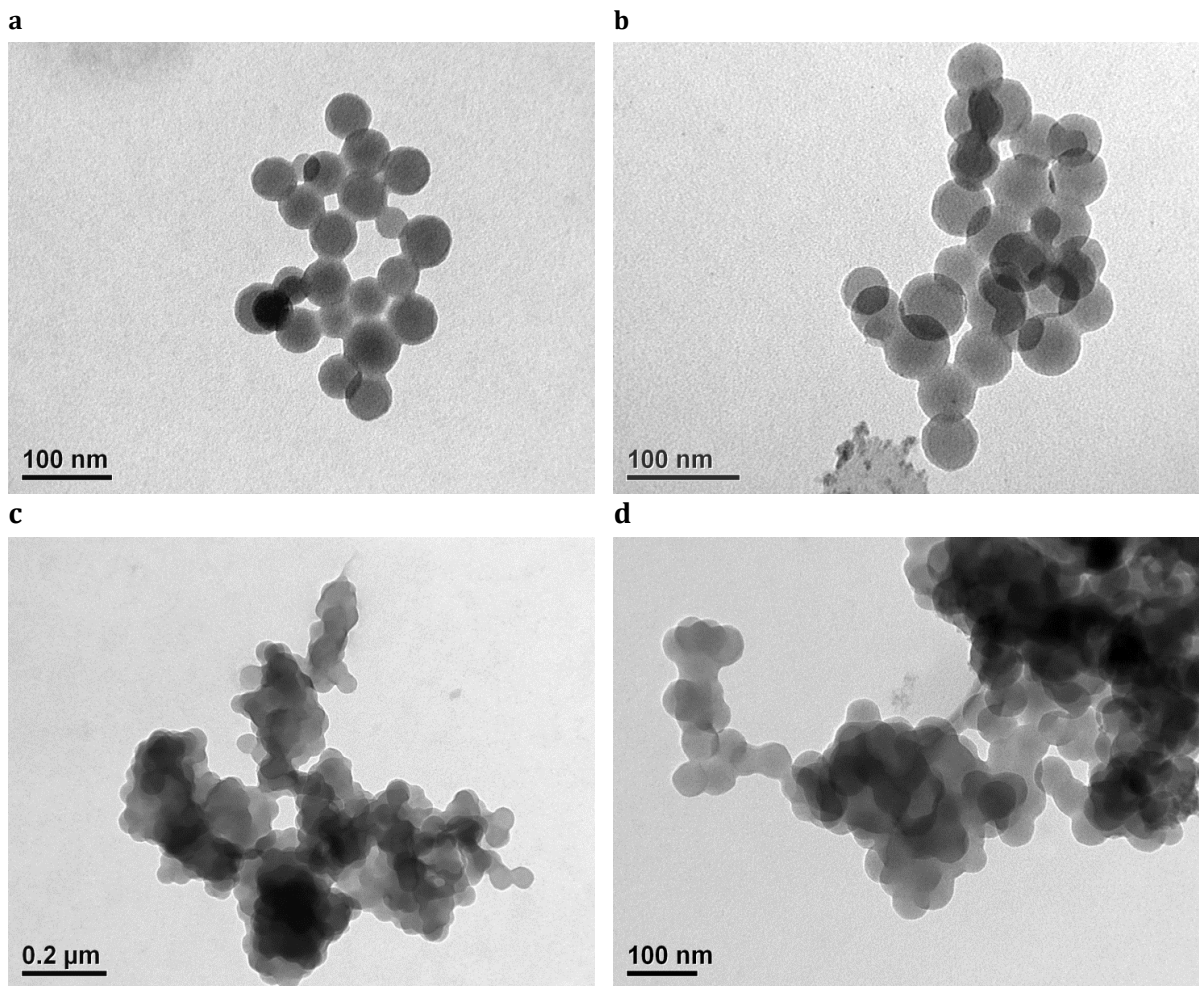


Abb. 16) TEM-Aufnahmen von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PS in Reinstwasser. (a) Nach 30 min in Wasser (NK), (b) nach 30 min in Ethanol, (c) nach 30 min in Aceton, (d) nach 30 min in Propylenoxid.

4.2 Synthetische Partikel in umweltrelevanten Matrices

4.2.1 Umweltkompartimente

Boden

Bei der Untersuchung des ungespikten Lehmbodens waren unterschiedlich große Bodenpartikel erkennbar (Abb. 17a). Höhere Vergrößerungen offenbarten unregelmäßig geformte Plättchen, die teilweise übereinander lagen (Abb. 17b). In der untersuchten Probe wurden keine Strukturen gefunden, welche den zuvor beschriebenen synthetischen Nanomaterialien ähnelten.

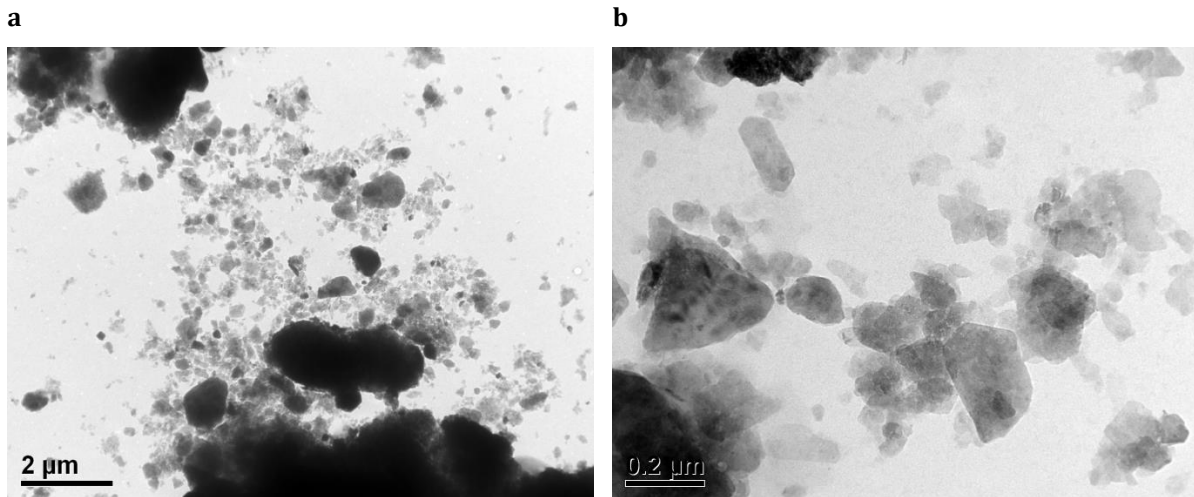


Abb. 17) TEM-Aufnahmen von 5 mg/mL Lehm Boden in Reinstwasser. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme.

Im gespikten Lehm Boden waren bei einer Konzentration von 100 µg Ag/g Boden einzelne Ag-COOH anhand ihrer Größe und Form erkennbar (Abb. 18a). Das Auffinden der Partikel in der Probenmatrix erwies sich allerdings als diffizil und zeitaufwändig. Bei einer Konzentration von 10 µg/g Boden waren NP nur unter großem zeitlichem Aufwand vereinzelt nachweisbar (Abb. 18b). Ab einer Konzentration von 1 µg/g waren mittels TEM keine Nanomaterialien mehr in den Proben detektierbar.

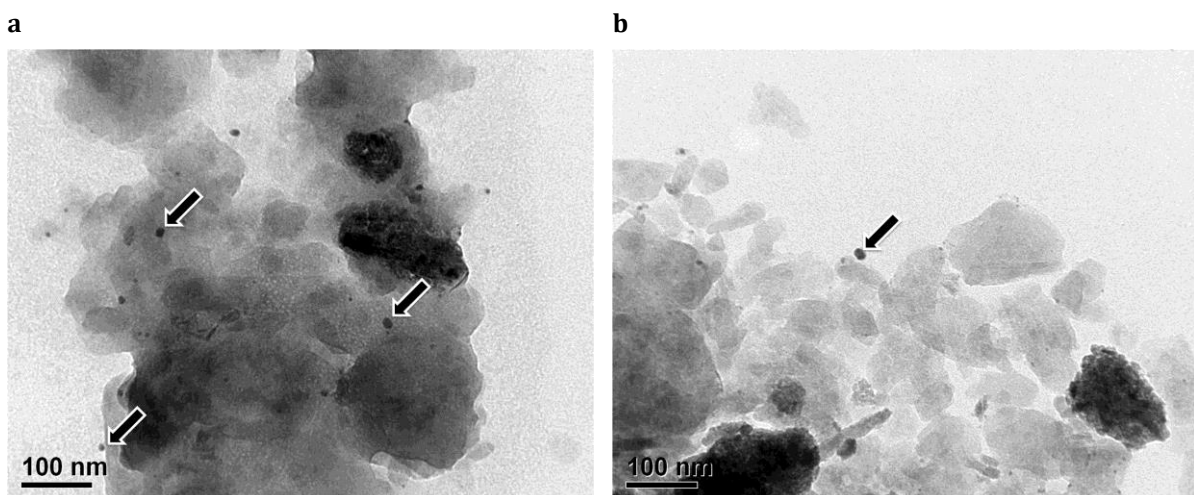


Abb. 18) TEM-Aufnahmen von Ag-COOH in Lehm Boden. Die Nanopartikel sind beispielhaft durch Pfeile markiert. (a) 100 µg Ag/g Boden, (b) 10 µg Ag/g Boden.

Fließgewässer

Verglichen mit den Bodenproben erfolgte die Überprüfung der Wasserproben auf synthetische Nanomaterialien deutlich schneller, da die Matrix weniger festes Material enthielt und somit

übersichtlicher war. (Abb. 19a, b). In keiner der analysierten Proben konnten synthetische Nanomaterialien identifiziert werden.

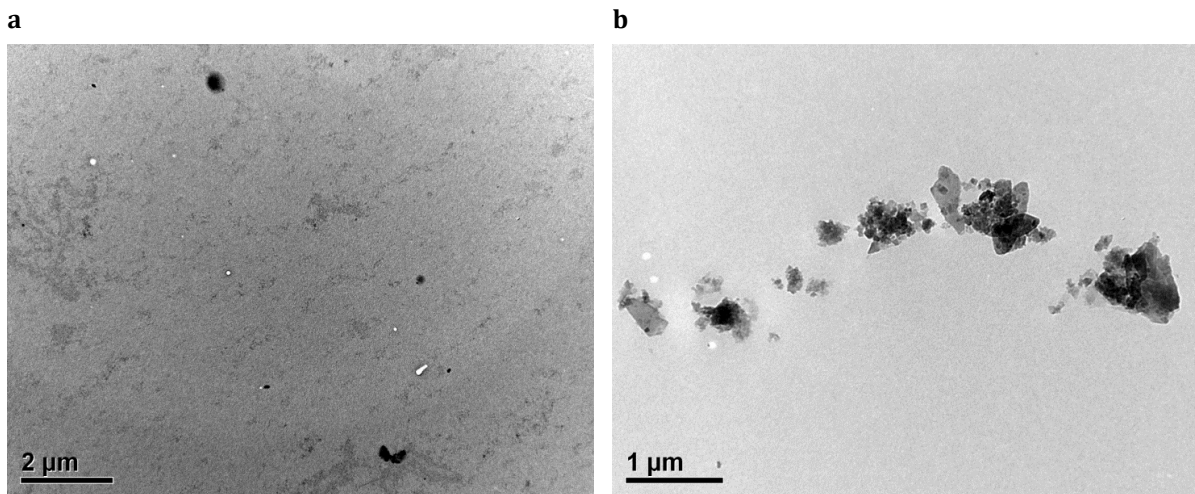


Abb. 19) (a), (b) TEM-Aufnahmen von fünffach angereichertem Wasser aus dem Rhein bei Worms.

Alle drei Typen von Ag-NP, mit denen die Rheinwasserproben versetzt wurden, bildeten Zusammenlagerungen. Die Ag-n traten in großen Gruppen auf, in denen die Partikel eng beieinander lagen (Abb. 20a). Bei den Ag-COOH und Ag-NH₂ neigten die Partikel zur Bildung von Ketten, sodass immer wieder freie Bereiche innerhalb der Gruppierungen auftraten (Abb. 20b, c). Zwischen den Ag-NH₂ waren Feststoffpartikel aus dem Fließgewässer zu erkennen.

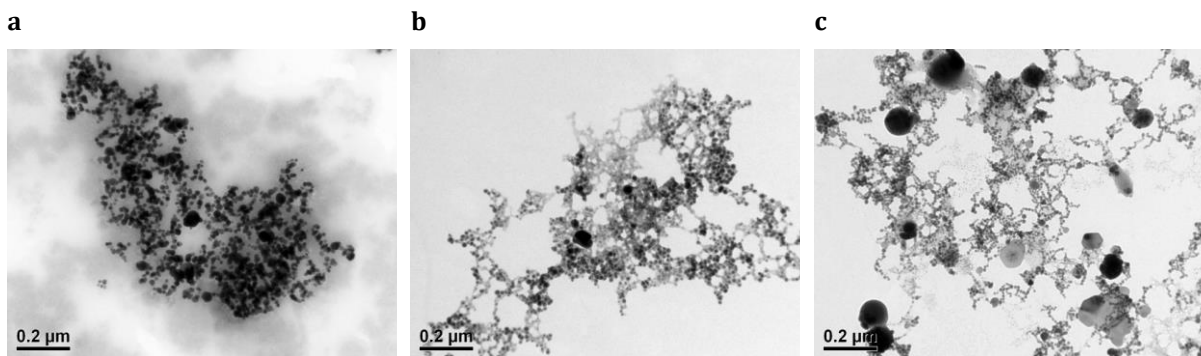


Abb. 20) TEM-Aufnahmen von 10 µg/mL Ag-NP in Rheinwasser. (a) Ag-n, (b) Ag-COOH, (c) Ag-NH₂.

Die Aufnahmen der TiO₂-NP im Rheinwasser zeigten umfangreiche Zusammenlagerungen der Nanoobjekte. Die TiO₂-n bildeten fragile, verästelte Strukturen (Abb. 21a), während die Zusammenschlüsse der TiO₂-COOH und TiO₂-NH₂ dichter und flächiger wirkten (Abb. 21b, c).

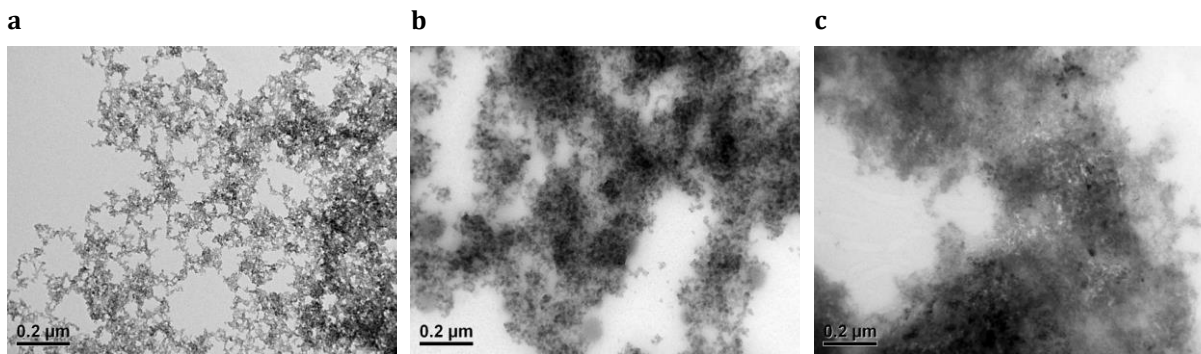


Abb. 21) TEM-Aufnahmen von 10 µg/mL TiO₂-NP in Rheinwasser. (a) TiO₂-n, (b) TiO₂-COOH, (c) TiO₂-NH₂.

Die PS-NP waren in der untersuchten Rheinwasserprobe vergleichsweise gleichmäßig auf dem Grid verteilt (Abb. 22a). Sie lagen einzeln oder in kleinen Gruppen agglomeriert vor. Die PS-COOH, PS-NH₂ und PS-COOH-600 (Abb. 22b, c, d) bildeten dreidimensionale Zusammenlagerungen.

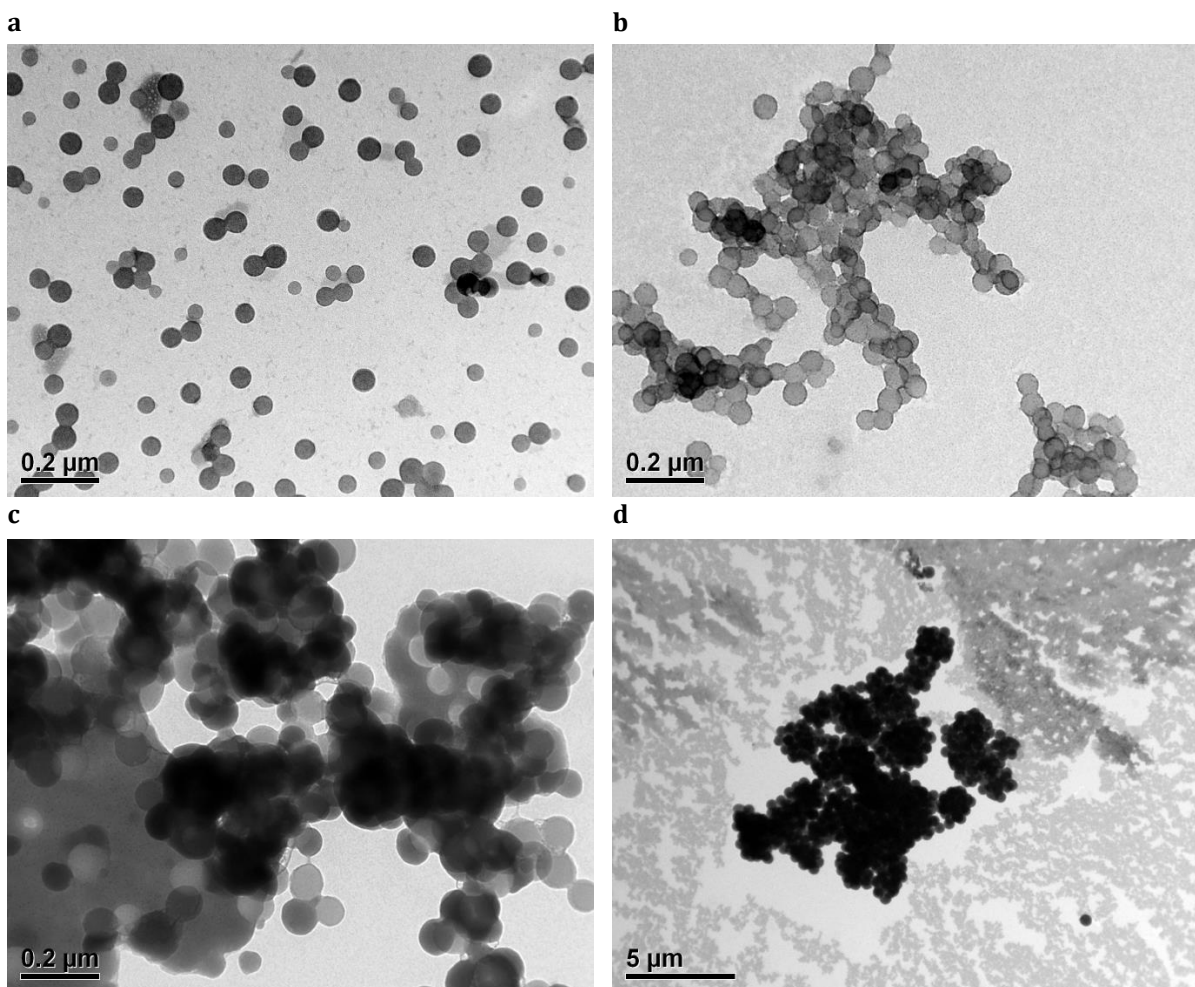


Abb. 22) TEM-Aufnahmen von 10 µg/mL PS-NP in Rheinwasser. (a) PS-n, (b) PS-COOH, (c) PS-NH₂, (d) PS-COOH-600.

4.2.2 Proben von Organismen

Humane Blut- und Urinproben

Blut und Urin mussten auf 1 % verdünnt werden, damit der Elektronenstrahl des TEM die Proben passieren konnte. In der Blutprobe waren neben dunkel gefärbtem, organischem Material runde Zellen erkennbar, bei denen es sich um Erythrozyten handelte (Abb. 23a). Die Urinprobe wies kristalline Strukturen auf (Abb. 23b). In keiner der Proben konnten synthetische Nanomaterialien nachgewiesen werden.

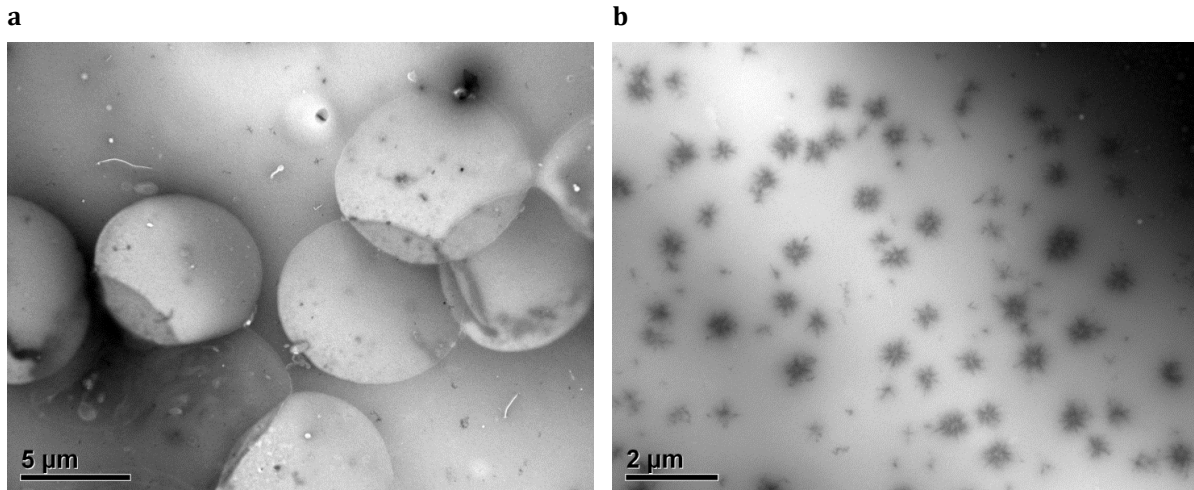


Abb. 23) TEM-Aufnahme von mit Reinstwasser auf 1 % verdünntem humanem Blut (a) und Urin (b).

Fischgewebe und -blut

In den verschiedenen Fischgeweben waren mittels TEM keine Hinweise auf synthetischen Nanomaterialien erkennbar. Abbildungen der einzelnen Gewebe bzw. des Bluts sind im Anhang (Abb. 76) aufgeführt.

Im homogenisierten Muskelgewebe, welches bei der Probenvorbereitung mit Nanomaterialien versetzt wurde, waren die Ag-n deutlich erkennbar (Abb. 24a). Sie lagerten sich zu lockeren Ansammlungen zusammen, lagen jedoch auch einzeln vor. Auf dem Pioloformfilm stellten sich die Bestandteile des Muskelgewebes als gräuliche Schicht dar (Abb. 24a, b). Die Partikel hoben sich durch ihre etwas dunklere Färbung vom Hintergrund ab.

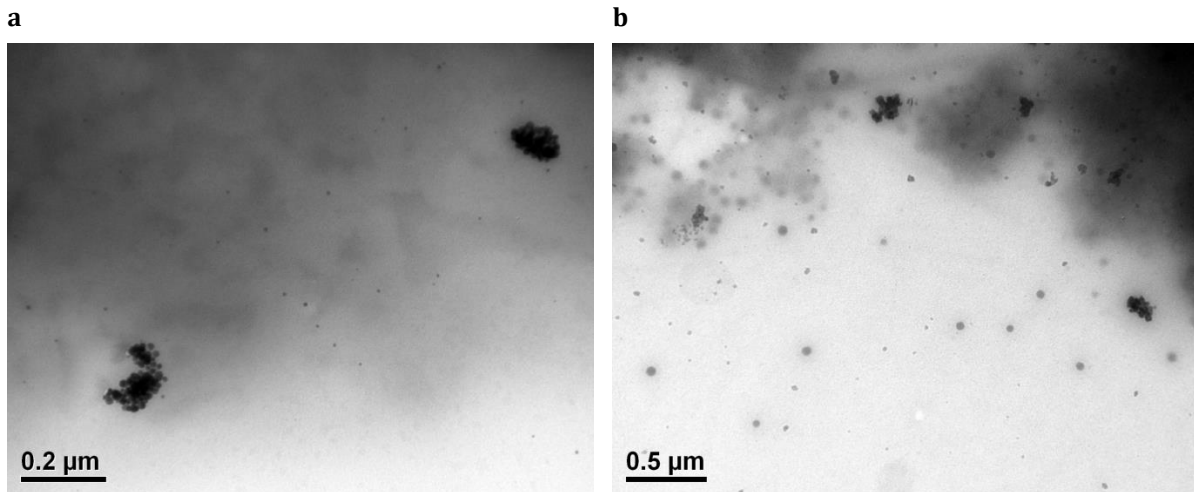


Abb. 24) TEM-Aufnahmen von mit 50 $\mu\text{g NP/mL}$ Gewebe versetztem, homogenisiertem Fischmuskel. (a) Ag-n, (b) PS-n.

4.3 Untersuchung von Zellkulturen und Gewebe

4.3.1 Darmbarriere

Mittels TEM konnten weder in den kultivierten Darmzellen noch im Ex-vivo-Modell Nanomaterialien nachgewiesen oder Änderungen der Zellstruktur beobachtet werden. TEM-Aufnahmen der Zellen der Negativkontrolle (NK) sind im Anhang (Abb. 77) abgebildet.

4.3.2 Stammzellen

Anhand der Untersuchung der Stammzellen mittels TEM konnten keine morphologischen Veränderungen der Zellen festgestellt oder Nanomaterialien in den Zellen identifiziert werden. Eine Abbildung von untersuchten Zellen der NK ist im Anhang (Abb. 78) dargestellt.

4.3.3 Sphäroide

Die Schnitte der Zellen der NK zeigten dunkel gefärbte Falten und Risse (Abb. 25a). Die einzelnen Zellen waren dennoch deutlich zu erkennen und enthielten viele unterschiedlich große Lipidvakuolen. Bei näherer Betrachtung waren zudem der Zellkern und Teile des Endoplasmatischen Retikulums identifizierbar (Abb. 25b).

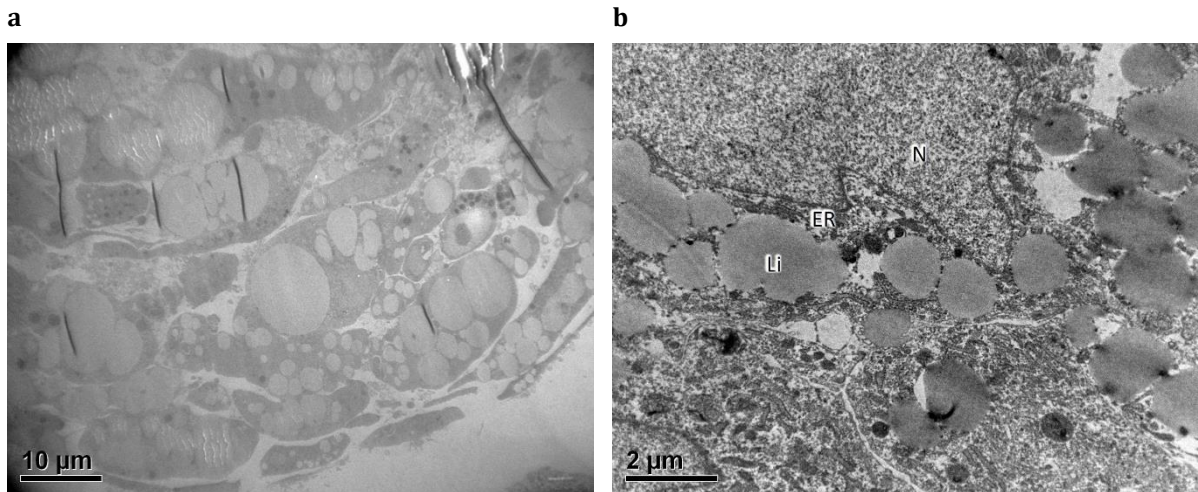


Abb. 25) TEM-Aufnahme von Sphäroidzellen der Negativkontrolle. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Detailaufnahme. Beschriftung: ER = Endoplasmatisches Retikulum, Li = Lipidvakuole, N = Zellkern.

Die Zellen, welche gegenüber Ag-COOH exponiert worden waren, zeigten optisch keine Unterschiede zur NK (Abb. 26a). Es waren keine nanopartikelähnlichen Strukturen zu erkennen. Zellorganellen wie Vakuolen, Vesikel und Zellkern waren gut sichtbar. In der Behandlungsgruppe, welche gegenüber den PS-COOH-600 kultiviert worden war, zeigten die Zellen bezüglich ihrer Organellen keine Auffälligkeiten. Es traten jedoch Strukturen auf, welche in Größe und Form mit den Mikropartikeln vergleichbar waren (Abb. 26b). Sie waren sehr regelmäßig geformt und klar von der Umgebung abgrenzbar. Durch ihre helle Färbung hoben sie sich deutlich vom Hintergrund ab. In den gegenüber PS-COOH exponierten Zellen waren Vesikel erkennbar, welche nanopartikelähnliche Strukturen enthielten (Abb. 26c). Bei Vergrößerung der nanopartikelähnlichen Strukturen waren helle, runde Objekte in den dunkler gefärbten Vesikeln erkennbar, welche klar und gleichmäßig vom Hintergrund abgegrenzt waren (Abb. 26d). Ihre Größe entsprach jener der PS-COOH. Abgesehen davon zeigten die Zellen keine visuellen Unterschiede zur NK.

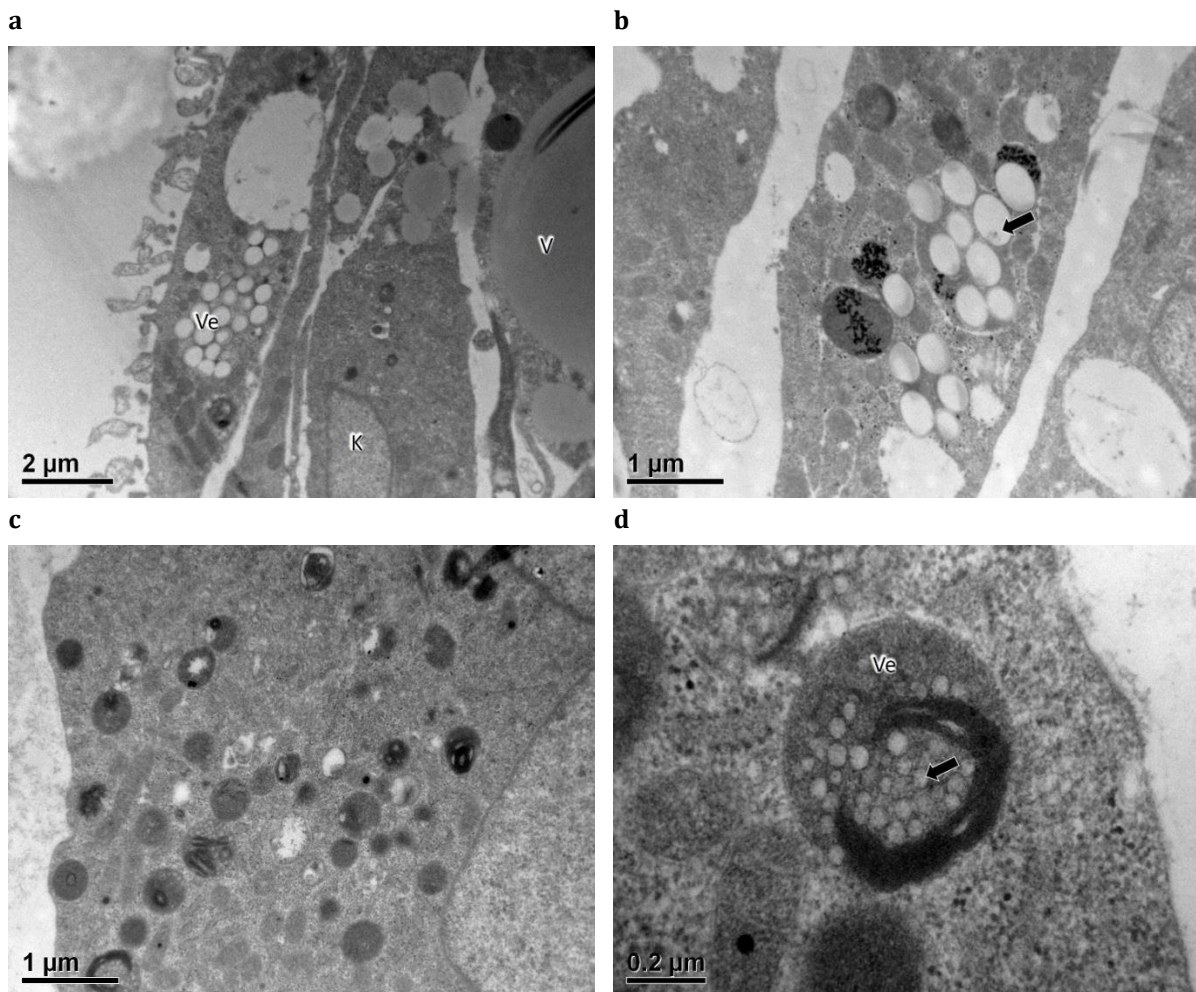


Abb. 26) TEM-Aufnahme von Sphäroidzellen, welche mit Nanomaterialien einer Konzentration von 1 µg/mL kultiviert wurden. (a) Ag-COOH, (b) PS-COOH-600, (c) Übersichtsaufnahme PS-COOH, (d) Detailaufnahme PS-COOH. Beschriftung: K = Kern, V = Vakuole, Ve = Vesikel. Strukturen, die synthetischen Mikro- oder Nanopartikeln ähneln, sind beispielhaft durch Pfeile markiert.

4.3.4 Plazentabarriere

Die TEM-Aufnahmen der NK zeigten die mehrschichtig wachsenden BeWo-Zellen (Abb. 27a) und die einschichtigen HPE-Zellen (Abb. 27b). Es waren einige größere Vesikel in den BeWo-Zellen zu erkennen (Abb. 27c).

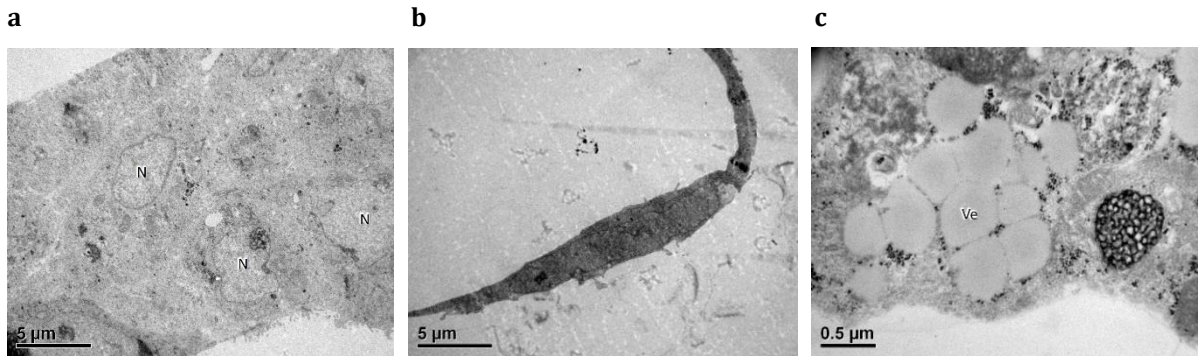


Abb. 27) TEM-Aufnahmen von Plazentazellen der Negativkontrolle. (a) Übersichtsaufnahme BeWo-Zellen, (b) Übersichtsaufnahme HPE-Zellen, (c) Nahaufnahme BeWo-Zellen. Beschriftung: N = Zellkern, Ve = Vesikel.

Die Zellen, welche gegenüber 5 µg/mL Ag-COOH und Ag-NH₂ sowie 10 µg/mL PS-COOH exponiert worden waren, zeigten keine zellulären Veränderungen im Vergleich zur NK. Des Weiteren waren keine NP in den Proben erkennbar. Die Behandlungsgruppe, welche mit PS-NH₂ kultiviert worden war, ließ vereinzelt auftretende Vesikel erkennen, welche nanopartikelähnliche Strukturen enthielten (Abb. 28a). Sie waren heller als der Hintergrund und relativ gleichmäßig und rund geformt (Abb. 28b). Bei einer Konzentration von 100 µg/mL der PS-COOH, traten in den Zellen Zusammenlagerungen von potenziellen NP auf (Abb. 28c). Diese waren durch Membranen von der umgebenden Zelle abgegrenzt (Abb. 28d). Die Zellen, welche den Mikropartikeln ausgesetzt worden waren, enthielten Strukturen, die bezüglich Größe und Form Ähnlichkeit mit den PS-COOH-600 hatten (Abb. 28e). Sie erscheinen im Vergleich zur umgebenden Zelle deutlich heller. Die Nahaufnahme zeigte, dass einige der potenziellen Partikel rund geformt waren, während andere unregelmäßig waren und leichte Ecken aufwiesen (Abb. 28f).

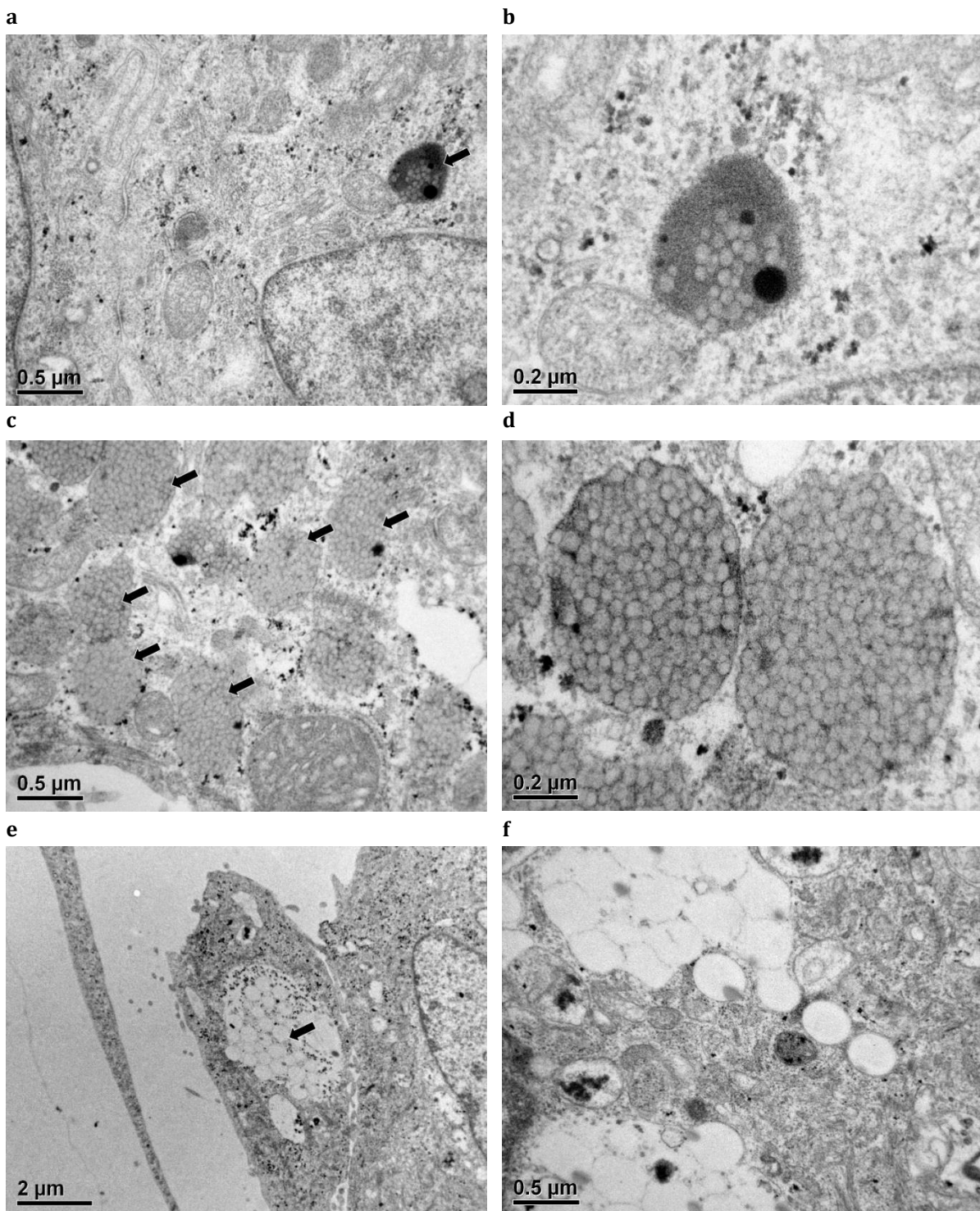


Abb. 28) TEM-Aufnahmen von BeWo-Zellen, welche mit Nanomaterialien kultiviert wurden. (a) Übersichtsaufnahme 10 µg/mL PS-NH₂, (b) Detailaufnahme 10 µg/mL PS-NH₂, (c) Übersichtsaufnahme 100 µg/mL PS-COOH, (d) Detailaufnahme 100 µg/mL PS-COOH, (e) Übersichtsaufnahme 100 µg/mL PS-COOH-600, (f) Detailaufnahme 100 µg/mL PS-COOH-600. Strukturen, die synthetischen Mikro- oder Nanopartikeln ähneln, sind beispielhaft durch Pfeile markiert.

5 Diskussion (Teil I)

5.1 Materialcharakterisierung und –vorbereitung

5.1.1 Charakterisierung von Nanomaterialien

Silber-Nanopartikel

Die Synthese von NP einer definierten Größe scheint im Fall von Ag gut zu funktionieren. Die Größenmessungen mittels TEM weisen lediglich geringe Abweichungen von den angegebenen Werten der Hersteller auf (vgl. Tab. 2). Die Synthese von Nanosilber wurde in den letzten zwei Jahrzehnten umfangreich untersucht (KHODASHENAS & GHORBANI, 2015). Es ist daher davon auszugehen, dass die Hersteller auf eine breite Datenbasis und viel praktische Erfahrung zurückgreifen können. Die relative SD der Größenmessung von über 30 % zeigt jedoch, dass die Größenverteilung der Partikel dennoch relativ breit ist. Da dies bei den untersuchten Proben von beiden Herstellern zu beobachten ist, scheint es sich nicht um eine Ausnahmeerscheinung zu handeln, sondern standardmäßig vorzukommen.

Die beiden modifizierten Partikeltypen neigen dazu, sich zu Komplexen zusammenzulagern. Da bei den neutralen Partikeln eine relativ gleichmäßige Verteilung auftritt, scheinen die funktionellen Gruppen und die damit entstehende Oberflächenladung dieses Verhalten in Wasser zu erzeugen. Zwischen den Ag-COOH wurden graue, diffuse Schlieren entdeckt, die möglicherweise auf Rückstände des Modifikationsprozesses zurückgeführt werden können. Ähnliche Schlieren treten auch bei den TiO₂-COOH auf, welche ebenfalls mit einer Carboxylgruppe funktionalisiert wurden. Allerdings ist in diesem Fall die Unterscheidung zwischen Verunreinigung und Partikelschlieren schwierig, da die untersuchten Objekte sehr klein sind.

Titandioxid-Nanopartikel

Die Untersuchung der titandioxidbasierten Nanomaterialien gestaltete sich mittels TEM schwierig. Auf Pioloformfilmen ließen sie sich bei hohen Vergrößerungen nicht scharf darstellen. Etwas bessere Ergebnisse konnten durch die Verwendung eines Kohlefilms erzielt werden. Entsprechende Filme sind herstellungsbedingt etwas dünner und erlauben somit eine bessere Darstellung, da die Streuung der Elektronen reduziert wird. Während für die TiO₂-n eine Größenmessung auf Grund der Bildqualität vertretbar war, konnte für die beiden modifizierten Partikel keine ausreichende Auflösung der TEM-Aufnahmen erreicht werden. Eventuell sind Rückstände aus den Modifikationsprozessen verantwortlich für die geringere Bildqualität. Die zumindest näherungsweise abschätzbaren Größen legen jedoch nahe, dass die Partikel ähnlich groß wie die TiO₂-n sind. Dies wird dadurch unterstützt, dass die TiO₂-n die Ausgangspartikel für die Produktion der modifizierten Materialien waren. Im Vergleich mit den Größenangaben des

Herstellers sind deutliche Abweichungen erkennbar. Die Angaben des Herstellers beruhen auf der Größenmessung der Ausgangspartikel (TiO₂-n) mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS). Bei der DLS wird der hydrodynamische Radius eines Partikels anhand seiner Diffusionsgeschwindigkeit ermittelt. Es ist wahrscheinlich, dass der hydrodynamische Durchmesser der Partikel durch die Bildung einer Solvathülle größer ausfällt als der reale Durchmesser.

Grundsätzlich ist es möglich TiO₂-Nanomaterialien mittels TEM abzubilden (PHILIPPE et al., 2018; LI et al., 2005). Allerdings werden in anderen Untersuchungen in der Regel deutlich größere Partikel verwendet. Daher ist anzunehmen, dass das aufgetretene Darstellungsproblem tatsächlich auf der Größe der Partikel und nicht auf Eigenschaften des Materials beruht.

Polystyrol-Partikel

PS-NP werden seit über zehn Jahren hergestellt (HE & PAN, 2004). Die bei PlasmaChem produzierten Partikel wurden mittels DLS vermessen und aus den Werten der mittlere Durchmesser ermittelt. Die Größenmessung mittels TEM zeigt bei den unmodifizierten PS-n lediglich geringfügige Abweichungen. Durch die neutrale Partikeloberfläche finden vermutlich kaum elektrostatische Wechselwirkungen mit den Molekülen der umgebenden Flüssigkeit statt, sodass es zu keiner merklichen Veränderung des Diffusionsverhaltens der einzelnen Partikel kommt. Bei den beiden carboxylierten PS-Partikeln mit negativer Oberflächenladung ist der mittels TEM gemessene tatsächliche Durchmesser deutlich kleiner als der hydrodynamische Durchmesser. Durch die Oberflächenladung scheinen die Partikel eine große Solvathülle zu binden, welche sich gemeinsam mit den einzelnen Partikeln bewegt und dadurch ihre Diffusionsgeschwindigkeit reduziert, sodass der indirekt gemessene Durchmesser größer ist als der tatsächliche. Der Effekt ist bei den kleineren Partikeln stärker ausgeprägt, da wahrscheinlich die Solvathülle im Verhältnis größer als bei den Mikropartikeln ist. Die PS-NH₂ sind mittels TEM gemessen deutlich größer als bei einer Messung mittels DLS. Durch die positive Oberflächenladung werden vermutlich andere Lösemittelbestandteile als bei den negativ geladenen Partikeln gebunden oder die Partikel werden von geladenen Mediumsbestandteilen abgestoßen. In jedem Fall scheint die Diffusionsgeschwindigkeit deutlich höher als bei den neutralen und positiv geladenen Partikeln zu sein.

Die Größenverteilung der vier unterschiedlichen PS-Partikeltypen variiert trotz der grundsätzlich gleichen Herstellungsmethode. Eventuell ist der Partikeldurchmesser hierfür ein relevanter Faktor. Es ist auffällig, dass mit zunehmender Größe der Partikel die Größenschwankungen abnehmen. Während die Abweichung bei den PS-n, welche am kleinsten sind, noch über 36 % beträgt, liegt sie bei den etwas größeren PS-COOH nur noch bei 19 % und die mehr als doppelt so großen PS-NH₂ weisen eine SD von nur 13 % auf. Bei den Mikropartikeln beträgt die SD nur noch 4 %. Offensichtlich wird die Größe der Partikel umso einheitlicher, je größer sie sind. Dies scheint

plausibel, da kleine Abweichungen in der Größenabmessung bei kleineren Partikeln einen relativ gesehen größeren Einfluss haben, als bei großen Partikeln.

Die räumliche Verteilung der Einzelobjekte in einer wässrigen Suspension ist bei den PS-NH₂ und den PS-COOH-600 weniger gleichmäßig als bei den anderen PS-NP. Ein möglicher Grund hierfür kann die Oberflächenmodifikation sein. Da die Oberfläche der Mikropartikel jedoch die gleichen funktionellen Gruppen aufweist wie die PS-COOH, wird der Verteilungsunterschied zwischen der Mikro- und der Nanoform vermutlich zusätzlich durch andere Faktoren, wie z. B. die Partikelgröße, beeinflusst.

Kohlenstoff-Nanofasern

Die CNT lassen sich prinzipiell gut mit dem Elektronenmikroskop abbilden. Dies wird durch andere Studien bestätigt (WEPASNICK et al., 2010; LI et al., 2003). Eine Vermessung kompletter Nanoobjekte ist jedoch äußerst schwierig. Im Gegensatz zu den restlichen untersuchten Nanomaterialien im Projekt, bei denen es sich um Partikel handelt, müssen bei den Nanofasern mehrere Dimensionen vermessen werden, um sie adäquat beschreiben zu können. Da die Fasern jedoch oft miteinander zu dichten Knäuel verworren vorliegen und einzelne Fasern somit nur selten abgrenzbar sind, ist eine Vermessung mit einem sehr großen Zeitaufwand verbunden. Dass die Fasern sehr stark zu Aggregation neigen, wird auch von JIANG et al. (2003) bestätigt. Die Zusammenlagerungen entstehen durch Van-der-Waals-Kräfte. Durch die Zugabe von Chemikalien wie z. B. Natriumlaurylsulfat (SDS; engl.: *Sodium dodecyl sulfate*) lassen sich stabile wässrige kolloidale Dispersionen erzeugen (JIANG et al., 2003). Im Projekt war eine Zugabe von SDS nicht gewünscht, um eine Beeinflussung der biologischen Testsysteme dadurch zu vermeiden. Die Erzeugung einer gleichmäßigen Suspension war somit nicht möglich. Eine Durchführung von Biotests ohne die Angabe einer genauen Nanofaserkonzentration hätte keine aussagekräftigen Resultate hervorgebracht, daher wurden die Fasern im Projekt nicht weiter untersucht. Auch von einer weiteren Charakterisierung dieser Materialien wurde abgesehen. Die Größenmessung der untersuchten CNT mittels TEM ist unter den oben beschriebenen Bedingungen als nicht praktikabel einzustufen. In anderen Studien wird das TEM durchaus erfolgreich zur Größenmessung von CNT genutzt (WANG et al., 2018; KRAUSE et al., 2010), was bedeutet, dass die Methode unter Zuhilfenahme bestimmter Chemikalien durchaus geeignet sein kann.

Transmissionselektronenmikroskopie als Charakterisierungsmethode

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Charakterisierung von Nanomaterialien zusätzlich zu den Herstellerangaben notwendig ist. Insbesondere die Größenmessungen können je nach Messmethode voneinander abweichen. Mittels TEM können grundsätzlich verschiedene Nanomaterialien mit geringem Arbeitsaufwand dargestellt und

charakterisiert werden. Für sehr kleine Partikel, wie sie im Fall der TiO₂-Materialien vorliegen, eignet sich jedoch das für diese Untersuchungen zur Verfügung stehende TEM aufgrund der begrenzten Auflösung nicht. Auch bei der Analyse der CNT scheint das TEM bedingt durch die Probenstruktur keine effiziente Methode zu sein. In diesen Fällen sollte auf andere Messverfahren zurückgegriffen werden. Generell sollte das TEM nicht die einzige Methode zur Charakterisierung eines Nanomaterials sein, da hierbei nur die tatsächliche Größe der Partikel ermittelt werden kann. Weitere Parameter wie z. B. der hydrodynamische Durchmesser und die Oberflächenladung sollten ebenfalls untersucht werden, um Materialien miteinander vergleichen zu können. In anderen Studien werden zur Untersuchung von Nanomaterialien unter anderem DLS und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) sowie Infrarot-, Röntgenphotoelektronen-, Raman- und UV/VIS-Spektroskopie verwendet (LABORDA et al., 2016; LAMBERT & WAGNER, 2016; WEPASNICK et al., 2010; CHITHRANI et al., 2006). Abgesehen von einfachen Größenmessungen ermöglicht das TEM auch die Untersuchung des Partikelverhaltens in einer Probe. So zeigen die Aufnahmen, dass Partikel aus dem gleichen Ausgangsmaterial mit unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen sich bezüglich ihrer Agglomerationsneigung deutlich voneinander unterscheiden können.

Bei der Bewertung der Transmissionselektronenmikroskopie als Untersuchungsmethode für Nanomaterialien muss berücksichtigt werden, dass verschiedene Geräte sich hinsichtlich ihrer Funktionen deutlich voneinander unterscheiden können. Während das verwendete Gerät bezüglich seiner Auflösung bei den TiO₂-NP an seine Grenzen kam, können moderne TEM Auflösungen von weniger als 0,1 nm erreichen (WEN & MA, 2018; SAWADA et al., 2015) und somit ggf. eine bessere Charakterisierung ermöglichen.

5.1.2 Materialstabilität gegenüber Chemikalien

Die eingesetzten Lösemittel haben unterschiedliche Effekte auf die PS-Partikel. Der Kontakt mit Ethanol scheint die Form und das Verhalten der PS-n nicht merklich zu beeinflussen. Das zur Entwässerung eingesetzte Solvens kann somit höchstwahrscheinlich problemlos für diesen Partikeltyp eingesetzt werden. Die beiden Chemikalien Aceton und Propylenoxid haben optisch erkennbare Auswirkungen auf die NP, unterscheiden sich jedoch nicht in der Stärke des beobachteten Effekts, sodass keine Empfehlung für eine der Substanzen ausgesprochen werden kann. Beide Chemikalien scheinen die Partikeloberfläche anzulösen und so zu einer festeren Verschmelzung der Partikel zu führen, sobald diese wieder in Wasser überführt wurden. Da die Sekundärpartikel auch durch eine Ultraschallbehandlung nicht mehr in einzelne Nanoobjekte getrennt werden können, ist zu vermuten, dass es sich um fest verbundene Aggregate handelt.

Anhand des durchgeführten Versuchs konnte gezeigt werden, dass die vorhandenen Partikel nicht durch die verwendeten Chemikalien aufgelöst werden. Sie sollten somit auch nach der Einbettung

der Zellen mittels TEM nachweisbar sein. Da die NP sich im Fall einer Einbettung in Zellen und nicht in einer Suspension befinden, wie im durchgeführten Versuch, sind geringere Auswirkungen durch die reduzierte Bewegungsfreiheit und damit Exposition zu erwarten. Auch der Zusammenschluss zu Aggregaten ist dadurch unwahrscheinlicher. Eventuelle Formveränderungen der NP sind denkbar, sollten jedoch aufgrund der ermittelten Ergebnisse als solche erkannt werden, sodass eine Identifizierung der Nanoobjekte weiterhin möglich sein sollte. Generell konnte bereits gezeigt werden, dass PS-NP in eingebetteten Zellen mittels TEM nachgewiesen werden können (PANYAM et al., 2003).

5.1.3 Fazit

Das TEM ist zur Charakterisierung von Nanomaterialien einer gewissen Größe grundsätzlich gut geeignet. Bis in den unteren Nanometerbereich lassen sich Partikel verschiedener Materialien und Fasern deutlich abbilden und es können Rückschlüsse auf Größe, Verteilung und Verhalten der Nanoobjekte gezogen werden. Die Vorbereitung der Materialien für das TEM ist unkompliziert und wenig zeitaufwändig, da die verdünnten Stammsuspensionen einfach auf Grids aufgetragen werden können. Insbesondere im Fall der lösemittelempfindlichen PS-NP ist eine Einbettung dieser, zusammen mit Zellen möglich, sodass ein Nachweis in Zellproben erfolgen kann. Die Elektronenmikroskopie wird auch in anderen Veröffentlichungen zur Nanomaterialcharakterisierung eingesetzt, wodurch anderen Studienergebnissen zur Verfügung steht, um die eigenen Ergebnisse zu vergleichen und in einen Gesamtkontext zu stellen.

5.2 Synthetische Partikel in umweltrelevanten Matrices

5.2.1 Vorkommen von Nanomaterialien in der Umwelt

In keiner der untersuchten Umweltproben wurden synthetische Nanomaterialien gefunden. Dies könnte darauf hinweisen, dass bisher keine Nanomaterialien in die untersuchten Umweltkompartimente (Boden, Fließgewässer, Organismen) eingetragen wurden bzw. zum Zeitpunkt der Probenahme keine Nanoobjekte im beprobten Bereich vorhanden waren. Einer der wahrscheinlichsten Eintragspfade für Nanomaterialien in die Umwelt ist jener über Abwässer und Kläranlagen (BENN & WESTERHOFF, 2008; BLASER et al., 2008; LOMBI et al., 2012). Da es sich bei Nanoobjekten grundsätzlich um Feststoffe handelt, wird vermutet, dass viele von ihnen sich im Klärschlamm absetzen (KIM et al., 2010; BENN & WESTERHOFF, 2008). Ein Großteil der Nanomaterialien im Abwasser gelangt dementsprechend nicht über das aufbereitete Wasser in die Oberflächengewässer. Eine mögliche Eintragsquelle in Böden ist die Ausbringung von Klärschlamm, in welchem Nanomaterialien enthalten sind, auf landwirtschaftlich genutzten Flächen. Über derart belastete Böden ist zudem bei Starkregenereignissen eine Abschwämmung von Nanomaterialien in nahegelegene Oberflächengewässer als indirekter Eintragspfad denkbar

(GOTTSCHALK et al., 2009). Die Düngung mit Klärschlamm wird allerdings nur noch auf wenigen Flächen angewandt, da sie durch die novellierte Düngemittelverordnung stark eingeschränkt wurde (DüMV, 2019; AbfKlärV, 2017). So darf der Klärschlamm aus großen Kläranlagen mittelfristig nicht mehr als Dünger verwendet werden und auch die Flächen, welche mit dem Schlamm gedüngt werden dürfen, wurden reduziert. Es ist daher denkbar, dass viele vom Menschen genutzte Nanomaterialien noch nicht in der Umwelt oder zumindest in den hier untersuchten Kompartimenten angekommen und damit auch nicht nachweisbar sind. Dies wird teilweise durch die Ergebnisse von Untersuchungen der Firma Postnova Analytics GmbH unterstützt, welche ebenfalls als Projektpartner an NanoUmwelt beteiligt war. Mittels ICP-MS wurden die Rheinwasserproben auf Nanomaterialien untersucht. Der Silbergehalt lag unterhalb der Nachweisgrenze der Methode (5 ng/L) (Postnova Analytics, 2018), sodass davon ausgegangen werden kann, dass zumindest keine hohen Ag-Konzentrationen im Rhein auftreten. Da bisher wohl kein mengenmäßig hoher Eintrag von Nanomaterialien in die Umwelt erfolgt, ist es unwahrscheinlich, dass die Partikel in großer Zahl von Organismen aufgenommen und nachweisbar angereichert werden.

Tatsächlich gibt es bisher fast keine direkten Nachweise über den Eintrag von Nanomaterialien in die Umwelt (PETERS et al., 2018; KAEGI et al., 2008). Die erwartete Umweltkonzentration (PEC; engl.: *Predicted environmental concentration*), welche anhand von Modellen ermittelt wird, ist zudem für Nanomaterialien sehr niedrig (MCGILLICUDDY et al., 2017; BLASER et al., 2008). In Oberflächengewässern liegt sie beispielsweise für Nanosilber zwischen 0,04 und 619 ng/L (PETERS et al., 2018). In Böden und Sedimenten werden Nanosilberkonzentrationen im unteren mg/kg-Bereich erwartet (GRÜN et al., 2018; BLASER et al., 2008). Eine der wenigen Studien, die tatsächlich Partikel in Oberflächengewässern nachweisen konnte, bestätigt diese Einschätzungen. PETERS et al. (2018) konnten in niederländischen Flüssen eine durchschnittliche Ag-NP-Konzentration von 0,8 ng/L ermitteln.

5.2.2 TEM-Nachweis von Nanomaterialien

Aufgrund der zu erwartenden sehr niedrigen Umweltkonzentrationen ist es möglich, dass die untersuchten Feldproben synthetische Nanomaterialien enthalten, diese mittels TEM jedoch nicht nachweisbar sind. In der Perkolationsstudie der Universität Trier wurden Böden mit NP versetzt. Diese lassen sich zwar grundsätzlich nachweisen, jedoch nicht in umweltrelevanten Konzentrationen. Um Partikel zu finden, war in den durchgeführten Versuchen eine Konzentration von mindestens 10 µg/g Boden nötig. Auch im gespikten Fischgewebe ist die für eine zuverlässige Wiederfindung notwendige Konzentration mit 500 µg/mL homogenisiertem Muskelgewebe vergleichsweise hoch.

Zur Darstellung von Umweltproben mittels TEM ist wiederum eine starke Verdünnung erforderlich, um eine ausreichend dünne Probenschicht zu erhalten. Besonders deutlich wurde dies bei der Untersuchung der humanen Blut- und Urinproben. Selbst bei einem lediglich 1-prozentigen Anteil der zu untersuchenden Umweltprobe ist die Auswertung tendenziell schwierig, da durch das enthaltene organische Material eine relativ dicke Schicht entsteht, sodass bei hohen Vergrößerungen kaum scharfe Aufnahmen möglich sind. Eine Interpretation des Partikelverhaltens in den für die Untersuchung aufbereiteten Proben ist in diesem Fall nicht sinnvoll, da die Beobachtungen durch den hohen Wasseranteil nicht zweifelsfrei dem Einfluss von Urin und Blut zugeordnet werden kann.

Durch die bei Umweltproben oft notwendige, starke Verdünnung kann nur ein sehr kleiner Ausschnitt der ursprünglichen Probe angesehen werden. Die Grids werden jeweils mit 2 μ L Flüssigkeit beladen. Dieses Volumen verteilt sich nicht nur über den befilmten Spalt des Grids, sondern auch über den Rand, welcher nicht im TEM untersucht werden kann. Pro Grid werden demnach nicht einmal 2 μ L einer teilweise stark verdünnten Probe angesehen. Bei der Suche nach Nanomaterialien ist zudem zu beachten, dass der Pioloformfilm bei einer hohen Vergrößerung abgesucht werden muss, um einzelne Nanoobjekte identifizieren zu können. Dies macht die Untersuchung sehr zeitintensiv.

Nanoobjekte in der Umwelt sind selbst mit Methoden, die eine deutlich niedrigere Nachweisgrenze als das TEM aufweisen derzeit kaum detektierbar (PETERS et al., 2018; MCGILLICUDDY et al., 2017; SADIK et al., 2014). Bei vielen Messverfahren wird die Nachweisgrenze durch Hintergrundüberlagerungen der komplexen Umweltmatrices deutlich erhöht (MCGILLICUDDY et al., 2017). Teilweise können Nanomaterialien nur bis zu bestimmten Größen detektiert werden (PETERS et al., 2018). Viele Methoden sind noch in der Entwicklung und stehen für die systematische, großflächige Untersuchung von Umweltkompartimenten nicht zur Verfügung (DOMERCQ et al., 2018).

Ein weiteres Problem der Nutzung des TEM als Nachweismethode besteht darin, dass Nanoobjekte in einer Probe möglicherweise nicht als solche erkannt werden. Lediglich die im Projekt untersuchten Materialien können bei der Suche nach Nanoobjekten in Umweltproben als Referenz genutzt werden. Synthetische Nanoobjekte aus anderen Materialien oder mit einer anderen Erscheinungsform würden vermutlich in einer Umweltprobe nicht als solche erkannt werden, da eine entsprechende Vergleichsgrundlage fehlt. Zudem sind Nanoobjekte in der Umwelt physikalischen und chemischen Veränderungen unterworfen (MCGILLICUDDY et al., 2017). Dadurch, dass z. B. Ag in Lösung geht oder Komplexe bildet (NEALE et al., 2013), kann sich die Form und Größe der Partikel verändern (PETERS et al., 2018), was ihre visuelle Identifikation massiv erschweren bzw. unmöglich machen kann.

Anhand der Flusswasserproben, welche mit NP versetzt wurden, lässt sich ein Eindruck des Einflusses von komplexen Umweltproben auf die Materialien zeigen. Solche Proben enthalten natürlich vorkommendes kohlenstoffbasiertes Material (NOM; engl.: *Natural organic matter*) in teilweise hohen Konzentrationen (KRITZBERG & EKSTRÖM, 2012). Dieses hat nachweislich einen Einfluss auf das Verhalten von Nanomaterialien. So können organische Moleküle mit der Nanopartikeloberfläche interagieren und daran binden oder funktionelle Gruppen ersetzen. Dies kann die Oberflächenladung der Partikel und ihr Agglomerationsverhalten beeinflussen (DE KLEIN et al., 2016; BARTON et al., 2015). Insgesamt verhalten sich die Nanomaterialien im Flusswasser zwar ähnlich wie in Reinstwasser, es ist jedoch bei einigen Partikeln eine Neigung zur vermehrten Zusammenlagerung zu beobachten. Zudem sammeln sich die Partikel teilweise um Bestandteile der Probenmatrix herum an. Der durchgeführte Versuch ermöglicht es, mittels TEM das Verhalten von Partikeln und die Interaktion mit NOM in einer Realprobe annäherungsweise zu simulieren. Die Untersuchung dieser Wechselwirkung stellt einen wichtigen Aspekt für die zukünftige Modellierung des Lebenszyklus von Nanomaterialien dar (GARNER et al., 2017) und ist daher von großer Bedeutung für die Forschung.

Die Unkenntnis über die Veränderungen, denen Nanomaterialien in den verschiedenen Umweltkompartimenten und durch Wechselwirkungen mit anderen vorhandenen Substanzen unterliegen können, beeinträchtigt somit die Aussagefähigkeit über das generelle Vorhandensein von solchen Materialien in Umweltproben.

5.2.3 Fazit

Zum Nachweis von Nanomaterialien in Umweltmatrices stellt das TEM keine sichere und effiziente Methode dar. Ein Nachweis ist nur bei sehr hohen Nanoobjektkonzentrationen und einer Mindestgröße der einzelnen Partikel ausreichend sicher möglich. Selbst dann können mit vergleichsweise hohem Zeit- und Arbeitsaufwand nur kleine Ausschnitte einer Probe analysiert werden. Es besteht zudem das Risiko Partikel zu übersehen oder nicht zu erkennen. Nichts desto trotz kann das TEM hilfreich bei der Untersuchung des Partikelverhaltens sein, sofern vergleichsweise hohe Konzentrationen eingesetzt werden. So kann das Verhalten von Nanomaterialien in Umweltproben optisch analysiert werden. Eine weitere Möglichkeit, das TEM in diesem Bereich sinnvoll einzusetzen, wäre die vorhergehende gezielte Anreicherung der gesuchten Partikel, z. B. mittels Feldflussfraktionierung. Das TEM könnte dann unter anderem Informationen bezüglich optischer Veränderungen der Partikel in Umweltproben liefern.

5.3 Untersuchung von Zellkulturen und Gewebe

5.3.1 Nachweisproblematik der zellulären Aufnahme von Nanomaterialien

Mittels TEM war im Rahmen dieser Arbeit kein Nachweis von Ag- und PS-NP in den beiden exponierten Darmzellentypen und den flächig wachsenden Stammzellen möglich. Dies deckt sich teilweise mit den Ergebnissen des Fraunhofer IBMT. Die Messung mittels Asymmetrischer Feld-Fluss-Feld-Fraktionierung offenbarte keinen Transport von Partikeln über die Darmbarriere des Schweinedünndarms. Auch eine histologische Untersuchung der Gewebestücke zeigte keine visuellen Unterschiede zur Kontrolle. In den menschlichen Darm- und Stammzellen wies das Fraunhofer Institut jedoch mit Hilfe von Konfokalmikroskopie (CLSM; engl.: *Confocal laser scanning microscopy*) die Aufnahme von PS-NP nach (HESLER, 2017; KOMO, 2017). Bei den Stammzellen lagen diese in den Lipidvakuolen vor.

In den untersuchten Plazentazellen konnten keine Ag-COOH und Ag-NH₂ mittels TEM nachgewiesen werden. Die Empa konnte hier mit Hilfe der ICP-MS eine erhöhte Ag-Konzentration in beiden Zelltypen verglichen mit der NK feststellen. Erkenntnisse darüber, ob es sich dabei um Nanosilber oder um Silberionen handelt, liegen jedoch nicht vor. Oft werden toxische Wirkungen auf Zellen nicht durch die NP selbst, sondern durch freiwerdende Ionen ausgelöst (MCSHAN et al., 2014). In solchen Fällen ist ein Nachweis mittels TEM nicht möglich. Allerdings konnte die Aufnahme von Ag- und PS-NP durch Zellen bereits in mehreren In-vitro-Studien gezeigt werden (GREULICH et al., 2011; JOHNSTON et al., 2010; WIN & FENG, 2005).

Dass die NP in einigen Fällen nicht mittels TEM nachgewiesen werden konnten, obwohl die Untersuchungen anderer Projektpartner eine Aufnahme durch die Zellen nahelegen, kann in einer zu geringen Anzahl an aufgenommenen Partikeln und an der Aufnahme von Silberionen statt vollständigen Partikeln begründet sein.

5.3.2 Mikropartikel in Zellen

In den Sphäroiden und den Plazentazellen treten Strukturen auf, welche in Form und Größe den Mikropartikeln ähneln. Allerdings heben sich die potenziellen Partikel in den Zellen hell gegen das Zellinnere ab, während die Mikropartikel bei der Charakterisierung tief schwarz erschienen. Zudem treten mehr Größenvariationen zwischen den in den Zellen gefundenen Strukturen auf, als es bei der Partikelcharakterisierung der Fall war. Sowohl in den Sphäroid- als auch in den Plazentazellen kommen zudem Vesikel vor, welche den potenziellen NP stark ähneln. Auf der Nahaufnahme der potenziellen PS-COOH-600 in den BeWo-Zellen ist zu erkennen, dass die hellen, runden Strukturen, bei denen es sich um Mikropartikel handeln könnte, teilweise verformt sind (Abb. 28). Dies spricht dagegen, dass es sich um PS-Partikel handelt. In den vorangegangenen Untersuchungen zeigten sich diese als sehr formstabil. Ein flüssigkeitsgefülltes Vesikel könnte

hingegen durch Druck von außen leicht verformt werden. Zudem wurde in den entsprechenden Behandlungsgruppen kein vermehrtes Auftreten der fraglichen Strukturen gegenüber der NK beobachtet. Aus den genannten Gründen ist es sehr fraglich, ob es sich bei den gefundenen Strukturen um Mikropartikel handelt, obwohl sowohl die Empa als auch das Fraunhofer Institut mittels CLSM die Aufnahme von Mikropartikeln in die Zellen nachweisen konnten. Auch in anderen Untersuchungen wurden teils mikroskalige PS-Partikel in Zellen nachgewiesen (JOHNSTON et al., 2010; WIN & FENG, 2005), wobei vermehrt kleine Partikel aufgenommen wurden (JOHNSTON et al., 2010).

In mehreren Fällen wurde die Aufnahme von Partikeln mit Methoden wie der CLSM nachgewiesen, während mit dem TEM keine Nanomaterialien in den Zellen identifiziert werden konnten. Dies liegt eventuell daran, dass die einzelnen Partikel nicht als solche erkannt oder aufgrund von geringer Bildqualität und großem Probenumfang übersehen wurden. Besonders bezüglich der PS-Partikel besteht eine gewisse Verwechslungsgefahr mit Vakuolen und Vesikeln. Treten die Partikel nicht in großer Zahl sowie gehäuft auf und zeigen so einen deutlichen Unterschied zur NK, sind sie mittels TEM nicht sicher zu identifizieren.

5.3.3 Nanopartikel in Zellen

Sowohl in den Sphäroid- als auch in den Plazentazellen wurden Strukturen gefunden, welche deutliche Ähnlichkeit mit PS-NP haben. In beiden Versuchen konnte eine wahrscheinliche Aufnahme von PS-COOH gezeigt werden, in den BeWo-Zellen zudem von PS-NH₂. In allen drei Fällen sind Zusammenlagerungen von Partikeln erkennbar, die durch Membranen vom Rest der Zelle abgegrenzt sind. Bei der Konzentration von 10 µg/mL sind vereinzelt gefüllte Vesikel zu erkennen. Bei der höheren Konzentration von 100 µg/mL treten die Vesikel gehäuft auf und nehmen viel Raum in der Zelle ein. Diese Anreicherung von Nanomaterialien in membranumschlossenen Bereichen konnte auch in anderen Untersuchungen beobachtet werden (GREULICH et al., 2011; CHITHRANI et al., 2006), wobei speziell bei PS-NP auch einzelne freie Partikel im Zytoplasma beobachtet wurden (WIN & FENG, 2005). Die identifizierten, potenziellen NP heben sich hell vom Hintergrund ab, was bei einer dicken Probenschicht (z. B. in Blut) bereits bei PS-NP beobachtet wurde. Die Größe der potenziellen NP passt zu dem bei der Materialcharakterisierung ermittelten Durchmesser. Die gefundenen Partikel sind besonders durch ihre gleichmäßige Form auffällig. Durch CLSM-Untersuchungen konnte die Empa in beiden Plazentazelltypen PS-NP nachweisen, wobei die Konzentration in den Bewo-Zellen deutlich höher war als in den HPE-Zellen. Dies unterstützt die Aussage, dass eine gewisse Menge an NP in den Zellen notwendig ist, um sie als solche identifizieren zu können, denn in den HPE-Zellen wurden mittels TEM keine Partikel gefunden.

5.3.4 Fazit

Werden mittels TEM in Zellproben keine NP gefunden, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie aufgenommen wurden. Bei geringen Konzentrationen innerhalb der Zelle und einzeln vorliegenden Partikeln ist es schwierig diese zu finden und es ist möglich, dass sie übersehen werden. Werden partikelähnliche Strukturen gefunden, können diese nicht allein mittels TEM zweifelsfrei als NP identifiziert werden. Es kann nur anhand von Vergleichen mit der NK davon ausgegangen werden, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die synthetischen Partikel handelt. Sehr kleine Partikel, wie z. B. die verwendeten TiO₂-NP, lassen sich mit dem verwendeten TEM nicht identifizieren. Dennoch kann das TEM als ergänzende Methode hilfreich sein und Informationen über die genaue Lokalisation und das Verhalten von NP in Zellen liefern.

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass moderne TEM gegenüber dem verwendeten Gerät Vorteile in Bezug auf den Nachweis von Nanomaterialien sowohl in Umwelt- als auch in Organismenproben haben können. Bei TEM mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX; engl.: *Energy dispersive X-ray spectroscopy*) ist eine Elementbestimmung möglich. Hierfür werden Probenatome durch einen Elektronenstrahl angeregt und senden Röntgenstrahlen einer spezifischen Energie aus, welche letztendlich Aufschluss über die Elementzusammensetzung der Probe gibt (THOMAS & GEMMING, 2013).

5.4 Schlussfolgerungen

Die durchgeführten Untersuchungen lassen eine Reihe von Schlüssen hinsichtlich der Verwendung des TEM im Zusammenhang mit Nanomaterialien zu:

1. Nanopartikel mit einem Durchmesser ab ca. 10 nm sowie Nanofasern können mit dem TEM sehr gut und einfach dargestellt werden. Insbesondere für Partikel ist die Methode gut zur Charakterisierung von Größe und Verhalten geeignet.
2. Als Nachweismethode für Nanomaterialien in Umweltmatrices stellt die transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchung keine sichere und effiziente Methode dar, da Partikel leicht übersehen bzw. nicht sicher identifiziert werden können und lediglich die Untersuchung kleiner Probenvolumina möglich ist.
3. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass durch verschiedene humane Zellen PS-NP aufgenommen werden. Ein Negativnachweis der Aufnahme von Nanomaterialien durch Zellen ist über das TEM kaum möglich, da auch hier ein hohes Risiko besteht einzelne Partikel zu übersehen.

Insgesamt ist das TEM ein gutes Charakterisierungswerkzeug für viele Nanomaterialien. Zum Einsatz beim Nachweis von NP in Umweltmatrices und Zellen ist die Methode allerdings nur

bedingt geeignet. Für niedrige Partikelkonzentrationen und sehr kleine Nanoobjekte kann das TEM nicht eingesetzt werden. Zudem ist eine hundertprozentig sichere Identifikation von Nanomaterialien nicht möglich. Allerdings stellt das TEM eine gute ergänzende Methode dar, um das Verhalten und die genaue Lokalisation von Nanomaterialien in Umweltmatrices und Zellen abzubilden.

Teil II

Untersuchung der Wirkung von Nanomaterialien auf Mikroalgen

6 Einleitung (Teil II)

Wie in der allgemeinen Einführung zu Beginn dieser Arbeit (Kapitel 1) dargelegt wurde, stellen synthetische Nanomaterialien ein weitgehend unbekanntes Risiko für die Umwelt dar. Insbesondere aquatische Ökosysteme und vor allem Oberflächengewässer und ihre Biozönose sind potenziell durch den Eintrag der Substanzen betroffen. Im Rahmen dieses Teils der vorliegenden Dissertation werden daher die Auswirkungen verschiedener Nanomaterialien auf Algen untersucht.

6.1 In-vivo-Laboruntersuchungen

Um die Effekte, welche durch Nanomaterialien ausgelöst werden können, zu untersuchen, bieten sich Laborexperimente an. Hierbei können unter kontrollierten Bedingungen einzelne Aspekte von Nanotoxizität und dem Umweltverhalten von Nanoobjekten untersucht werden. Der Vorteil von unter kontrollierten Laborbedingungen durchgeführten Versuchen gegenüber Freilanduntersuchungen ist, dass Einflussfaktoren gezielt reduziert und einzelne Bedingungen beeinflusst werden können. Dies erschwert zwar eine ganzheitliche Abbildung von Effekten, bzw. eine realistische, naturnahe Bewertung des Umweltverhaltens, es ermöglicht jedoch eine nähere Beleuchtung einzelner Aspekte sowie das Erkennen von Zusammenhängen und trägt so zu einem grundlegenden Verständnis bei.

Toxizitätsuntersuchungen können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt werden. Bei der *In-vitro*-Untersuchung werden Versuche an Geweben und Zellen außerhalb eines Organismus durchgeführt, wodurch einzelne Effekte auf bestimmte Organe und Zelltypen abgebildet werden können. Um ein realistischeres Bild der Wirkung von Substanzen auf einen Organismus zu erhalten, ist jedoch eine Untersuchung *in vivo* vorzuziehen. Besonders geeignet ist hierbei die Betrachtung einzelliger Lebewesen, da es sich um voll funktionsfähige Organismen handelt, welche dennoch aufgrund ihrer geringen Größe Effekte vergleichsweise einfach abbilden und lokalisieren lassen. Als geeignete Testorganismen haben sich hierbei unter anderem einzellige Algen herausgestellt.

6.2 Algen als Testorganismen

Algen sind weit verbreitete Testorganismen im Bereich der aquatischen Ökotoxikologie (OECD, 2011; KAHRU & DUBOURGUIER, 2010). Als Primärproduzenten und Phytoplankton sind sie auf der

untersten Trophieebene einzuordnen (ROUND, 1975). Negative Effekte auf diese Organismengruppe können daher weitreichende Auswirkungen auf die Funktionalität ganzer Ökosysteme haben (LEWIS, 1990) und sind somit von höchstem Interesse für die ökologische Risikobewertung von Substanzen. Insbesondere sogenannte Mikroalgen sind als Versuchsorganismen für toxikologische Untersuchungen gut einsetzbar. Die mikroskopisch kleinen, eukaryotischen Einzeller kommen weltweit in aquatischen und teils terrestrischen Ökosystemen vor. Durch ihre hohe Anpassungsfähigkeit zeigen sie keine übermäßige Empfindlichkeit gegenüber leichten Umweltveränderungen, reagieren jedoch hinsichtlich ihrer Reproduktion sehr sensibel auf die Anwesenheit von Schadstoffen (RADIX et al., 2000), wodurch toxische Effekte sichtbar werden. Mikroalgen sind im Labor leicht und kostengünstig zu kultivieren und die schnelle Reproduktion ermöglicht generationsübergreifende Versuche. Aus diesen Gründen werden Mikroalgen standardmäßig als Modellorganismen für die Indikation von Risiken durch Chemikalien eingesetzt (OECD, 2011). Viele Arten sind gut beschrieben und reagieren auch unter leicht veränderten Haltungsbedingungen vergleichbar. Aufgrund der häufigen Verwendung lassen sich die in Versuchen ermittelten Werte mit umfangreichen Daten aus der Literatur abgleichen.

6.3 Zielsetzung

In diesem zweiten Teil der vorliegenden Dissertation wird die Wirkung von Nanomaterialien auf drei Mikroalgenarten untersucht. Das Ziel der durchgeführten Versuche ist es, Rückschlüsse auf Toxizität und Wirkweise der jeweiligen Testsubstanz zu ziehen. Durch den Einsatz unterschiedlicher Methoden zum Nachweis der Toxizität kann zudem eine Bewertung ihrer Empfindlichkeit und Praktikabilität vorgenommen werden. Betrachtet werden hierbei die Ermittlung der Zellzahl über die Absorption, die In-vitro-Bestimmung des Chlorophyll a-Gehalts, die Messung von zwei Stressparametern über die Chlorophyllfluoreszenz sowie die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Algenzellen. Des Weiteren können anhand des Vergleichs der verschiedenen Nanomaterialien und ihrer Modifikationen potenzielle Unterschiede in der Toxizität herausgestellt werden. Die Testung verschiedener Algenarten ermöglicht zudem eine Bewertung ihrer Eignung als Testorganismen für verschiedene Nanomaterialien.

7 Material und Methoden (Teil II)

7.1 Nanomaterialien

Für Versuche zur Toxizität von Nanomaterialien wurden verschiedene NP ausgewählt, die im Projekt „NanoUmwelt“ Verwendung fanden und im ersten Teil dieser Dissertation beschrieben und charakterisiert werden. Um die Toxizität für Algen zu untersuchen, wurden die NP aus Ag, TiO₂ und PS verwendet. Von einem Einsatz der Kohlenstoff-Nanoröhrchen wurde abgesehen, da für eine Toxizitätsuntersuchung die Verwendung einer genau definierten Konzentration und einer gleichmäßigen Suspension unumgänglich sind. Die zur Verfügung stehenden Nanofasern eignen sich hierfür nicht, wie im ersten Teil dieser Arbeit näher erläutert wird. Die ausgewählten Partikel wurden in ihrer neutralen Form sowie mit carboxylierten und aminierten Funktionalisierungen eingesetzt. Im Gegensatz zu den NP wurden die PS-Mikropartikel in diesem Teil nicht untersucht, da diese erst kurz vor dem Abschluss des Projekts von PlasmaChem fertiggestellt wurden und nicht ausreichend Zeit für eine toxikologische Untersuchung blieb.

Im Fall der Ag-Nanomaterialien wurden die unmodifizierten Partikel des Herstellers PlasmaChem nicht in Versuchen eingesetzt, da sie gemäß der Charakterisierung mit den AgPure vergleichbar sind. Eine Übersicht der untersuchten NP ist Tab. 3 zu entnehmen. Die dort aufgeführten Durchmesser der Nanoobjekte wurden in Teil I dieser Arbeit mit Hilfe des TEM ermittelt (vgl. Kapitel 4.1.1, Tab. 2).

Um den Einfluss von in Lösung gegangenem Ag auf mögliche Effekte der Ag-NP abschätzen zu können, wurde als Vergleichsmaterial Silbernitrat (AgNO₃) verwendet, welches sich in wässrigen Medien löst und in Form von Silberionen (Ag⁺) vorliegt.

Von den Herstellern wurden partikelfreie Flüssigkeiten zur Verfügung gestellt, in denen die Partikel gelagert wurden. Diese Flüssigkeiten wurden ebenfalls toxikologisch untersucht, um mögliche Effekte auf die Nanomaterialien zurückführen zu können. Zwar bilden die Partikel mit der Lagerungsflüssigkeit eine Suspension, analog zum gebräuchlichen Terminus in der Toxikologie werden die entsprechenden Kontrollen im Folgenden jedoch als Lösemittelkontrollen (LK) bezeichnet.

Tab. 3) Übersicht über Grundmaterial, Modifikation, Benennung und mittels TEM gemessene Größe der von PlasmaChem synthetisierten Nanomaterialien sowie der AgPure-Nanopartikel der RAS GmbH.

Material	Modifikation	Oberflächenladung	Bezeichnung	Größe
Silber	keine	neutral	AgPure	11 nm
	Carboxygruppe	negativ	Ag-COOH	6 nm
	Aminogruppe	positiv	Ag-NH ₂	6 nm
Titandioxid	keine	neutral	TiO ₂ -n	2 nm
	Carboxygruppe	negativ	TiO ₂ -COOH	< 2 nm
	Aminogruppe	positiv	TiO ₂ -NH ₂	< 2 nm
Polystyrol	keine	neutral	PS-n	33 nm
	Carboxygruppe	negativ	PS-COOH	41 nm
	Aminogruppe	positiv	PS-NH ₂	87 nm

7.2 Versuchsorganismen

7.2.1 Auswahl der Arten

Die folgenden drei Algenarten wurden in den Toxizitätsuntersuchungen als Versuchsorganismen zur Abschätzung der Giftigkeit von Nanomaterialien eingesetzt:

Raphidocelis subcapitata

Die Mikroalge *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) (NYGAARD et al., 1986), wird in die paraphyletische Gruppe der Grünalgen (Chlorobionta) eingeordnet. Sie gehört der Klasse Chlorophyceae, der Ordnung Sphaero-pleales und der Familie Selenastraceae an (GUIRY & GUIRY, 2018). In der Literatur taucht sie häufig auch unter den Namen *Pseudokirchneriella subcapitata* und *Selenastrum capricornutum* auf (YAMAGISHI et al., 2017).



Abb. 29) *Raphidocelis subcapitata* (Foto: Susanne Straskraba).

Die Zellen von *R. subcapitata* liegen in der Regel einzeln vor und sind grün und sichelförmig (LINNE VON BERG, 2012). In gekrümmtem Zustand haben sie eine Länge von 7–10 µm (Abb. 29). *R. subcapitata* ist weltweit verbreitet (STIRK et al., 2013; LINNE VON BERG, 2012; FANÉS TREVIÑO et

al., 2009; FAWLEY et al., 2006; REINHOLD, 1937) und kommt planktisch lebend in limnischen Gewässern vor (LINNE VON BERG, 2012). Die Art pflanzt sich ungeschlechtlich durch die Bildung von Autosporen fort (LINNE VON BERG, 2012; FAWLEY et al., 2006).

R. subcapitata ist einer der am meisten verwendeten Bioindikatoren in ökotoxikologischen Untersuchungen (YAMAGISHI et al., 2017; LINNE VON BERG, 2012). Da die Mikroalge ein Modellorganismus im standardisierten Wachstumsinhibitionstest der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD; engl.: *Organisation for Economic Co-operation and Development*) ist (OECD, 2011), liegt eine umfangreiche Datenbasis zu der Art vor.

Die für die Versuche eingesetzte Kultur wurde von der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) erworben. Es handelt sich um den Stamm 61.81, welcher ursprünglich aus dem Fluss Nitelva in Norwegen stammt.

Chlamydomonas reinhardtii

Chlamydomonas reinhardtii (Dangeard) (DANGEARD, 1888) ist ebenfalls eine Mikroalge der Klasse Chlorophyceae. Die Art wird der Ordnung Chlamydomonadales und der Familie Chlamydomonadaceae zugeordnet (GUIRY & GUIRY, 2018).

Die Einzeller sind ca. 10 µm groß, eiförmig, grün gefärbt und isokont begeißelt (Abb. 30). Bei *C. reinhardtii* tritt sowohl ungeschlechtliche Vermehrung über Zoosporen als auch geschlechtliche Fortpflanzung auf (LINNE VON BERG, 2012)

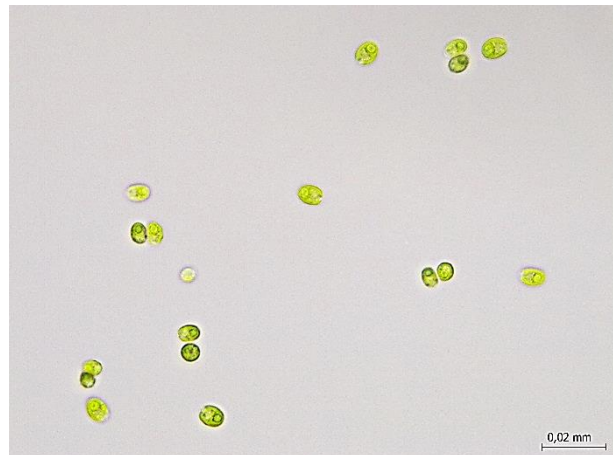


Abb. 30) *Chlamydomonas reinhardtii* (Foto: Susanne Straskraba).

Die Alge kommt weltweit in limnischen Gewässern und Böden vor (LINNE VON BERG, 2012; ROUND, 1957). Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich über Europa (NOVAKOVSKAYA & PATOVA, 2008; JOHN et al., 2002), Amerika (STIRK et al., 2013), Asien (BARINOVA et al., 2015) und Australien (BROADY et al., 2012).

C. reinhardtii wird bereits seit Jahrzehnten in der Forschung eingesetzt, was den Vergleich mit umfangreichen Daten aus der Literatur ermöglicht (LINNE VON BERG, 2012). Da sie zudem im Boden vorkommt, können neben den Auswirkungen auf limnische Gewässer auch solche mit einbezogen werden, die den Boden oder speziell trockenfallende Gewässer betreffen.

Die Mikroalge wurde ebenfalls von der SAG bezogen. Ursprünglich wurde der Stamm 11-32a in Massachusetts (USA) aus einer Bodenprobe entnommen.

Cyclotella meneghiniana

Die Kieselalge *Cyclotella meneghiniana* (Kützing) (BRUN, 1880) gehört zur Klasse Mediophyceae, zur Ordnung Stephanodiscales und zur Familie Stephanodiscaceae (GUIRY & GUIRY, 2018).

Die zentrische, bräunlich gefärbte Diatomee hat einen Durchmesser von ca. 7 µm (Abb. 31). Sie kommt in der gemäßigten Zone sowohl in marinen Lebensräumen als auch in Brack- und Süßwasserökosystemen vor (FOTT, 1971). Ihr Verbreitungsgebiet umfasst Europa, Asien,

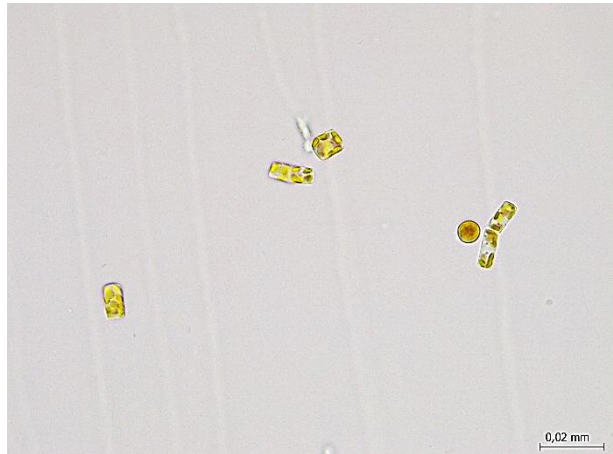


Abb. 31) *Cyclotella meneghiniana* (Foto: Susanne Straskraba).

Amerika, Afrika, Australien sowie verschiedene pazifische und atlantische Inseln (GUIRY & GUIRY, 2018). Die Vermehrung der Art findet hauptsächlich über Zellteilung statt, kann aber auch sexuell erfolgen (HOOPS & FLOYD, 1979; SCHULTZ & TRAINOR, 1968).

C. meneghiniana steht in der vorliegenden Arbeit stellvertretend für die weit verbreitete Gruppe der Kieselalgen. Da die Grünalgen bereits durch zwei Vertreter repräsentiert werden, soll mit der Diatomee eine weitere große Organismengruppe einbezogen werden. Zwar handelt es sich nicht um einen Organismus, der häufig in der Ökotoxikologie eingesetzt wird, jedoch ist die Art besonders in Bezug auf die Photosynthese ein viel genutzter Modellorganismus und daher gut untersucht.

Die verwendeten Algen stammen ebenfalls von der SAG. Die genaue Bezeichnung des Stamms lautet 1020-1a.

7.2.2 Haltungsbedingungen

Die Haltung und Vermehrung der beiden Grünalgen *R. subcapitata* und *C. reinhardtii* erfolgte in leicht abgewandeltem Bristol-Medium (BOLD, 1949). *C. meneghiniana* wurde in ASP-Medium (PROVASOLI et al., 1957) kultiviert. Die genaue Zusammensetzung der Medien ist dem Anhang (Tab. 8 bis Tab. 13) zu entnehmen. Die Kulturen wurden in 50 mL des jeweiligen Mediums in Erlenmeyerkolben aus Glas angesetzt. Die Gefäße, mit einem Fassungsvermögen von 100 mL, wurden vor der Benutzung autoklaviert und mit einem Zellulosestopfen verschlossen, um die Verunreinigung der Kulturen bzw. übermäßige Verdunstung zu verhindern. Zur Erreichung eines gleichbleibenden Kulturwachstums wurden neue Kulturen immer mit der gleichen Zellzahl angeimpft, welche über die Absorption der Algenkultur ermittelt wurde. Die Zellzahl in den frisch angeimpften Kolben betrug bei *R. subcapitata* ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen, bei *C. reinhardtii*

ca. 1×10^4 Zellen und bei *C. meneghiniana* ca. $8,5 \times 10^4$ Zellen. Im Fall von *R. subcapitata* und *C. reinhardtii* wurden alle sieben Tage die oben genannten Zellzahlen in frisches Medium überführt. Die Kultur der langsam wachsenden *C. meneghiniana* wurde alle 14 Tag überimpft. Die Arbeit mit den geöffneten Kolben erfolgte stets in einer Sterilbank. Alle Algen wurden unter ständigem Schütteln bei einer Amplitude von 120 rpm kultiviert. Die Grünalgen wurden bei 21 ± 2 °C, die Kieselalge wurde bei 17 ± 1 °C Raumtemperatur gehalten. Die Schüttler wurden unter Lichtfeldern positioniert, deren Lichtintensität bei den beiden Grünalgen 75 und bei der Kieselalge $65 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ betrug. Der Hell-Dunkel-Rhythmus lag in den Kulturräumen bei 16/8 Stunden.

7.3 Versuche

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Nanomaterialien auf Algen wurden zunächst Versuche zur Etablierung von Messverfahren durchgeführt. Anschließend erfolgten Toxizitätsuntersuchungen mit mehreren Endpunkten für jede Alge und jede Testsubstanz.

7.3.1 Etablierung der Absorptionsmessung

Bestimmung der Messwellenlänge

Zur Bewertung des Allgemeinzustands von Algen wird häufig deren Wachstum in Form der Zellzahl herangezogen. Dieser Parameter kann indirekt durch die Absorption der Algensuspension mit Hilfe eines Photometers gemessen werden. In einem Versuch wurde daher die Wellenlänge ermittelt, bei der die verschiedenen Algenarten maximal viel Licht absorbieren, um mit dieser zukünftig die Dichte der Kultur zu messen. Gemäß einer Untersuchung von RODRIGUES et al. (2011) werden die höchsten Absorptionen durch die Chlorophyllmoleküle erreicht. Von jeder der untersuchten Arten wurde daher mit dem V-650 UV-VIS Spektrophotometer von Jasco ein Absorptionsspektrum von 600 bis 800 nm erstellt. Innerhalb dieses Bereiches wurde der Wert der höchsten Absorption ermittelt und die zugehörige Wellenlänge für zukünftige Messungen verwendet. Diese Methode orientiert sich an der Untersuchung von RODRIGUES et al. (2011).

Umrechnung der Absorption in die Zellzahl

Die Zellzahl ist eine häufig genutzte Größe in der Bewertung des Zustands von Algen, der tatsächlich gemessene Endpunkt in dieser Arbeit ist jedoch die Absorption der Algenkultur. Um von der gemessene Absorption Rückschlüsse auf die Zellzahl ziehen zu können, wurden Formeln zur Umrechnung für alle drei Algenarten ermittelt.

Um den Zusammenhang zwischen Zellzahl und Absorption zu bestimmen, wurden beide Parameter zeitgleich in einer Algenkultur gemessen. Für jede Algenart wurden hierfür drei Kolben

mit 20 mL Medium befüllt und anschließend mit Zellen der Stammkulturen angeimpft. Als Startzellzahl wurden sowohl höhere als auch niedrigere Algenzahlen als im geplanten Wachstumsinhibitionstest (vgl. Kapitel 7.3.2) eingesetzt. Somit wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht auch extreme Messergebnisse des Wachstumsinhibitionstests durch den Versuch abzudecken. Zudem betrug die Versuchsdauer jeweils 24 h mehr als beim Wachstumsinhibitionstest vorgesehen. Die Kolben wurden unter den vorher beschriebenen Bedingungen kultiviert. Jeden Tag wurden an der Sterilbank 500 µL Kultur entnommen. 400 µL wurden zur Messung der Absorption mit dem Spark® Multimode Microplate Reader von Tecan verwendet. Die Probe wurde auf vier Wells einer 96-Well-Platte verteilt, sodass vier Messwerte erzeugt wurden. Die restlichen 100 µL wurden im Fall von *C. reinhardtii* zunächst mit 10 µL Ethanol versetzt, um die Zellen zu immobilisieren. Bei allen Algenarten wurde viermal die Zellzahl in einer Assistent®-Zählkammer (Thoma (neu)) bestimmt. Bei geringen Zellzahlen, wurden alle 16 Gruppenquadrate der Kammer ausgezählt. Lagen in den einzelnen Gruppenquadraten mehr als 25 Zellen vor, wurden vier davon ausgezählt und das Ergebnis auf die Gesamtzahl der Gruppenquadrate hochgerechnet.

7.3.2 Toxizitätsuntersuchung

Versuchsbedingungen

Der Toxizitätstest wurde in Anlehnung an die OECD Richtlinie 201 (OECD, 2011) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen 72 h Wachstumsinhibitionstest für Algen und Cyanobakterien. Durch die schnelle Generationsfolge der Testorganismen können in diesem Test Effekte über mehrere Generationen untersucht werden. Es wurden die in Kapitel 7.2.1 beschriebenen Algenarten als Testorganismen eingesetzt. Endpunkt des OECD-Tests ist das Wachstum nach 72 h. Im Fall der langsam wachsenden Diatomee *C. meneghiniana* wurde die Testdauer auf 120 h erhöht, um eine mit den Grünalgen vergleichbare Anzahl an Zellteilungen zu erzielen. Die Algenkulturen und Kulturgefäße wurden während des Versuchs möglichst steril gehalten, um eine Beeinträchtigung der Organismen durch Bakterien und Pilze auszuschließen. Der Test wurde in Glaskolben mit einem Fassungsvermögen von 100 mL durchgeführt. Um die Verdunstung gering zu halten, waren diese während des Tests mit Zellulosestopfen verschlossen. Jeder Kolben wurde zunächst mit 20 mL Medium befüllt. Die Testsubstanzen wurden direkt vor der Überführung in die Versuchskolben im entsprechenden Medium suspendiert bzw. gelöst. Die Gefäße wurden für 20 h unter den im Versuch angewandten Bedingungen inkubiert, um eine gleichmäßige Verteilung der NP zu erreichen. Die Rotation der Kolben und die Beleuchtung entsprachen den in Kapitel 7.2.2 beschriebenen Haltungsbedingungen. Die Position der Gefäße auf den Schüttlern wurde randomisiert, um einen Positionseffekt auszuschließen. Am ersten Testtag wurden die Kolben mit Zellen aus den Stammkulturen angeimpft. Bei *R. subcapitata*

wurde eine Startzellzahl von ca. $3,2 \times 10^5$ Zellen eingestellt. Bei *C. reinhardtii* betrug sie $3,5 \times 10^5$ Zellen. Die Versuche mit *C. meneghiniana* wurden mit $3,5 \times 10^4$ Zellen angesetzt. Die Validität des jeweiligen Tests wurde beim Erreichen eines Wachstumsfaktors von 16 nach 72 bzw. 120 h anerkannt. Es wurden pro Substanz fünf Konzentrationen sowie LK und NK untersucht. Hinsichtlich des Stichprobenumfangs (n) bestand jede Behandlungsgruppe aus drei Replikaten, lediglich die NK umfasste sechs Replikate. Zudem wurde für jede getestete Testsubstanz-Konzentration eine Blindprobe angesetzt, welche nur Medium und NP bzw. Silbernitrat enthielt. Eine Übersicht über die eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanzen ist Tab. 4 zu entnehmen. Die Auswahl der Konzentrationen beruhte auf im Vorfeld durchgeführten Wachstumsinhibitionstests, welche der Ermittlung sinnvoller Testkonzentrationen dienten.

Tab. 4) In den Toxizitätsuntersuchungen eingesetzte Konzentrationen der Testsubstanzen.

Material	Konzentration		
	<i>R. subcapitata</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. meneghiniana</i>
AgPure	81; 27; 9; 3; 1 ng/mL	81; 27; 9; 3; 1 ng/mL	10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12 µg/mL
Ag-COOH	81; 27; 9; 3; 1 ng/mL	81; 27; 9; 3; 1 ng/mL	10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12 µg/mL
Ag-NH ₂	81; 27; 9; 3; 1 ng/mL	243; 81; 27; 9; 3 ng/mL	10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12 µg/mL
AgNO ₃	81; 27; 9; 3; 1 ng/mL	81; 27; 9; 3; 1 ng/mL	10; 3,33; 1,11; 0,37; 0,12 µg/mL
TiO ₂ -n			
TiO ₂ -COOH	300; 100; 33,3; 11,1; 3,70 µg/mL	300; 100; 33,3; 11,1; 3,70 µg/mL	100; 33,3; 11,1; 3,70; 1,23 µg/mL
TiO ₂ -NH ₂			
PS-n			
PS-COOH	81; 27; 9; 3; 1 µg/mL	81; 27; 9; 3; 1 µg/mL	81; 27; 9; 3; 1 µg/mL
PS-NH ₂			

Endpunkte

Alle Proben, welche zur Messung der Endpunkte notwendig sind, wurden im Fall der Grünalgen nach 72 h entnommen, bei der Diatomee nach 120 h.

Der Wachstumsinhibitionstest beruht auf der Erfahrung, dass das Wachstum von Algen durch die Anwesenheit toxischer Substanzen gehemmt wird. Um das Wachstum der Zellen zu bestimmen, wurde indirekt die Zellzahl gemessen, indem die Absorption der Algensuspensionen erfasst und

mit der tatsächlich ermittelten Zellzahl korreliert wurde. Damit die ermittelten Daten in die Zellzahl umgerechnet werden können, wurden Wachstumsversuche durchgeführt, aus deren Ergebnissen ein Umrechnungsfaktor für jede Algenart berechnet wurde. Die Absorptionsmessungen erfolgten bei den 72-stündigen Tests sofort nach dem Animpfen und dann in 24 h-Abständen bis zum Ende des Tests. Hierbei wurde die Absorption der Algenkulturen und der Blindproben gemessen, um das Wachstum der Kulturen und das Absorptionsverhalten der NP im Testverlauf zu überwachen. Bei den 120-stündigen Versuchen wurden ebenfalls vier Messungen vorgenommen. Diese erfolgten zu Beginn des Versuchs sowie nach 72, 96 und 120 h. Pro Kolben wurden 200 µL Algenkultur entnommen und jeweils 100 µL Probe in 96-Well-Platten überführt. Pro Replikate wurden dementsprechend zwei Messungen durchgeführt. Diese erfolgten mit dem Spark® Multimode Microplate Reader von Tecan. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 685 nm (*R. subcapitata*), 695 nm (*C. reinhardtii*) und 678 nm (*C. meneghiniana*). Die verwendeten Wellenlängen wurden den Ergebnissen der Etablierung der Absorptionsmessung entnommen (vgl. Kapitel 8.1). Von den ermittelten Messwerten der Algenkulturen wurden die Messwerte der Blindproben abgezogen, um Einflüsse der Nanomaterialien auf den Messwert zu eliminieren. Die resultierenden Absorptionswerte wurden in die entsprechenden Zellzahlen umgerechnet. Während in den durchgeführten Versuchen die Zellzahl insgesamt betrachtet wird, gibt es auch die Möglichkeit nach der Zunahme der Zellzahl oder dem durchschnittlichen Wachstumsfaktor auszuwerten. In der vorliegenden Arbeit kann die Zellzahl am Versuchsende als Endpunkt verwendet werden, da für die Versuchsorganismen jeweils die gleiche Startzellzahl eingesetzt wurde und somit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist.

Der In-vitro-Chlorophyll a-Gehalt pro Volumen Algenkultur lässt Rückschlüsse auf den Allgemeinzustand der Zellen zu. Er wird zum einen durch das Wachstum beeinflusst, da mehr Zellen in der Regel für einen höheren Chlorophyllgehalt pro Volumen Kultur sorgen. Zum anderen kann sich der Chlorophyllgehalt pro Zelle verändern und somit Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Chlorophyllproduktion geben. Der Pigmentanteil einer Zelle ermöglicht Rückschlüsse auf ihren Allgemeinzustand, wobei ein hoher Pigmentgehalt auf eine gesunde, funktionsfähige Algenzelle hindeutet.

Als weit verbreitete Pigmentklasse werden Chlorophylle von allen drei untersuchten Testorganismen gebildet, wobei die Grünalgen Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b) enthalten, während die Diatomee neben Chl a auch Chlorophyll c (Chl c) herstellt. Die Ermittlung des Chl a-Gehalts stellt somit einen sinnvollen Parameter für einen artübergreifenden Vergleich dar. Die Menge des Chl a wurde nach einer Testdauer von 72 bzw. 120 h in vitro bestimmt. Hierfür wurden jeweils 2 mL jedes Replikats bei 13 000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das zurückbleibende Zellpellet bei -80 °C eingefroren.

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts wurden die gefrorenen Pellets in 1 mL Methanol aufgetaut. Anschließend wurden die Proben 20 min lang im Ultraschallbad bei einer Leistung von 42 W/L behandelt, sodass sich das Chlorophyll im Methanol löste. Die entfärbten Zellen wurden für 10 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Von jeder Probe wurden zweimal 100 µL des Überstands entnommen und in eine 96-Well-Platte (Mikrotestplatte 96 Well, F) der Firma Sarstedt überführt. Mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät Spark® 10M (Tecan) wurde anschließend die Absorption der Proben bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Im Fall der Grünalgen *R. subcapitata* und *C. reinhardtii* wurde bei den Wellenlängen 647, 664 und 750 nm gemessen, um den Gehalt an Chl a berechnen zu können. Da bei der Kieselalge *C. meneghiniana* statt Chl b, Chl c in den Plastiden vorliegt, wurde hier die Absorption bei den Wellenlängen 630, 664 und 750 nm ermittelt. Der Chl a-Gehalt wurde anhand der Absorptionswerte bei verschiedenen Wellenlängen nach JEFFREY & HUMPHREY (1975) anhand der folgenden Formeln berechnet:

Grünalgen:

$$\text{Chl a [mg/L]} = 11,93 \times (\text{OD}_{664 \text{ nm}} - \text{OD}_{750 \text{ nm}}) - 1,93 \times (\text{OD}_{647 \text{ nm}} - \text{OD}_{750 \text{ nm}})$$

Diatomee:

$$\text{Chl a [mg/L]} = 11,47 \times (\text{OD}_{664 \text{ nm}} - \text{OD}_{750 \text{ nm}}) - 0,4 \times (\text{OD}_{630 \text{ nm}} - \text{OD}_{750 \text{ nm}})$$

Die Formeln beziehen sich auf 90 prozentiges Aceton als Lösemittel. Laut LICHTENTHALER (1987) kann auch Ethanol als Lösemittel verwendet werden, wobei keine entscheidenden Abweichungen zu Aceton zu erwarten sind.

Über die In-vivo-Messung der Chlorophyllfluoreszenz von Primärproduzenten können Parameter ermittelt werden, welche eine Beeinträchtigung des Organismus zeigen können. Das Prinzip des Tests beruht auf der Untersuchung der Effektivität der Photosynthese und von Schutzmechanismen, welche photosynthetisch aktive Organismen entwickelt haben, um sich vor Schäden durch zu hohe Lichtintensitäten zu schützen und überschüssige Lichtenergie abzuleiten. Es handelt sich um eine der am weitesten verbreiteten Methoden der Stressmessung bei Pflanzen und Algen (MAXWELL & JOHNSON, 2000).

Das Verfahren beruht darauf, dass Lichtenergie, welche auf phototrophe Organismen trifft, über insgesamt drei Wege verarbeitet werden kann. Ein Teil wird für die Photosynthese genutzt, d. h. Lichtenergie wird in chemische Energie umgewandelt. Der Rest wird in Form von Wärme und Fluoreszenz abgeleitet. Bei der photochemischen Fluoreszenzlöschung (PQ; engl.: *Photochemical quenching*) verringert sich die Fluoreszenz gegenüber dem dunkeladaptierten Zustand eines Organismus dadurch, dass die eintreffende Lichtenergie weitgehend der Photosynthese zugeführt und zur Produktion von Adenosintriphosphat und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

genutzt wird. Durch Fluoreszenz werden angeregte Chlorophyllmoleküle über die Abgabe eines Photons in ihren Grundzustand zurückgeführt. Bei der nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung (NPQ; engl.: *Non photochemical quenching*) wird überschüssige Energie über den Aufbau eines pH-Gradienten und den Xantophyll-Zyklus gelöscht. Dieser Vorgang ist mit der Abgabe von Wärme verbunden. PQ und NPQ sind lichtinduziert reguliert und benötigen daher eine gewisse Anlaufzeit in Helligkeit, bevor sie nutzbar sind.

Aus der bei verschiedenen Bedingungen gemessenen Chlorophyllfluoreszenz können unterschiedliche Parameter berechnet werden. Zwei dieser Werte wurden bezüglich des Einflusses von Nanomaterialien näher untersucht: Das Verhältnis zwischen der maximalen und variablen Fluoreszenz (F_v/F_m) spiegelt die Effektivität der Photosynthese bezogen auf Photosystem II (PS II) wieder und der NPQ-Wert lässt Rückschlüsse über den Umgang eines Organismus mit Lichtstress zu.

Die Messung der beiden Parameter erfolgte nach einer Versuchsdauer von 72 bzw. 120 h. 2,5 mL Zellkultur jedes Replikats wurden in die Vertiefung einer 24-Well-Platte überführt. Die Platten wurden vor der Messung für 10 min dunkeladaptiert, sodass alle Photosysteme in geöffnetem Zustand vorlagen. Anschließend wurde die Chlorophyllfluoreszenz mit der FluorCam 800MF von Photon Systems Instruments gemessen. Während des Messvorgangs wurde zunächst ein Messlicht mit einer Lichtintensität von $5 \mu\text{mol}/\text{s m}^2$ dauerhaft eingeschaltet. Unter diesen Bedingungen wurde die Grundfluoreszenz (F_0) gemessen. Hierbei handelt es sich um die minimale Fluoreszenz, welche auftritt, wenn die Lichtintensität zu schwach ist, um die Reaktionszentren zu erreichen. Die P 680-Reaktionszentren sind offen bzw. der zugehörige Elektronenakzeptor Q bleibt oxidiert. Die Energie des Messlichts wird somit vollständig in Form von Fluoreszenz abgegeben. Im Anschluss daran wurde ein sättigender Lichtblitz erzeugt ($>4000 \mu\text{mol}/\text{s m}^2$; 800 ms). Dieser war ausreichend lang und intensiv, um alle Reaktionszentren von PS II auszulasten und damit die primären Akzeptoren vollständig zu reduzieren. Dadurch kommt es zu einem Mangel an Elektronenakzeptoren und die Photosysteme können keine weitere Ladungstrennung durchführen. Hierdurch kann die ankommende Lichtenergie nicht mehr für die Photochemie verwendet werden und die Fluoreszenzabstrahlung ist maximal. Die Chlorophyllfluoreszenz steigt somit während des Lichtblitzes stark an. Dieses Signal stellt die maximale Fluoreszenz (F_m) dar. Die P 680-Reaktionszentren liegen in geschlossenem Zustand vor und die zugehörigen Elektronenakzeptoren Q sind vollständig reduziert. Aus den beiden gemessenen Werten F_0 und F_m kann die variable Fluoreszenz (F_v) ermittelt und daraus wiederum das Verhältnis F_v/F_m berechnet werden. Dieses gibt an, wie viel Lichtenergie für die Photosynthese verwendet werden kann. Mit abnehmendem F_v wird das Verhältnis kleiner, was anzeigt, dass ein geringerer Teil des

einfallenden Lichts für die Photosynthese genutzt wird. Bei gestressten Pflanzen können weniger geöffnete Reaktionszentren verfügbar sein, wodurch F_v/F_m abnimmt.

Nach einer Dunkelrelaxationsphase von 17 s wurde aktinisches Rotlicht ($280 \mu\text{mol/s}$) eingeschaltet, dessen Energie ausreicht, um die Photosynthese in Gang zu setzen. Ein gewisser Anteil des absorbierten aktinischen Lichts wurde durch Fluoreszenz wieder abgegeben, was in der Fluoreszenzmessung in Form einer erhöhten Basislinie erkennbar ist. 8, 18, 28, 48 und 68 s, nachdem das aktinische Licht eingeschaltet worden war, wurden fünf saturierende Lichtblitze abgegeben, welche zu einer vorübergehenden Sättigung der PQ führten und damit einen Anstieg der Chlorophyllfluoreszenz nach sich zogen. Es wurden mehrere dieser Lichtblitze erzeugt, um eine Einspielung des Systems und damit einen stabilen Zustand zu erreichen. Betrachtet wurde der letzte gemessene Wert. Dieser wird als F_m' bezeichnet und ist niedriger als die maximale Fluoreszenz. Die Differenz zwischen F_m und F_m' stellt die NPQ dar. Der Wert steht für die Fähigkeit eines photosynthetisch aktiven Organismus, sich effektiv gegen Lichtstress schützen zu können. Bei einer hohen NPQ und damit einem vergleichsweise geringen Fluoreszenzsignal während des Lichtblitzes können die Zellen viel der Energie durch Wärme abgeben und sind somit in der Regel in einem guten Allgemeinzustand.

In Abb. 32 ist der typische Verlauf einer Fluoreszenzmessung dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung der Methode ist MAXWELL & JOHNSON (2000) zu entnehmen.

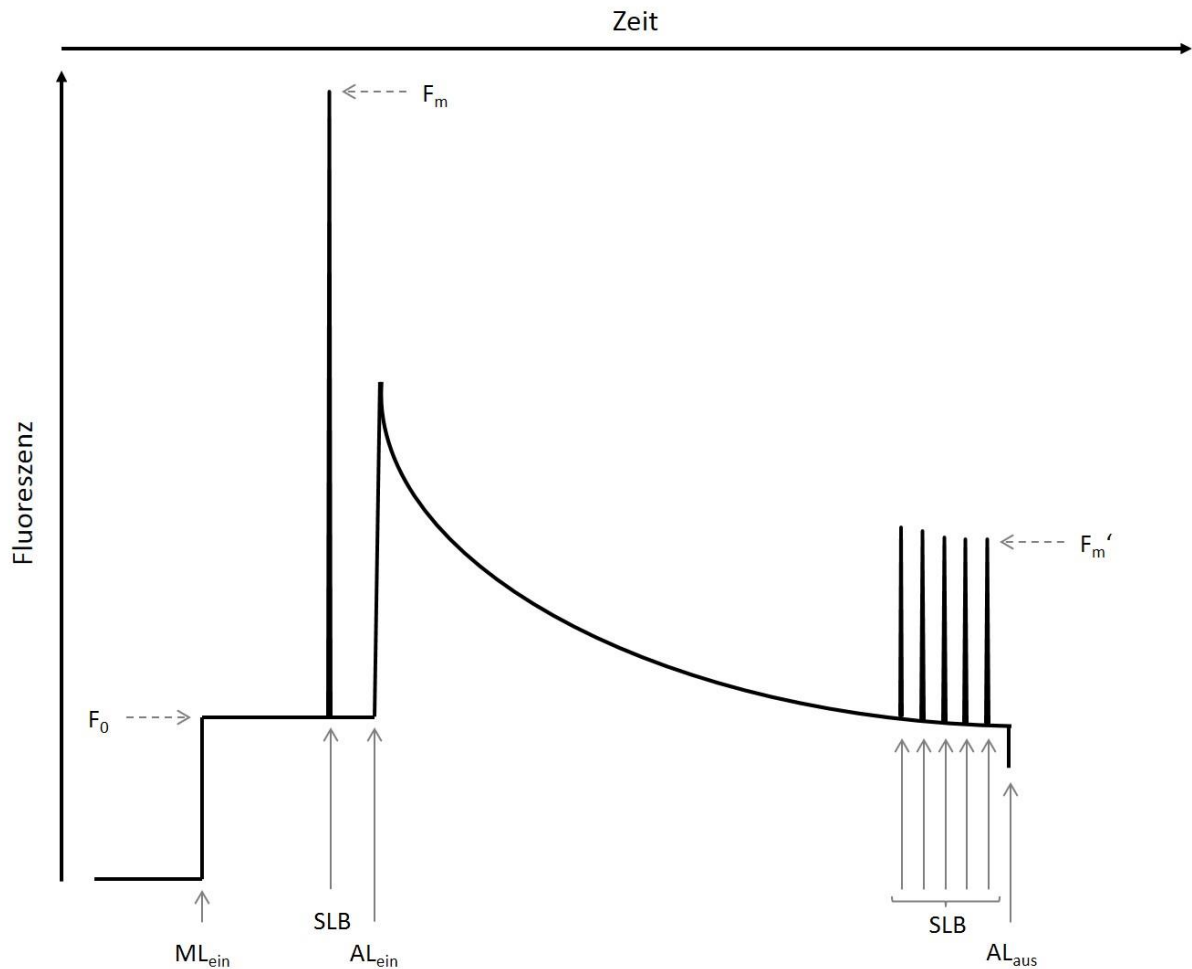


Abb. 32) Ablauf einer typischen Chlorophyllfluoreszenzmessung. ML_{ein} = Messlicht wird eingeschaltet, SLB = sättigender Lichtblitz, AL_{ein} = aktinisches Licht wird eingeschaltet, AL_{aus} = aktinisches Licht wird ausgeschaltet, F_0 = Grundfluoreszenz, F_m = maximale Fluoreszenz, F_m' = maximale Fluoreszenz bei Licht.

Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenz erfolgte mit dem Programm FluorCam7. Der F_v/F_m -Wert wurde nach GENTY et al. (1989) aus den Messwerten von F_0 und F_m berechnet:

$$F_v/F_m = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

Die NPQ wurde gemäß RUBAN (2016) anhand von F_m und F_m' ermittelt:

$$NPQ = \frac{(F_m - F_m')}{F_m'}$$

7.3.3 Elektronenmikroskopische Zelluntersuchung

Die Untersuchung der Algenzellen mit dem TEM soll zum einen Aufschluss über mögliche Effekte der NP auf die Zellstruktur geben. Zum anderen soll sie Rückschlüsse auf die Eignung der Methode zur Bewertung der Toxizität im Zusammenhang mit NP ermöglichen.

Die Algen wurden den NP gegenüber für 72 bzw. 120 h exponiert. Um Abweichungen der Zellstruktur vom Normalzustand detektieren zu können, wurden zudem parallel NK kultiviert. Es wurde in der Regel die jeweils höchste Testkonzentration aus dem Wachstumsinhibitionstest eingesetzt, da bei dieser die stärksten Effekte zu erwarten sind. Im Fall der auf Ag basierenden Nanomaterialien sowie Silbernitrat, wurde die zweithöchste Konzentration verwendet, da in der Höchsten keinerlei Wachstum der Algenkulturen nachweisbar war, für die Untersuchung mittels TEM jedoch eine gewisse Minimalmenge an Zellen benötigt wird. Für die NK sowie die PS-NP wurden jeweils zwei Kolben mit Partikeln und Algen angesetzt, um am Versuchsende eine für die Einbettung ausreichende Menge an Algenzellen zu erhalten. Bei den restlichen Nanomaterialien und der Silbernitratbehandlungsgruppe betrug die Replikatzahl vier, da anhand der Ergebnisse des Wachstumsinhibitionstests ein geringes Wachstum und somit eine geringere Zellzahl zu erwarten war. Eine Übersicht der verwendeten Konzentrationen und Replikatzahlen kann Tab. 5 entnommen werden.

Tab. 5) Übersicht über die für die elektronenmikroskopische Untersuchung eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanzen bei den drei untersuchten Algenarten.

Material	Eingesetzte Konzentration			Anzahl Replikate
	<i>R. subcapitata</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>C. meneghiniana</i>	
AgPure	27,0 ng/mL	81,0 ng/mL	1,11 µg/mL	4
Ag-COOH, Ag-NH ₂	27,0 ng/mL	243 ng/mL	3,33 µg/mL	4
AgNO ₃	27,0 ng/mL	27,0 ng/mL	0,12 µg/mL	4
TiO ₂ -n	300 µg/mL	300 µg/mL	33,3 µg/mL	4
TiO ₂ -COOH, TiO ₂ -NH ₂	300 µg/mL	300 µg/mL	100 µg/mL	4
PS-n, PS-COOH, PS-NH ₂	81,0 µg/mL	81,0 µg/mL	81,0 µg/mL	2

Die Versuchsbedingungen entsprachen jenen des Wachstumsinhibitionstests (vgl. Kapitel 7.3.2). Nach 72 bzw. 120 h wurden die Replikate jeder Behandlungsgruppe vereint und bei 8 000 rpm 5 min lang zentrifugiert (Biofuge® Primo R; Heraeus®). Der Überstand wurde entfernt und das Algenpellet in einem Fixativ bestehend aus Kulturmedium und 2,5 % Glutaraldehyd resuspendiert, welches der Vernetzung und damit Stabilisierung der Proteinen dient. Die Zellen

wurden im Fixativ 1 h lang leicht bewegt. Anschließend wurden sie wie bereits beschrieben erneut zentrifugiert und das Fixativ durch einen Waschpuffer ersetzt. Dieser bestand aus VE-Wasser, 0,05 M Natriumcacodylat und 0,4 M Saccharose. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt. Der Waschschrift mit dem Puffer wurde zweimal wiederholt.

Zur Fixierung der Lipide wurde OsO_4 verwendet. Zunächst wurden die Proben bei 4 500 rpm 3 min lang zentrifugiert (Mikrozentrifuge 12/07, VWR). Nach der Entfernung des Überstands wurden die Zellen für 3 h in Waschpuffer und 2 % OsO_4 leicht bewegt. Durch wiederholtes Zentrifugieren (5 000 rpm, 3 min), Ersetzen des Überstandes durch Puffer und Resuspendieren des Pellets wurden die Zellen zweimal gewaschen.

Um die Proben zu entwässern, wurden sie in einer aufsteigenden Ethanol-Konzentrationsreihe jeweils 20 min lang inkubiert. Der Waschpuffer bzw. die jeweils niedrigere Ethanol-Konzentration wurde hierbei mit Hilfe von Zentrifugation (3 000 rpm, 3 min) entfernt und durch die nächsthöhere ersetzt. Die eingesetzten Wasser-Ethanol-Gemische wiesen Alkoholanteile von 30, 50, 70, 90 und 100 % auf. Die Behandlung der Zellen mit reinem Ethanol wurde zweimal durchgeführt. Darauf folgten zwei Entwässerungsschritte mit Propylenoxid. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 12 h in ein 1:1-Gemisch aus Propylenoxid und dem Epoxidharz Araldit® eingelegt. Die Einbettung der Algen erfolgte in reinem Araldit. Die Zellen wurden für zwei Stunden bei guter Belüftung in das Epoxidharz eingelegt, um ein Verdampfen der Propylenoxidrückstände zu ermöglichen. Anschließend wurde frisches Araldit hinzugefügt und die Zellen mit diesem vermischt. Nach zwei weiteren Stunden wurden die Proben mindestens 48 h lang auf 60 °C erwärmt, um das Araldit auszuhärten.

Mit dem Mikrotom Ultracut S von Reichert wurden von der Technischen Assistentin Marion Basoglu anschließend Ultradünnschnitte mit einer Dicke von ca. 50 nm aus den Aralditblöcken geschnitten und auf pioloformbefilmte Single Slot Grids übertragen. Zur Verbesserung der Darstellung wurde eine Doppelkontrastierung mit Schwermetalllösungen durchgeführt. Diese beinhaltet im ersten Schritt eine 12-minütige Behandlung der Schnitte mit Uranylacetatlösung (5 % in Methanol). Anschließend wurden die Proben mit verdünntem Ethanol und Wasser gewaschen. Im zweiten Schritt erfolgte eine achtminütige Kontrastierung in Bleicitrat nach REYNOLDS (1963). Die Grids wurden anschließend mit NaOH gewaschen. Nach 1 h Trocknungsdauer konnten die Präparate mit dem Philips CM12 Transmissionselektronenmikroskop untersucht werden. Aufnahmen der Proben wurden mit der Kamera Erlangshen ES500W von Gatan gemacht.

7.3.4 Beschattungseffekt

Potenzielle, durch NP ausgelöste Effekte auf das Algenwachstum können ihren Ursprung sowohl in der möglichen Toxizität des Materials als auch in der Änderung der Lichtintensität durch die physische Anwesenheit von Partikeln in der Algenkultur haben. Besonders im Fall der PS- und TiO₂-Partikel, welche in den höchsten eingesetzten Testkonzentrationen zu einer Trübung des Mediums führten, ist ein beschattungsabhängiger Effekt in Betracht zu ziehen. Da sich während des Wachstumsinhibitionstests mitunter eine große Menge von Partikeln zwischen den Zellen und der Lichtquelle befanden, musste ausgeschlossen werden, dass potenzielle Wachstumsänderungen der Algen durch eine Abschirmung vom Licht entstanden.

Der Versuch wurde mit allen drei Testorganismen durchgeführt. Die Algen wurden in 6-Well-Platten (TC-Platte 6 Well, Standard, F) der Firma Sarstedt angezogen. Hierfür wurden die Vertiefungen der Platten jeweils mit 5 mL Medium befüllt und anschließend mit $1,9 \times 10^5$ Zellen bei *R. subcapitata*, $2,3 \times 10^5$ Zellen bei *C. reinhardtii* und 3×10^4 Zellen bei *C. meneghiniana* angeimpft. Auf diese Platten wurde jeweils eine weitere 6-Well-Platte gestapelt. In die Vertiefungen der oberen Platten wurden im Fall der NK 5 mL Medium gefüllt, der Inhalt der restlichen Vertiefungen setzte sich aus 4,8 mL Medium und 0,2 mL Medium-NP-Suspension zusammen. Diese Suspensionen waren zuvor hergestellt worden, indem die Partikel 15 min lang bei 42 W/L im Ultraschallbad behandelt und anschließend mit Medium verdünnt worden waren. Es wurde die höchste im Wachstumsinhibitionstest eingesetzte Konzentration des jeweiligen NP getestet, da diese die größte Trübung hervorrief und daher den stärksten Beschattungseffekt erwarten lässt. Die NK setzte sich aus neun, die restlichen Behandlungsgruppen aus jeweils drei Replikaten zusammen. Um die Verdunstung gering zu halten, wurden die Plattenränder mit Parafilm® (Bemis Company, USA) abgedichtet. Die Stapel wurden auf einem Schüttler fixiert, über dem ein Lichtfeld befestigt war. Die Partikel befanden sich somit zwischen der Lichtquelle und den Algen, hatten aber keinen direkten Kontakt zu den Zellen. Temperatur, Licht und Schüttelfrequenz entsprachen den in Kapitel 7.2.2 beschriebenen Haltungsbedingungen und damit dem Wachstumsinhibitionstest. Nach 72 bzw. 120 h Testdauer wurden 200 µL Kultur aus jedem Replikat entnommen und in zwei Aliquote geteilt. Die Proben wurden entsprechend der Absorptionsmessung für den Toxizitätstest untersucht.

7.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der ermittelten Daten wurde das Programm Prism 5 for Windows, Version 5.00 der Firma GraphPad Software, Inc. verwendet.

7.4.1 Etablierung der Absorptionsmessung

Um den Zusammenhang zwischen der Zellzahl und der Absorption anhand der gemessenen Werte ermitteln zu können, wurden aus den vier erzeugten Messwerten pro Parameter jeweils die MW gebildet. Die Werte wurden zunächst mit dem D'Agostino-Pearson-Omnibus-Test auf Normalverteilung untersucht. Lag diese vor, wurde die Pearson-Korrelation berechnet. Andernfalls wurde die Spearman-Korrelation ermittelt. Die jeweilige Korrelation besteht aus einem p-Wert und einem Korrelationskoeffizienten. Der p-Wert zeigt an, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Daten besteht. Der Korrelationskoeffizient Pearson r bzw. Spearman r gibt Stärke und Richtung des Zusammenhangs an. Er liegt zwischen -1 und 1, wodurch die Werte ihrem Vorzeichen entsprechend auf einen negativen oder positiven Zusammenhang hindeuten. Je weiter der Koeffizient von Null entfernt ist, desto stärker ist der Zusammenhang zwischen den Werten.

Um die Zellzahl und die Absorption ineinander umrechnen zu können, wurden die Datenpunkte einer linearen Regression unterworfen. Die resultierende Gerade beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen den Variablen Absorption und Zellzahl und wird durch eine Geradengleichung beschrieben. Um geringfügige Messungenauigkeiten auszugleichen, welche beispielsweise durch eine nicht ganz homogene Verteilung der Zellen während der Absorptionsmessung oder der Zellzählung entstehen können, wurde die Kalibriergerade durch den Ursprung gezwungen. Dies ergibt aus biologischer Sicht Sinn, da bei einer Absorptionsmessung ohne Zellen bzw. Chlorophyll keine Absorption durch relevante Komponenten zu erwarten ist und die Absorption somit gegen null gehen sollte. Durch die Vorgabe, dass die Absorption bei einer Abwesenheit von Zellen null ist, können besonders bei sehr niedrigen Absorptionen rechnerisch negative Zellzahlwerte vermieden werden.

7.4.2 Toxizitätsuntersuchung

Zellzahl und Chlorophyllgehalt

Im Fall der Zellzahl und des Chlorophyllgehalts wurden die arithmetischen MW aus den zwei Messungen eines Replikats und anschließend der arithmetische MW aller drei Replikate einer Behandlungsgruppe gebildet und die SD berechnet. Die Werte aller Behandlungsgruppen wurden mit der NK verglichen. Da die Replikatzahl zu gering war, um sie auf ihre Normalverteilung zu untersuchen, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-Test zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen verwendet.

EC₅₀, LOEC, NOEC

Zum Vergleich der Ergebnisse verschiedener Toxizitätstests bietet sich die Berechnung der mittleren effektiven Konzentration (EC₅₀) an. Der Wert wird aus einer Dosis-Wirkungskurve

abgeleitet, welche auf den Messwerten des jeweiligen Tests beruht. Die EC_{50} entspricht dabei einer Konzentration die einen halbmaximalen Effekt auslöst. Im Fall der vorliegenden Untersuchung wurde die EC_{50} für die Endpunkte Zellzahl und Chl a—Gehalt berechnet. Zur Ermittlung des EC_{50} -Werts wurden die Testkonzentrationen logarithmiert und gegen die MW der Zellzahl bzw. des Chlorophyllgehalts aufgetragen. Aus diesen Werten wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve modelliert, welche in der Regel monoton ist und einen sigmoiden Verlauf aufweist. Der Berechnung der EC_{50} -Werte wurde eine nichtlineare Regression, genauer das Modell „Dose-response – Inhibition; log(agonist) vs. Response – Variable slope“ zugrunde gelegt. Dieses Modell richtet die Steigung an den ermittelten Werten aus und versucht nicht eine Funktion mit bereits vorgegebener Steigung zwischen die Werte zu legen. Neben der EC_{50} wurden auch das 95 %-Konfidenzintervall und die Anpassungsgüte (Goodness of fit) berechnet. Wird das untere oder obere Plateau einer Dosis-Wirkungs-Kurve durch die Daten nicht abgebildet, z. B. da nur geringe Effekte auftreten, ist der ermittelte EC_{50} -Wert vergleichsweise unsicher (großes Konfidenzintervall). Zudem ist es möglich, dass die ermittelten Daten nicht dem für einen Dosis-Wirkungskurve typischen sigmoiden Verlauf folgen und somit keine entsprechende Regression durchgeführt werden kann. EC_{50} -Werte, welche nicht im untersuchten Konzentrationsbereich lagen oder für nicht signifikante Werte ermittelt wurden, wurden ebenfalls nicht berücksichtigt, da sie mit vergleichsweise großen Unsicherheiten behaftet sind.

Da aus den genannten Gründen für einige Versuche keine aussagekräftigen EC_{50} -Werte berechnet werden konnten, wurde zudem die niedrigste im jeweiligen Test verwendete Konzentration, die einen signifikant negativen Effekt auslöst (LOEC; engl.: *Lowest observed effect concentration*) sowie die höchste im Test verwendete Konzentration, bei der kein signifikant negativer Effekt nachweisbar war (NOEC; engl.: *No observed effect concentration*), angegeben. Die beiden Werte geben näherungsweise die Konzentration an, bei der frühestens Effekte auftreten bzw. die noch keine nachweisbare Wirkung auf den Testorganismus hat. Die beiden Werte sind abhängig von den eingesetzten Testkonzentrationen und lassen sich somit zwischen mehreren Versuchen nur bedingt vergleichen.

Chlorophyllfluoreszenz

Zur Messung der Chlorophyllfluoreszenzparameter F_v/F_m und NPQ aller Proben eines Versuchs wurden zwei 24-Well-Platten verwendet. Um die Werte der beiden Platten miteinander vergleichen zu können, wurden auf jeder Platte drei NK positioniert. Anschließend wurden die prozentualen Abweichungen der einzelnen Replikate vom MW der drei NK auf derselben Platte berechnet. Somit werden für die beiden Parameter keine absoluten Messwerte, sondern nur die prozentuale Veränderung im Vergleich zur NK angegeben. Die Werte der Replikate wurden

gemittelt und die SD berechnet. Unterschiede zwischen der NK und den Behandlungsgruppen wurden mit dem Mann-Whitney-Test untersucht.

7.4.3 Beschattungseffekt

Die arithmetischen MW der Absorptionsmessung der einzelnen Replikate wurden innerhalb einer Behandlungsgruppe erneut gemittelt und die SD berechnet. Über den Mann-Whitney-Test wurden Unterschiede zwischen der NK und den einzelnen Behandlungsgruppen untersucht.

8 Ergebnisse (Teil II)

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung werden als statistisch unterschiedlich betrachtet, sofern der Signifikanzwert (p-Wert) kleiner als 0,05 ist.

8.1 Umrechnung der Absorption in die Zellzahl

Die Auswertung der Absorptionsspektren der Algenkulturen ergab für *R. subcapitata* einen Maximalwert bei 685 nm. Bei *C. reinhardtii* und *C. meneghiniana* kam es bei 695 bzw. 678 nm zur maximalen Absorption. Die entsprechenden Spektren sind im Anhang (Abb. 79 bis Abb. 81) abgebildet.

Die 16 Datenpaare von Absorption und Zellzahl, welche im Fall der Grünalge *R. subcapitata* untersucht wurden, waren normalverteilt. Der lineare Zusammenhang zwischen den Parametern wurde durch den Pearson-Korrelationseffizient mit 0,9971 beschrieben und war höchst signifikant, da $p < 0,0001$ war. Die beiden Variablen standen somit in einem positiven linearen Zusammenhang. Die lineare Regression lieferte die Geradengleichung $y = 19,3x$ (

Abb. 33). Die Steigung betrug $19,3 \pm 0,47$ mit dem Bestimmtheitsmaß (r^2) = 0,9846. Das 95 %-Konfidenzintervall lag zwischen 18,3 und 20,3. Insgesamt wurden 16 Datenpaare in die Berechnung einbezogen.

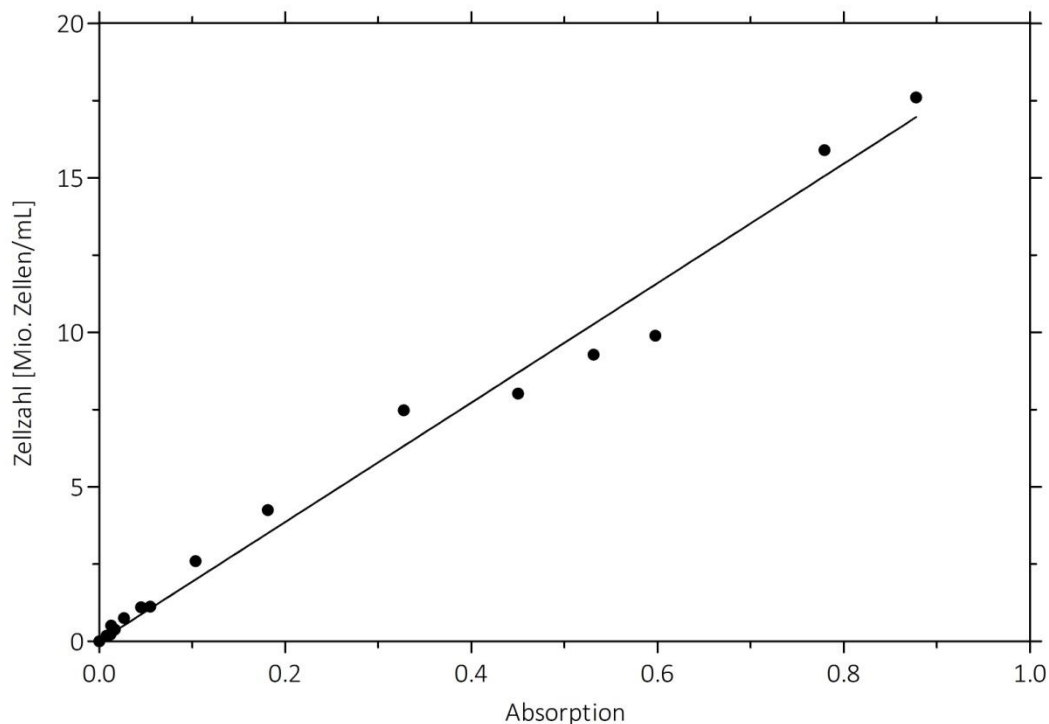


Abb. 33) Linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Zellzahl bei Zellkulturen von *R. subcapitata*.

Bei der Grünalge *C. reinhardtii* lag ebenfalls eine Normalverteilung der Daten vor ($p < 0,0001$). Der Pearson-Korrelationskoeffizient für die Parameter Zellzahl und Absorption betrug 0,9912 und war mit $p < 0,0001$ höchst signifikant. Der Zusammenhang zwischen den beiden Variablen war somit positiv linear. Durch die lineare Regression ergab sich eine Steigung der Gerade von $22,9 \pm 0,59$, ein 95 %-Konfidenzintervall zwischen 21,6 und 24,1 sowie ein r^2 -Wert von 0,9827 (Abb. 34). Die Geradengleichung lautete $y = 22,9x$. Insgesamt wurden 16 Datenpaare in die Berechnung einbezogen.

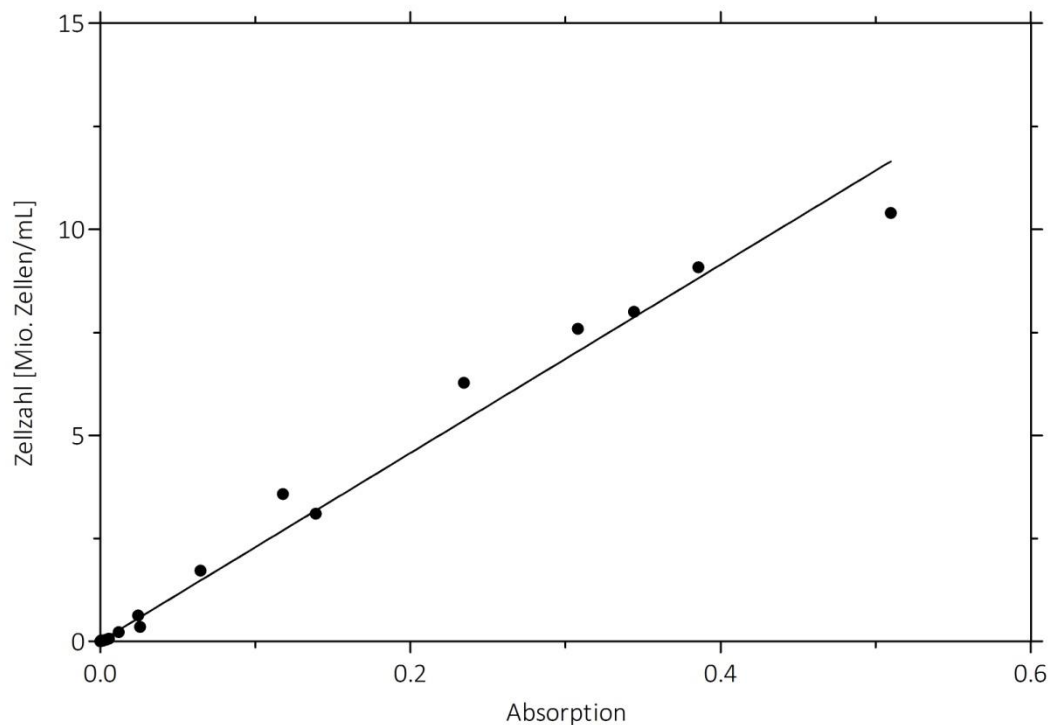


Abb. 34) Linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Zellzahl bei Zellkulturen von *C. reinhardtii*.

Die 22 Datenpaare zu Absorption und Zellzahl waren im Fall der Diatomee *C. meneghiniana* mit $p = 0,0209$ nicht normalverteilt, weshalb die nicht parametrische Spearman-Korrelation berechnet wurde. Der mit $p < 0,0001$ höchst signifikante Spearman-Rangkorrelationskoeffizient betrug 0,9977 und zeigte einen positiven Zusammenhang der Parameter. Die Steigung der Gerade, welche aus der linearen Regression resultierte, betrug $2,97 \pm 0,06$ (Abb. 35). Das Konfidenzintervall lag zwischen 2,84 und 3,10 und r^2 hatte den Wert 0,9833. Die Geradengleichung lautete $y = 2,97x$.

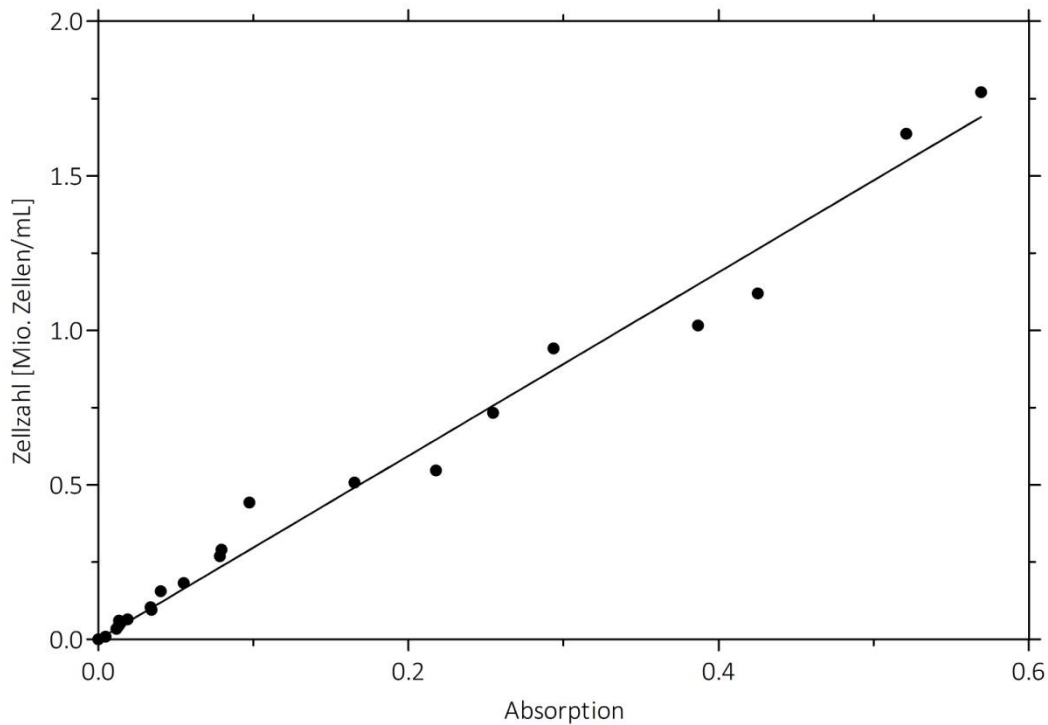


Abb. 35) Linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Zellzahl bei Zellkulturen von *C. meneghiniana*.

8.2 Beschattungseffekt

Alle durchgeführten Versuche sind aufgrund des erreichten Wachstumsfaktors von über 16 als valide anzusehen. Sowohl durch die PS- als auch die TiO₂-basierten Partikel wurde das Medium sichtbar getrübt. Dieser Effekt trat bei Konzentrationen von 81 und 27 µg PS/mL sowie bei 300 und 100 µg TiO₂/mL auf. Bei einer Ag-NP-Konzentration von 10 µg Ag/mL war eine deutliche Gelbfärbung des ASP-Mediums erkennbar. Bei den 81 ng Ag/mL, welche in den Versuchen mit den Grünalgen eingesetzt wurden, war ein solcher Effekt mit bloßem Auge nicht feststellbar.

Nach 72 h lag die Zellzahl der NK von *R. subcapitata* im Mittel bei $5,1 \times 10^6$ Zellen/mL (Abb. 36). Verglichen damit war das Wachstum der Behandlungsgruppen, welche von Ag-COOH-, TiO₂-NH₂- und PS-n-Partikeln beschattet wurden, etwas niedriger. Die restlichen Gruppen wiesen einen geringfügig höheren MW als die NK auf. Die Beschattung durch die NP hatte jedoch in den eingesetzten Konzentrationen in keinem Fall einen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl.

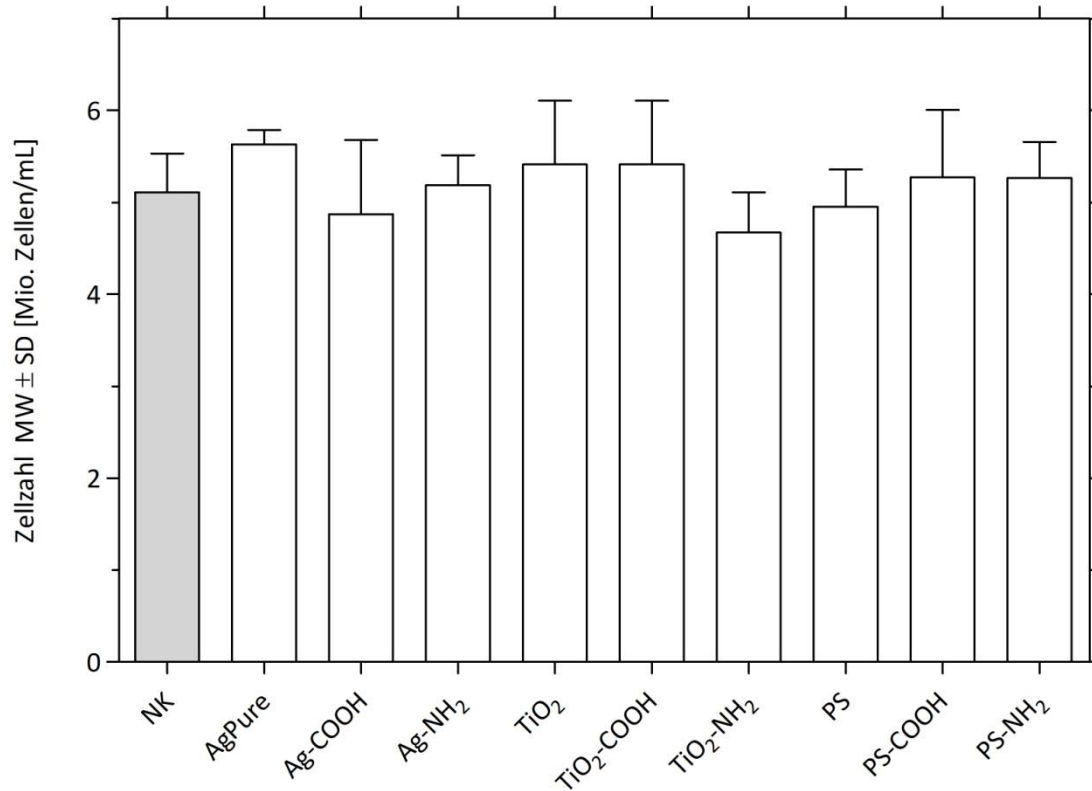


Abb. 36) Zellzahl von *R. subcapitata* nach 72 h unter Beschattung durch Nanopartikel bzw. Kulturmedium (NK). n= 3 bzw. 9 (NK); Mann-Whitney-Test.

Die Kontrollgruppe von *C. reinhardtii* erreichte nach 72 h eine Zellzahl von $4,1 \times 10^6$ Zellen/mL (Abb. 37). Minimal niedrigere MW wiesen die von Ag-COOH und TiO₂-NH₂-Partikeln beschatteten Kulturen auf. Alle anderen Behandlungsgruppen zeigten etwas höhere Zellzahlen als die NK. Ein signifikanter Einfluss der Nanomaterialien auf die Zellzahl der Behandlungsgruppen war jedoch nicht nachweisbar.

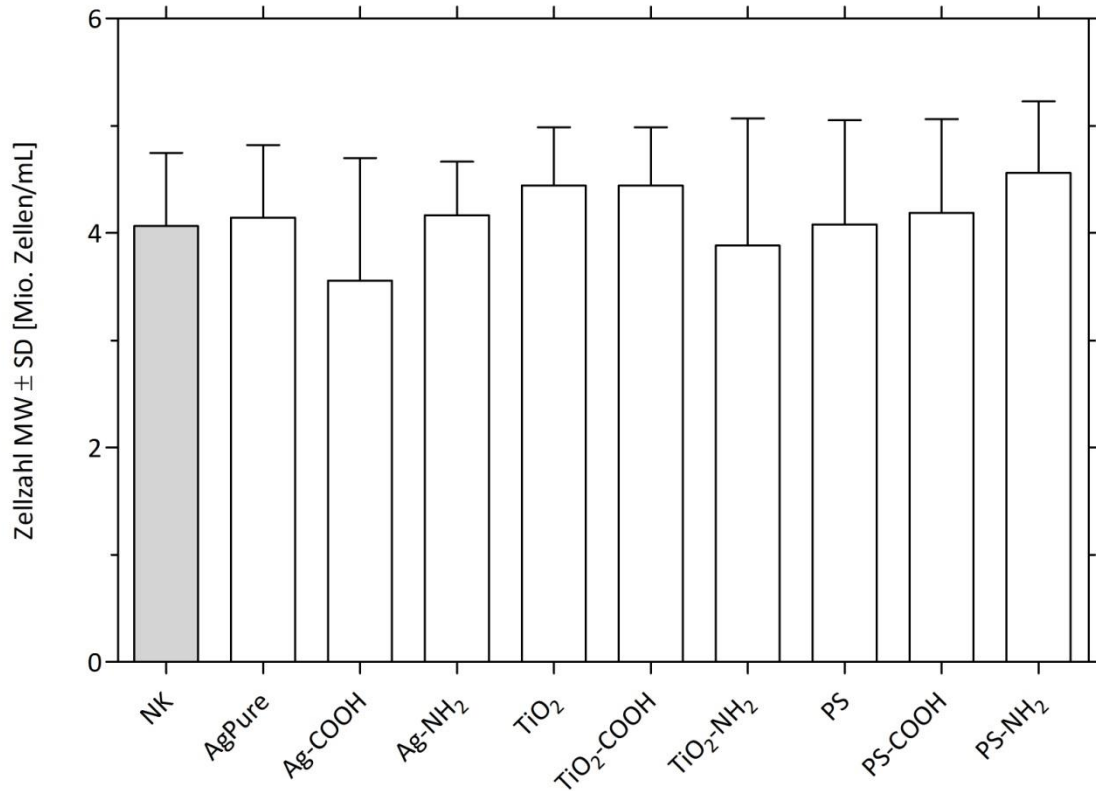


Abb. 37) Zellzahl von *C. reinhardtii* nach 72 h unter Beschattung durch Nanopartikel bzw. Kulturmedium (NK). N= 3 bzw. 9 (NK); Mann-Whitney-Test.

Die im Vergleich zu den Grünalgen langsamer wachsende Diatomee *C. meneghiniana*, erreichte in der NK innerhalb von 120 h eine Zellzahl von $5,6 \times 10^5$ Zellen/mL (Abb. 38). Die Replikate, welche durch Ag-COOH sowie jene NP, welche auf TiO₂ basierten, beschattet wurden, wiesen etwas höhere Zellzahl-MW auf. Bei allen anderen Behandlungsgruppen waren im Vergleich zur NK im Mittel minimal reduzierte Zellzahlen feststellbar. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe waren jedoch nicht statistisch signifikant.

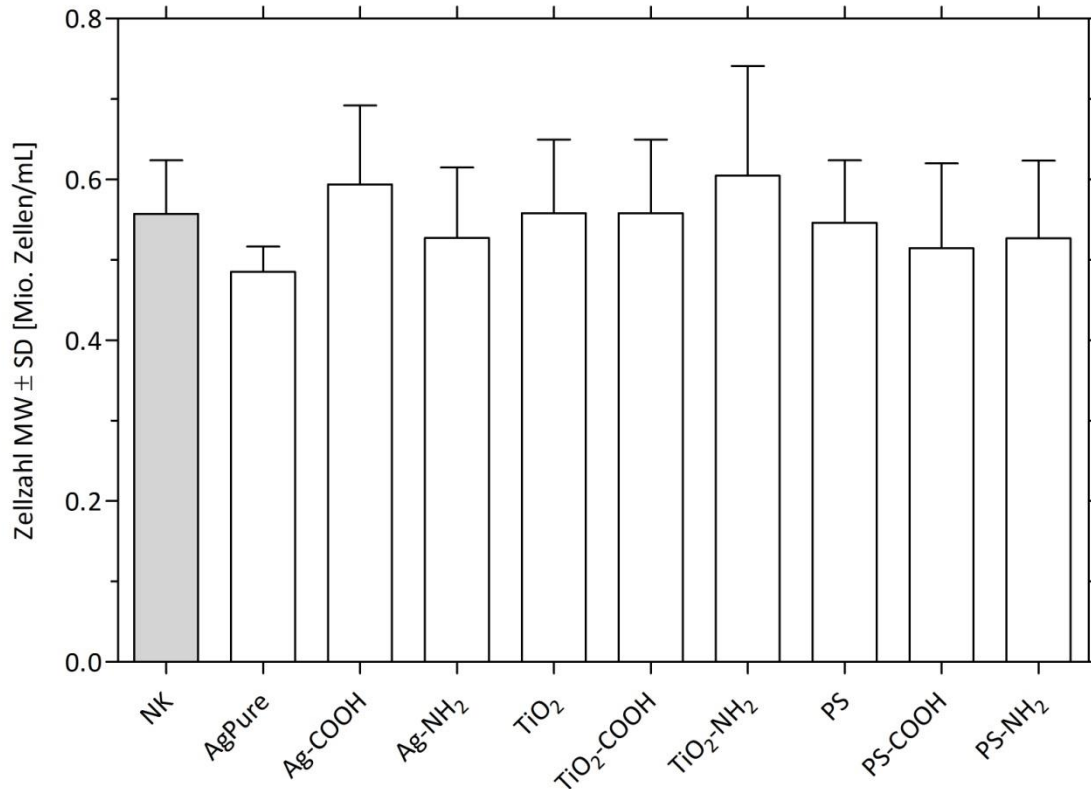


Abb. 38) Zellzahl von *C. meneghiniana* nach 120 h unter Beschattung durch Nanopartikel bzw. Kulturmedium (NK). N= 3 bzw. 9 (NK); Mann-Whitney-Test.

8.3 Toxizitätsuntersuchung

Alle abgebildeten Tests sind als valide zu werten, da der Wachstumsfaktor höher als 16 war. Im Fall der Beurteilung der Absorptionsmessung der Blindproben und der Algenkulturen während des Versuchs wurde keine statistische Auswertung vorgenommen, da die Stichprobengröße hierfür nicht geeignet war und es sich um keine Endpunkte handelte, die in die Bewertung der Toxizität eingehen. Die entsprechenden Daten sollen lediglich Hinweise darauf geben, ob die Partikel Einfluss auf absorptionsbasierte Messmethoden haben.

In einigen Fällen ergaben sich rechnerisch negative Werte für die Zellzahl, da der Wert der abgezogenen Blindprobe höher als jener der Algenkultur war. Da eine negative Zellzahl biologisch keinen Sinn ergibt, sind die entsprechenden Balken in grau statt in schwarz dargestellt. In diesen Fällen ist von einer sehr geringen Zellzahl bzw. keinerlei Wachstum im Verlauf des Versuchs auszugehen. Die Balken zeigen keinen biologischen Effekt, sondern dienen zur Abschätzung der Anwendbarkeit der verwendeten Methode.

8.3.1 Silber-Nanopartikel und Silbernitrat

Die Tests mit den Ag-Nanomaterialien und dem Silbernitrat wurden auf Grundlage von Vorversuchen in Abhängigkeit von der Algenart mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. So lag der Silbergehalt bei Versuchen mit *C. meneghiniana* zwischen 10 und 0,12 µg Ag/mL und mit *R. subcapitata* zwischen 81 und 1 ng Ag/mL. Im Fall von *C. reinhardtii* wurde für alle silberhaltigen Testsubstanzen mit Ausnahme der Ag-NH₂ der gleiche Konzentrationsbereich wie für die andere Grünalge (81 – 1 ng Ag/mL) gewählt. In Bezug auf die aminierten Ag-NP wurden Konzentrationen zwischen 243 und 3 ng Ag/mL untersucht. Bei allen Versuchen betrug der Faktor zwischen den Konzentrationen jeweils drei (vgl. Kapitel 7.3.2, Tab. 4).

AgPure

Absorption der Blindproben sowie der testsubstanzexponierten Algenkulturen

Die Testsubstanz in Algen-Medium ohne Algenzellen stellte die Blindprobe dar. Hierbei wurden Messungen von jeder im Test eingesetzten Konzentration vorgenommen. Die testsubstanzexponierten Algenkulturen enthielten neben Algenzellen auch die Testsubstanz.

Im Bristol-Medium war hinsichtlich der Absorption zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied der Blindprobe zur Messung des reinen Mediums erkennbar (Abb. 39a, Abb. 40a). Die Werte lagen für alle Behandlungsgruppen und Messungen zwischen 0,15 und 0,16. Die Proben, welche Algen enthielten, wiesen von Versuchsbeginn an eine höhere Absorption im Vergleich zu den jeweiligen Blindproben auf und die Absorptionswerte stiegen mit der Zeit an (Abb. 39b, Abb. 40b). Je höher die Konzentration der Testsubstanz war, desto geringer fiel der Anstieg aus. Hierbei waren für *R. subcapitata* deutlichere Abstufungen anhand der eingesetzten Konzentrationen zu erkennen als dies für *C. reinhardtii* der Fall war.

Im ASP-Medium war die Absorption der höchsten getesteten NP-Konzentration (10 µg Ag/mL) während der ersten Messung mit 0,24 erkennbar höher als bei den übrigen Behandlungsgruppen (0,15 bis 0,16). Sie nahm im Versuchsverlauf leicht ab und befand sich zum Ende des Versuchs nur noch minimal über dem Niveau der anderen Behandlungsgruppen (Abb. 41a). Auch unter Anwesenheit der Algenzellen war der Absorptionswert der Probe bei einer NP-Konzentration von 10 µg Ag/mL zunächst höher als bei den übrigen Behandlungsgruppen und sank anschließend ebenfalls mit der Zeit ab, bis sich bei Versuchsende eine ähnliche Absorption wie bei der Behandlungsgruppe mit 3,33 µg Ag/mL einstellte (Abb. 41b). Davon abgesehen stiegen die Absorptionswerte der übrigen Behandlungsgruppen in negativer Abhängigkeit von der NP-Konzentration unterschiedlich stark mit der Zeit an.

Zellzahl

Bei allen drei untersuchten Algenarten war die Zellzahl am Versuchsende bei den höheren Ag-Konzentrationen signifikant gegenüber der NK reduziert (Abb. 39c, Abb. 40c, Abb. 41c). Bei *R. subcapitata* und *C. meneghiniana* umfasste dies jeweils die drei höchsten Konzentrationen (81 – 9 ng Ag/mL bzw. 10 – 1,11 µg Ag/mL), bei *C. reinhardtii* war lediglich die allerhöchste Konzentration (81 ng Ag/mL) betroffen. Im Versuch mit der Kieselalge war zudem die Zellzahl der LK signifikant gegenüber der NK erhöht.

Chlorophyllgehalt

Der Chlorophyllgehalt war bei allen drei Organismen bei den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen (81 und 27 ng Ag/mL bei den Grünalgen bzw. 10 und 3,33 µg Ag/mL bei der Diatomee) signifikant reduziert und bei *R. subcapitata* und *C. meneghiniana* zusätzlich in der dritthöchsten Konzentration (9,0 ng Ag/mL bzw. 1,11 µg Ag/mL). Im Versuch mit der Diatomee zeigte zudem die LK eine signifikante Zunahme des Chl a-Gehalts gegenüber der NK (Abb. 39d, Abb. 40d, Abb. 41d).

Chlorophyllfluoreszenz

Bei allen untersuchten Algen zeigten sich signifikante Verringerungen der F_v/F_m -Werte gegenüber der NK, wobei *C. reinhardtii* lediglich bei der höchsten Konzentration (81 ng Ag/mL) betroffen war, während die beiden übrigen Algen auch Effekte bei der jeweils zweithöchsten Konzentration zeigten (81 und 27 ng Ag/mL für *R. subcapitata* bzw. 10 und 3,33 µg Ag/mL für *C. meneghiniana*) (Abb. 39e, Abb. 40e, Abb. 41e).

Alle Algenkulturen wiesen bei den höheren Ag-Konzentrationen signifikant verringerte NPQ-Werte im Vergleich zur NK auf (Abb. 39f, Abb. 40f, Abb. 41f). Bei *R. subcapitata* trat dieser Effekt bei den höchsten drei (81 – 9 ng Ag/mL) und bei *C. meneghiniana* bei den höchsten beiden Konzentrationen (10; 3,33 µg Ag/mL) auf. In Bezug auf *C. reinhardtii* zeigte sich nur bei der höchsten Konzentration (81 ng Ag/mL) eine Reduktion.

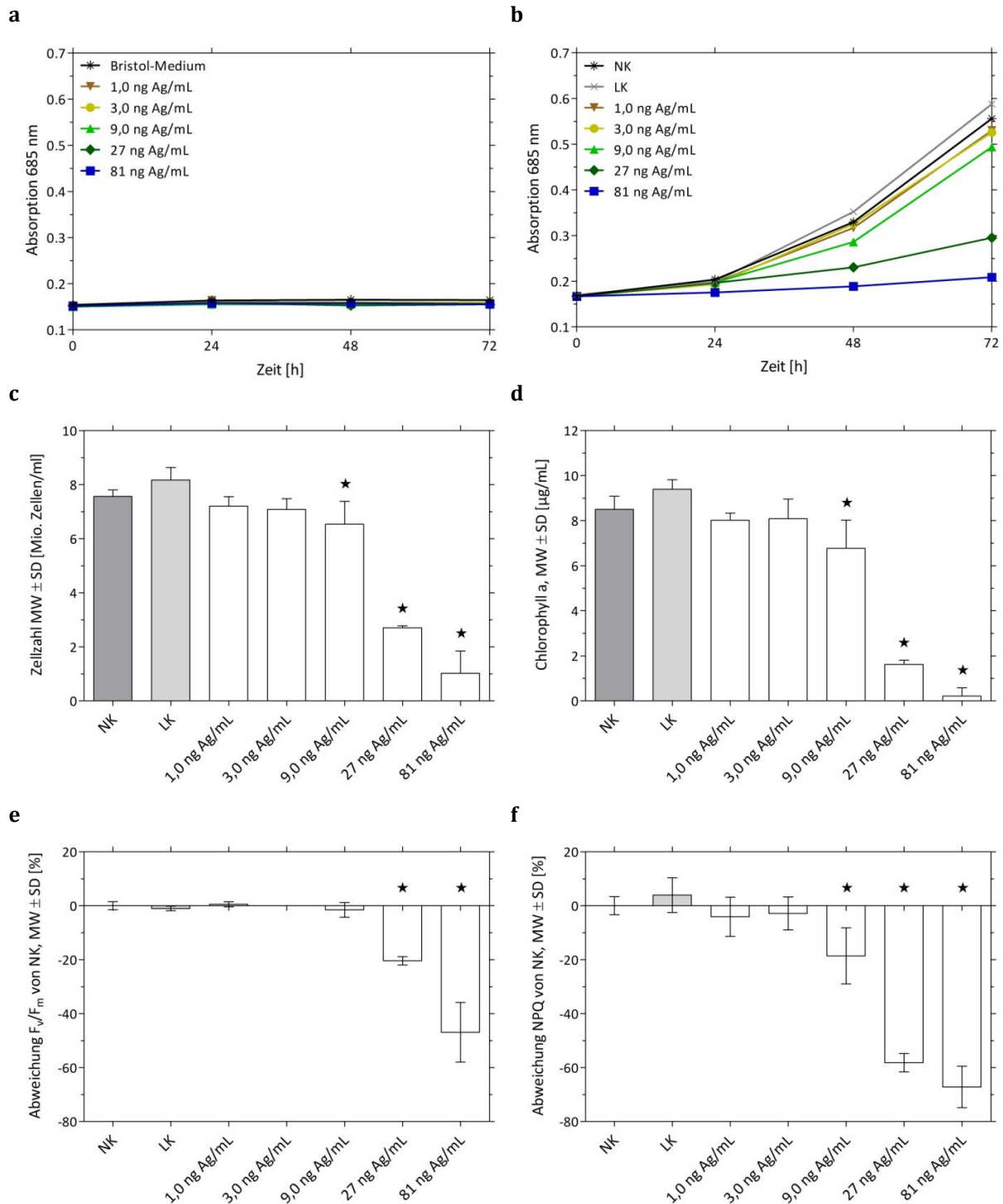


Abb. 39) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung mit *R. subcapitata* und AgPure. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

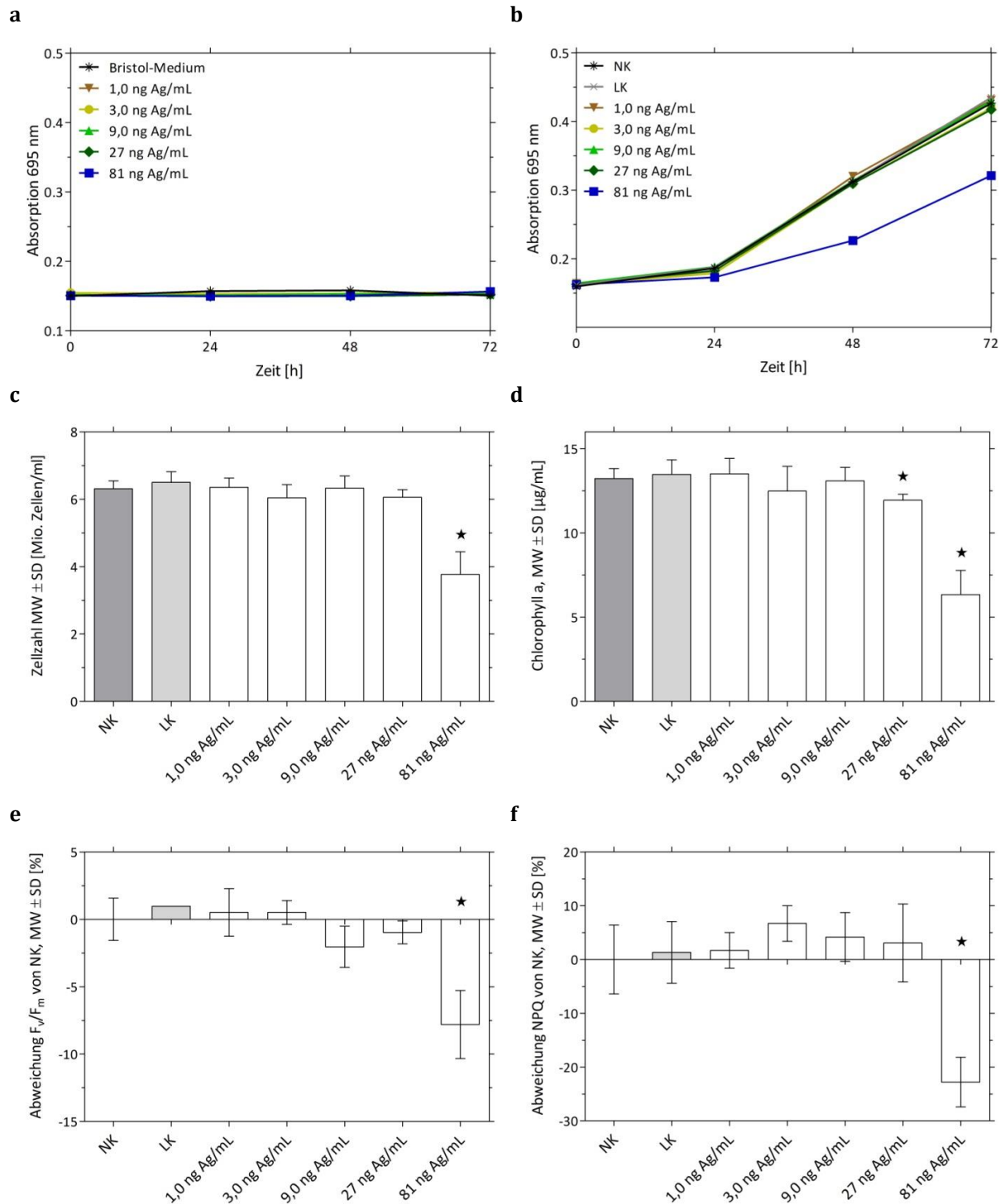


Abb. 40) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung mit *C. reinhardtii* und AgPure. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl \pm SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt \pm SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK \pm SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK \pm SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

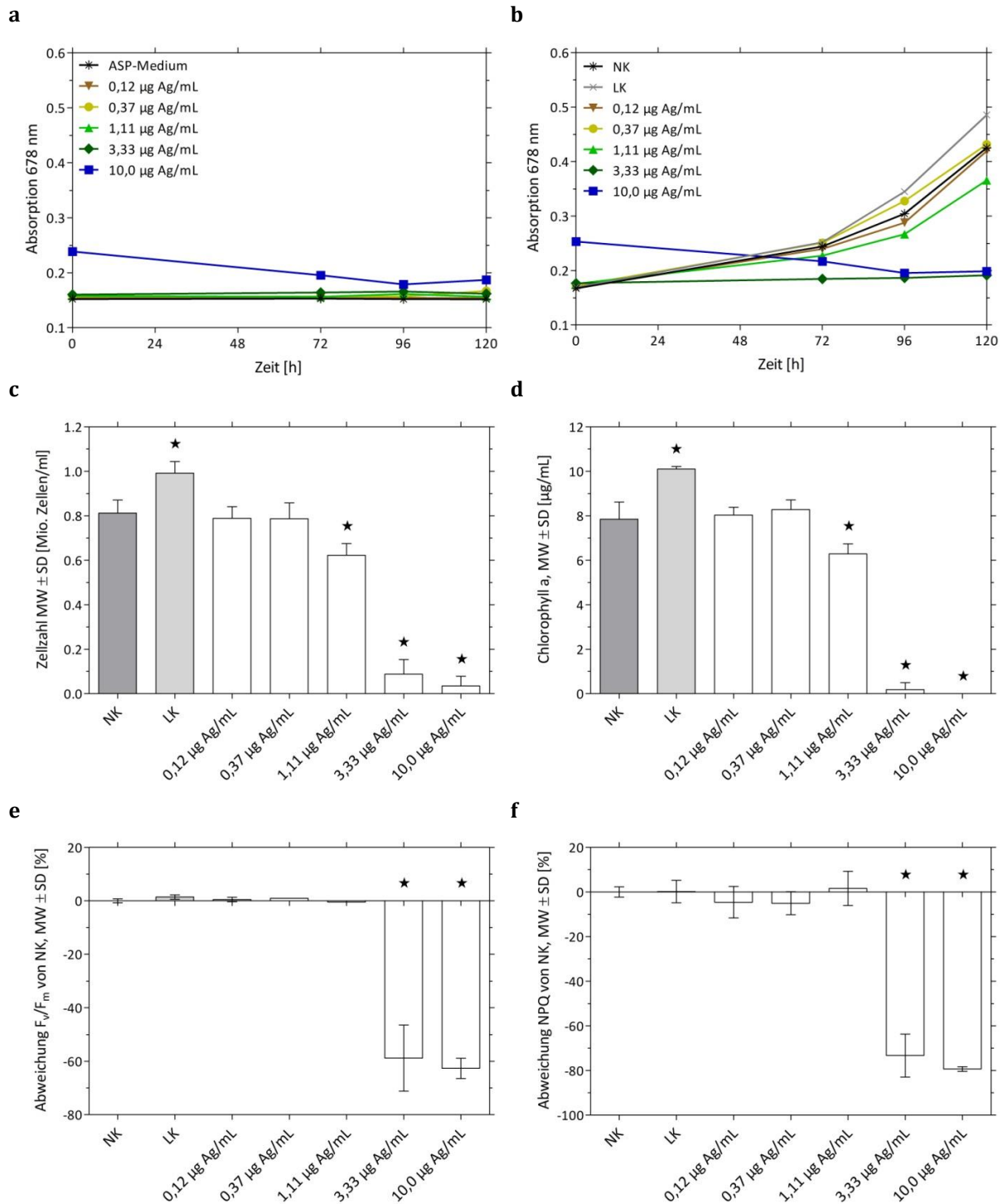


Abb. 41) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung mit *C. meneghiniana* und AgPure. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 120 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 120 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 120 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 120 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m-Werts von der NK ± SD nach 120 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 120 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

Ag-COOH

Absorption der Blindproben sowie der testsubstanzexponierten Algenkulturen

Im Bristol-Medium war hinsichtlich der Absorption zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied der Nanopartikelbehandlungen zur Messung des reinen Mediums erkennbar (Abb. 42a, Abb. 43a). Die Werte lagen bei allen Behandlungsgruppen zwischen 0,15 und 0,16. Die Proben, welche Algen enthielten, wiesen im Vergleich mit der jeweiligen Blindprobe eine höhere Absorption auf und die Werte stiegen im Versuchsverlauf an. Dabei war mit zunehmender NP-Konzentration eine Verringerung der Zunahme feststellbar (Abb. 42b, Abb. 43b). Für *R. subcapitata* waren diesbezüglich deutlichere Abstufungen anhand der eingesetzten Konzentrationen zu erkennen als dies für *C. reinhardtii* der Fall war.

Im ASP-Medium war die Absorption bei den beiden höchsten getesteten NP-Konzentrationen (10 und 3,33 µg Ag/mL) während der ersten Messung mit 0,35 und 0,22 erkennbar höher als beim reinen Medium (0,15), nahm über die Zeit jedoch wieder ab (Abb. 44a). Am Versuchsende wich nur noch der Absorptionswert der Behandlungsgruppe der höchsten Konzentration (10 µg Ag/mL) erkennbar von den übrigen Behandlungsgruppen und der NK ab. Auch unter der Anwesenheit von Algen waren die gemessenen Absorptionswerte bei den beiden höchsten NP-Konzentrationen (10 und 3,33 µg Ag/mL) zu Beginn des Versuchs höher als bei den restlichen Behandlungsgruppen (Abb. 44b). Bei der höchsten Konzentration sank die Absorption im Versuchsverlauf ab, bis ungefähr das Niveau der übrigen Behandlungsgruppen zu Beginn des Versuchs erreicht wurde. In Bezug auf die zweithöchste Konzentration erfolgte zunächst eine leichte Abnahme des Absorptionswerts, die gegen Ende des Versuchs in eine leichte Zunahme überging. Davon abgesehen stiegen die Absorptionswerte der übrigen Behandlungsgruppen in diesem Versuch mit der Zeit an, wobei die Zunahme mit steigender NP-Konzentration geringer ausfiel.

Zellzahl

In den Behandlungsgruppen mit NP traten bei allen untersuchten Algenarten signifikante Reduktionen der Zellzahl auf, welche mit der Konzentration der Ag-COOH zunahmen (Abb. 42c, Abb. 43c, Abb. 44c). Bei *R. subcapitata* war dies bei allen Konzentrationen (81 – 1 ng Ag/mL) erkennbar, wobei der Wert bei der zweitniedrigsten Konzentration (3 ng Ag/mL) nicht signifikant reduziert war. In Bezug auf *C. reinhardtii* war nur die Behandlungsgruppe der höchsten Konzentration (81 ng Ag/mL) von der Zellzahlreduktion betroffen.

In dem Versuch mit *C. meneghiniana* war in einem Replikat der zweithöchsten NP-Konzentration (3,33 µg Ag/mL) kein Zuwachs an Zellen im Vergleich zum Versuchsbeginn feststellbar. Die Werte dieser Probe wurden daher nicht in die statistische Auswertung einbezogen, sodass die

dargestellten Ergebnisse für alle Endpunkte nur auf zwei Replikaten beruhen. Bei der Art traten bei der höchsten und mittleren Konzentration (10 bzw. 1,11 µg Ag/mL) signifikante Verringerungen der Zellzahl auf. Der MW der zweithöchsten Konzentration lag zwar zwischen den beiden Werten, war jedoch nicht signifikant. Bei der höchsten NP-Konzentration ergab sich rechnerisch eine negative Zellzahl.

Chlorophyllgehalt

Bei hohen NP-Konzentrationen wies der Chlorophyllgehalt bei den untersuchten Algenarten eine signifikante Reduktion gegenüber der NK auf (Abb. 42d, Abb. 43d, Abb. 44d). In Bezug auf *R. subcapitata* und *C. meneghiniana* traf dies auf die drei höchsten NP-Konzentrationen (81 – 9 ng Ag/mL bzw. 10 – 1,11 µg Ag/mL) zu. *C. reinhardtii* zeigte dahingehend nur bei der höchsten Konzentration (81 ng Ag/mL) eine Abweichung von der NK.

Chlorophyllfluoreszenz

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz ließ in Bezug auf *R. subcapitata* sowohl beim F_v/F_m -Wert als auch bei der NPQ signifikante Reduktionen gegenüber der NK erkennen, wobei die drei bzw. beiden höchsten Konzentrationen betroffen waren (81; 27; 9 ng Ag/mL) (Abb. 42e, f). Bei den beiden niedrigsten NP-Konzentrationen (3; 1 ng Ag/mL) kam es zudem in Bezug auf den F_v/F_m -Wert zu einer signifikanten Zunahme um wenige Prozent.

Im Versuch mit *C. reinhardtii* war eine signifikante Reduktion des F_v/F_m -Werts bei der höchsten NP-Konzentration (81 ng Ag/mL) erkennbar (Abb. 43e). Bei der NPQ trat bei dieser Konzentration hingegen eine deutliche und signifikante Erhöhung gegenüber der NK auf (Abb. 43f). Auch die LK zeigte eine signifikante Zunahme der NPQ.

Bezüglich *C. meneghiniana* war eine Messung der Fluoreszenz bei der Behandlungsgruppe, welche der höchsten NP-Konzentration (10 µg Ag/mL) ausgesetzt war, nicht möglich, da sie unterhalb des detektierbaren Minimums lag. Bei dieser Konzentration wurden somit keine Messwerte für die Stressparameter generiert. Der F_v/F_m -Wert war bei der mittleren und zweitniedrigsten NP-Konzentration (1,11; 0,37 µg Ag/mL) signifikant reduziert, wobei die Abweichung von der NK weniger als 2 % betrug (Abb. 44e). Die NPQ war bei der mittleren NP-Konzentration gegenüber der NK signifikant erhöht (Abb. 44f).

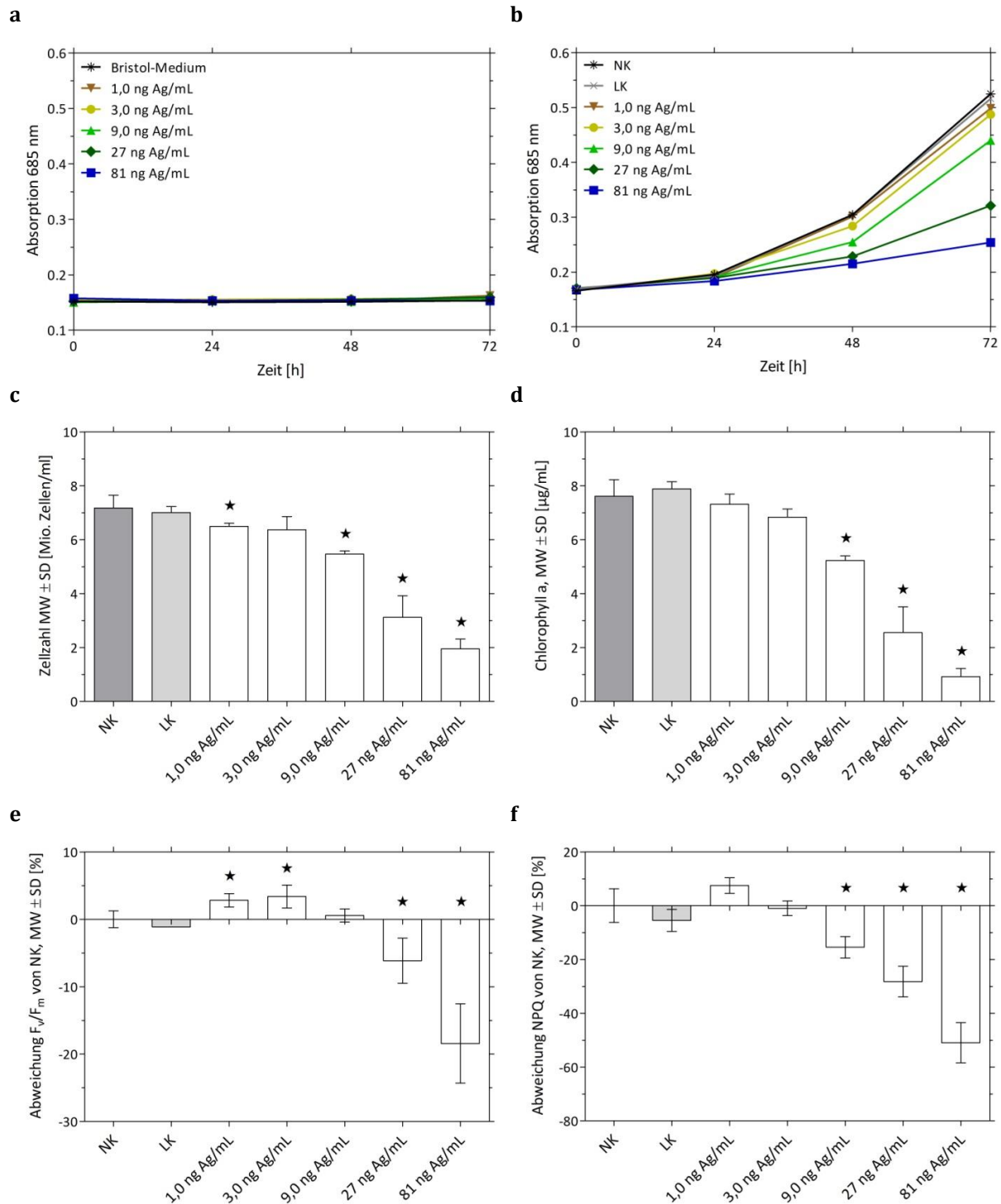


Abb. 42) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung mit *R. subcapitata* und Ag-COOH. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl \pm SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt \pm SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK \pm SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK \pm SD nach 72 h. $n = 6$ (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

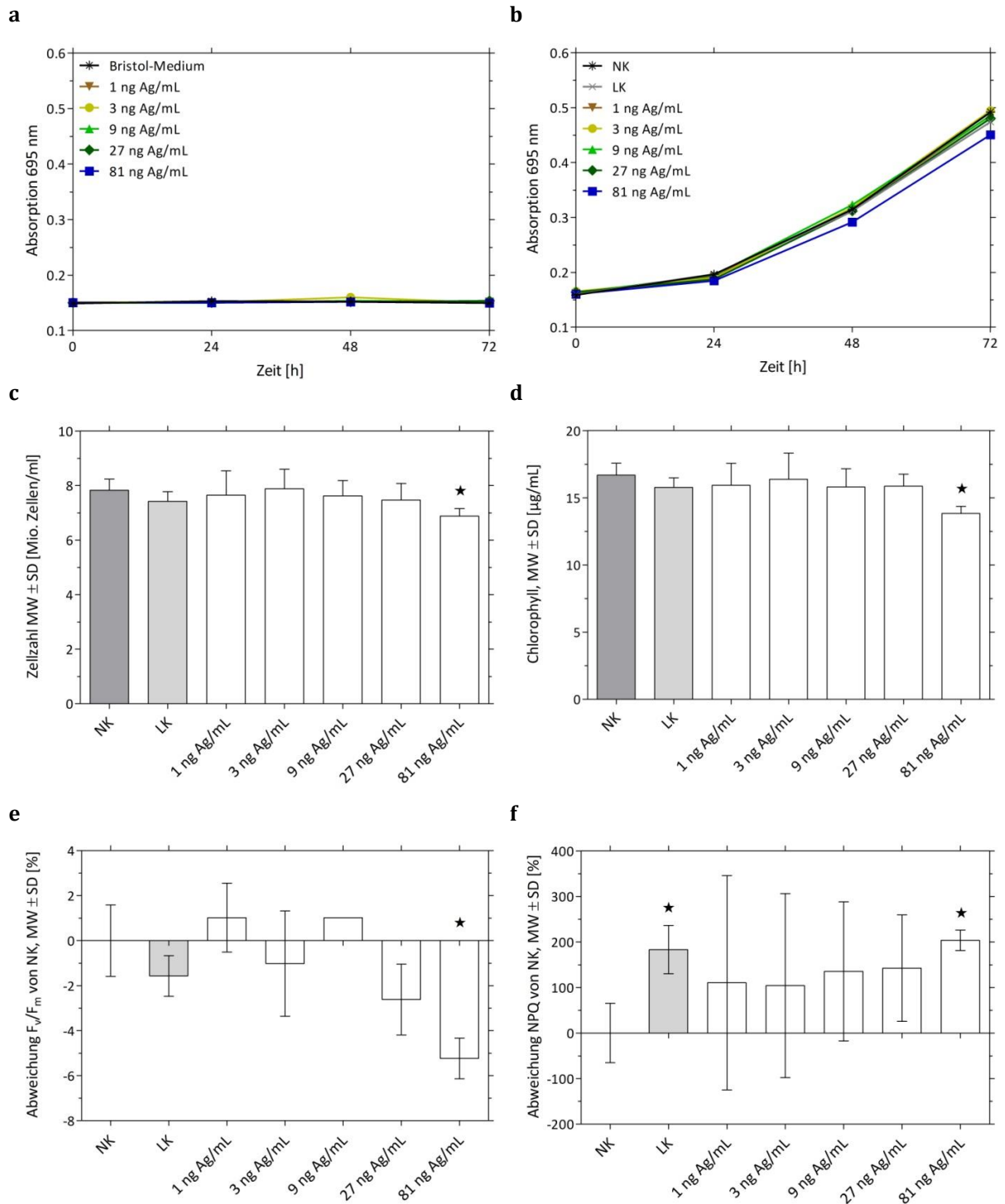


Abb. 43) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung mit *C. reinhardtii* und Ag-COOH. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

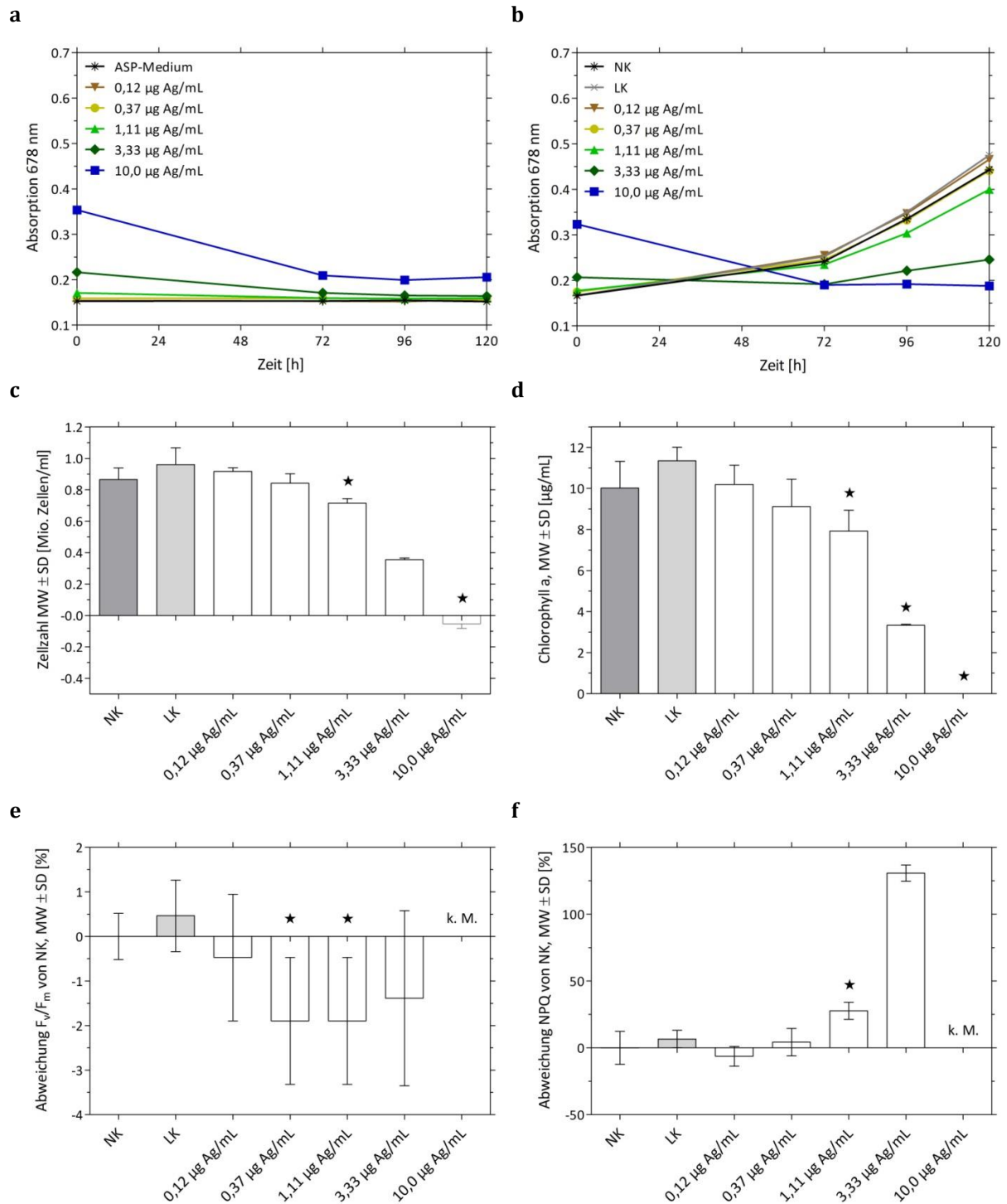


Abb. 44) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung mit *C. meneghiniana* und Ag-COOH. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 120 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 120 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 120 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 120 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 120 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 120 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

Ag-NH₂

Absorption der Blindproben sowie der testsubstanzexponierten Algenkulturen

In Bezug auf die Absorption der NP im Bristol-Medium war keine Abweichung von den Messwerten des reinen Mediums erkennbar (Abb. 45a, Abb. 46a). Die Proben erreichten Werte von 0,15 bis 0,16. Waren zusätzlich Algenzellen im Medium vorhanden, war die Absorption zu Versuchsbeginn verglichen mit den Blindproben etwas höher und stieg im Versuchsverlauf an, wobei die Stärke der Zunahme mit der NP-Konzentration abnahm (Abb. 45b, Abb. 46b).

Im ASP-Medium war die Absorption der Blindprobe der höchsten NP-Konzentration (10 µg Ag/mL) zu Versuchsbeginn mit 0,21 erkennbar höher als beim reinen Medium und den übrigen Behandlungen. Bei diesen traten im gesamten Versuch Absorptionswerte zwischen 0,15 und 0,17 auf. Im Verlauf des Versuchs sank der Wert bei der höchsten Konzentration bis er nur noch knapp oberhalb des Niveaus der restlichen Behandlungen lag (Abb. 47a). In den Proben, welche Algen enthielten, war die Absorption bei der höchsten NP-Konzentration zu Beginn des Versuchs erkennbar höher als bei den übrigen Behandlungen und sank im Versuchsverlauf auf deren Anfangsniveau (Abb. 47b). Die Absorptionswerte der übrigen Behandlungsgruppen stiegen in negativer Abhängigkeit von der NP-Konzentration mit der Zeit an.

Zellzahl

R. subcapitata zeigte bei der höchsten NP-Konzentration (81 ng Ag/mL) eine signifikante Reduktion der Zellzahl gegenüber der NK (Abb. 45c). In Bezug auf die Diatomee waren die Zellzahl-MW bei den vier höchsten NP-Konzentrationen (10 – 0,37 µg Ag/mL) gegenüber der NK signifikant verringert (Abb. 47c). Im Versuch mit *C. reinhardtii* traten hinsichtlich der Zellzahl keine signifikanten Abweichungen von der NK auf (Abb. 46c).

Chlorophyllgehalt

Der Chl a-Gehalt war im Versuch mit *R. subcapitata* bei den beiden höchsten (81; 27 ng Ag/mL) und bei *C. meneghiniana* bei den vier höchsten Konzentrationen (10 – 0,37 µg Ag/mL) signifikant gegenüber der NK reduziert (Abb. 45d, Abb. 47d). Im Versuch mit *C. reinhardtii* traten keine signifikanten Abweichungen des Chl a-Gehalts von der Kontrolle auf (Abb. 46d).

Chlorophyllfluoreszenz

Die Ergebnisse für *C. reinhardtii* ließen weder in Bezug auf F_v/F_m noch die NPQ signifikante Abweichungen von der NK erkennen (Abb. 46e, f). Während *R. subcapitata* bei der zweithöchsten NP-Konzentration (27 ng Ag/mL) eine signifikante Erhöhung des F_v/F_m -Werts um knapp 3 % zeigte, waren die MW bei den vier höchsten NP-Konzentrationen der Kieselalge (10 – 0,37 µg Ag/mL) signifikant reduziert (Abb. 45e, Abb. 47e).

Bezüglich der NPQ-Werte war bei *R. subcapitata* eine signifikante Reduktion bei den niedrigsten drei Konzentrationen (9 – 1 ng Ag/mL) sichtbar (Abb. 45f). Bei *C. meneghiniana* wiesen die Behandlungsgruppen, welche gegenüber den vier höchsten NP-Konzentrationen (10 – 0,37 µg Ag/mL) exponiert worden waren, signifikant erhöhte Werte auf (Abb. 47f).

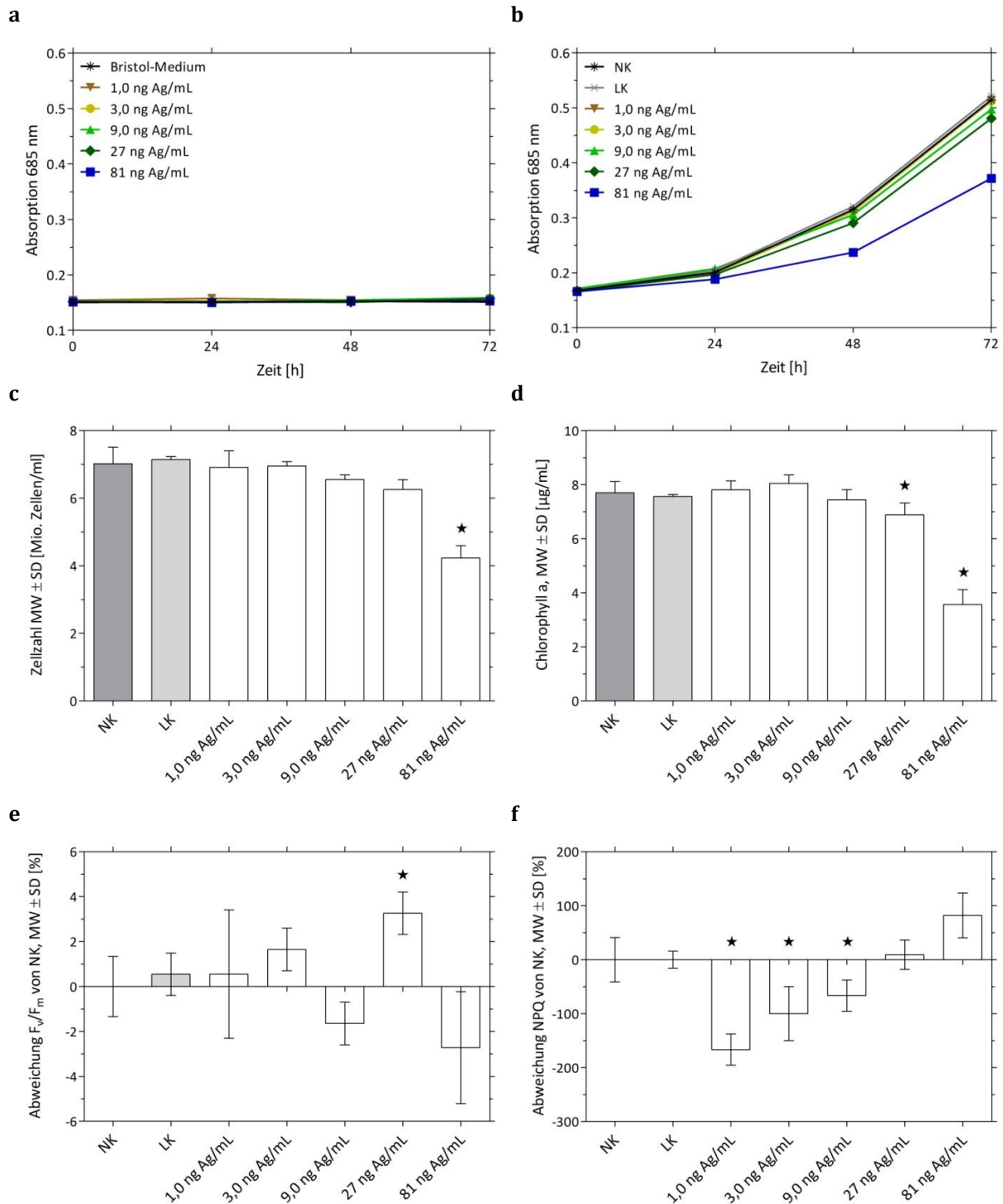


Abb. 45) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *R. subcapitata* und Ag-NH₂. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m-Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

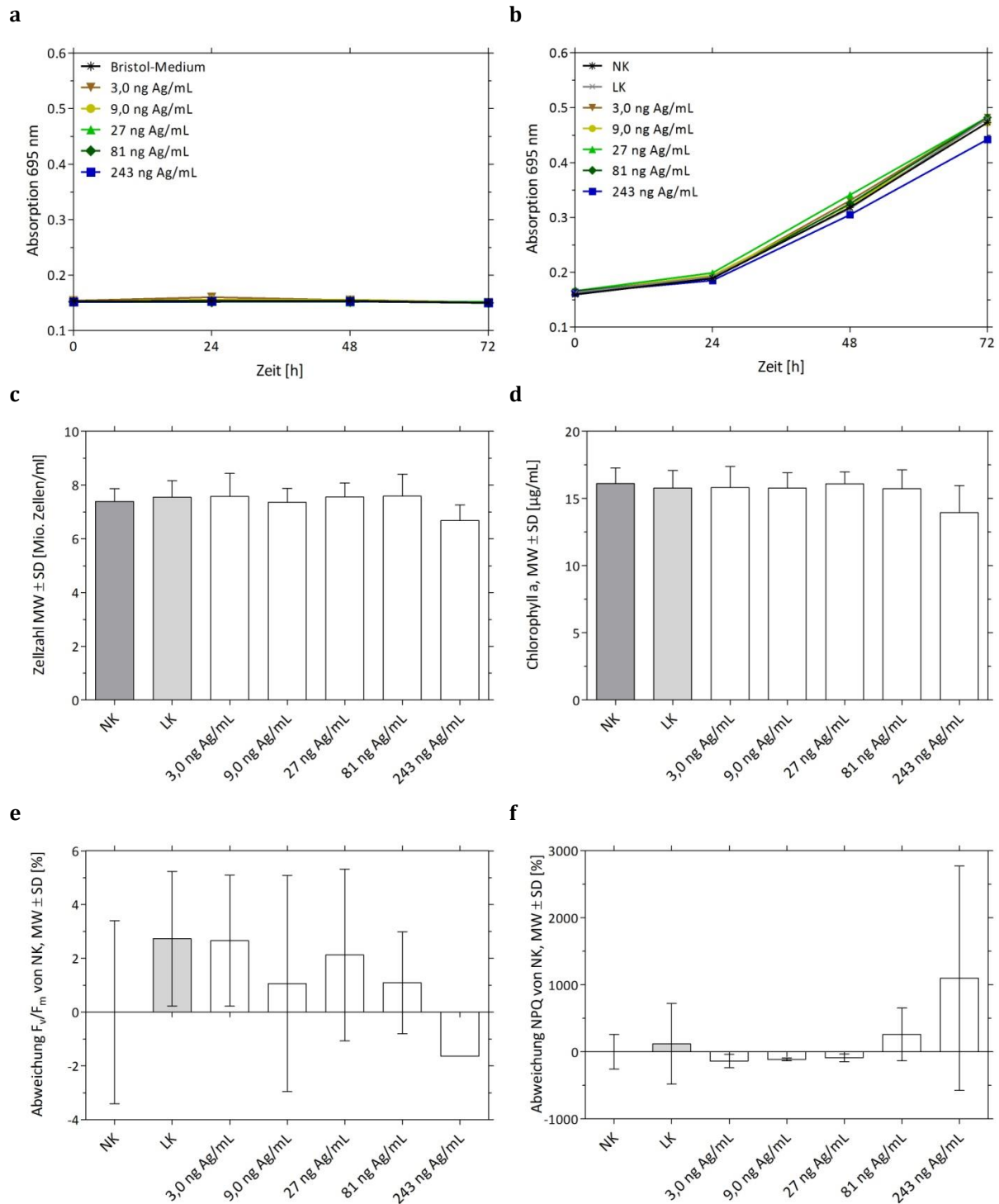


Abb. 46) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. reinhardtii* und Ag-NH₂. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl \pm SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt \pm SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK \pm SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK \pm SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

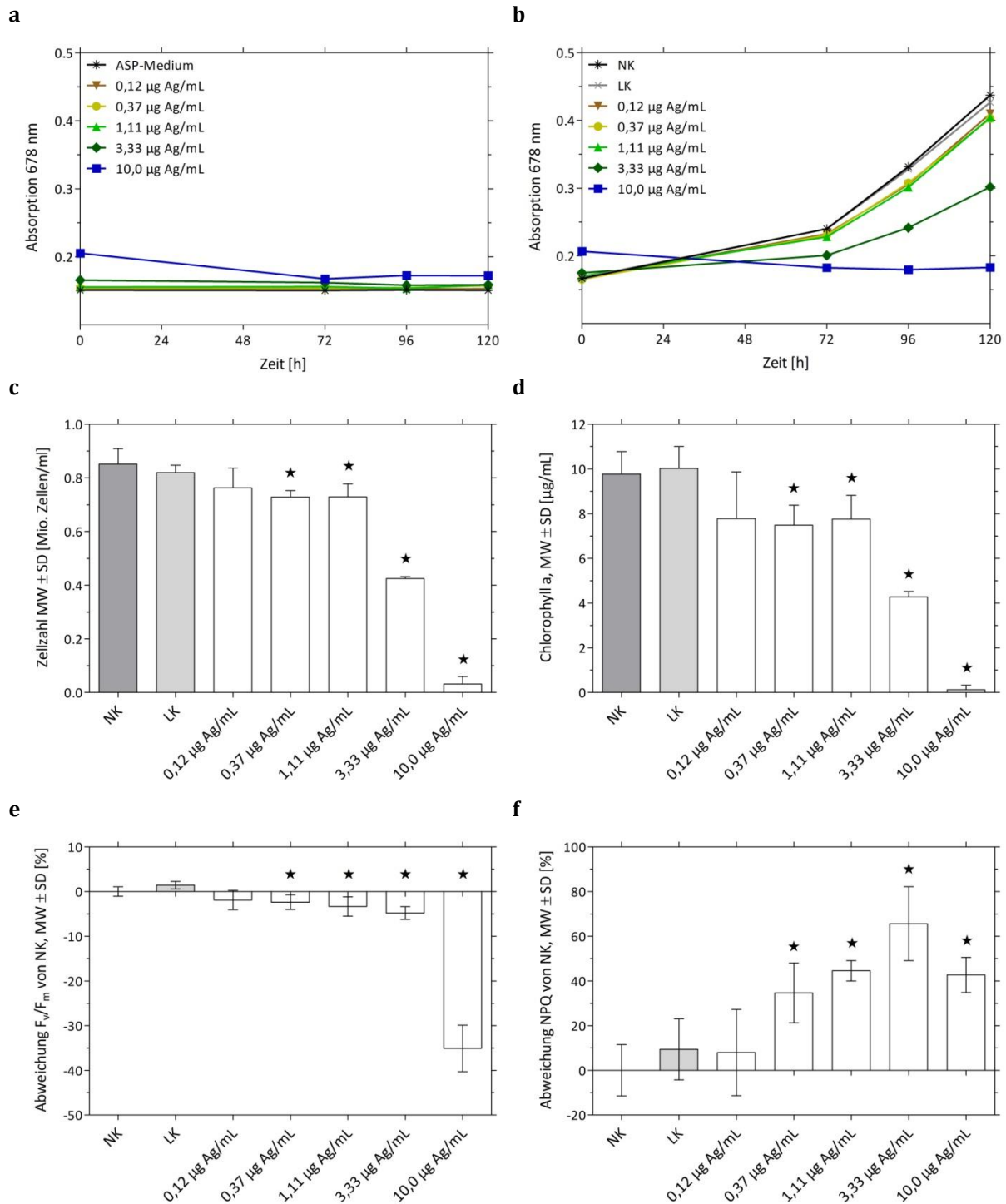


Abb. 47) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. meneghiniana* und Ag-NH₂. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 120 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 120 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 120 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 120 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 120 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 120 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

AgNO₃*Absorption der Blindproben sowie der testsubstanzexponierten Algenkulturen*

Im Bristol-Medium war hinsichtlich der Absorption kein deutlicher Unterschied der Nanopartikelbehandlungen zur Messung des reinen Mediums erkennbar (Abb. 48a, Abb. 49a). Die Werte lagen zwischen 0,15 und 0,17. Die Absorptionswerte der Proben, welche Algen enthielten, stiegen mit der Zeit an, wobei die Zunahme mit steigender NP-Konzentration geringer ausfiel (Abb. 48b, Abb. 49b). Lediglich bei der jeweils höchsten Konzentration (81 ng Ag/mL) war keine deutliche Zunahme der Absorption der Algenkulturen zu erkennen.

Im ASP-Medium war die Absorption bei den beiden höchsten NP-Konzentrationen (10; 3,33 µg Ag/mL) mit 0,46 bis 0,29 bzw. 0,22 bis 0,18 erkennbar höher als beim reinen Medium (0,15 bis 0,16) (Abb. 50a). Sie nahm hierbei tendenziell im Verlauf des Versuchs zu, war jedoch insbesondere bei der höchsten Konzentration deutlichen Schwankungen unterworfen. Bei den durch höhere Absorptionswerte auffallenden Konzentrationen wurden auch bei der Absorptionsmessung der Algenkulturen bei Versuchsbeginn höhere Werte ermittelt als bei den übrigen Behandlungen (Abb. 50b). Davon abgesehen stiegen die Absorptionswerte der Algenkulturen in diesem Versuch mit der Zeit an oder blieben weitgehend auf einem Niveau. Hohe Konzentrationen führten hierbei tendenziell zu einer geringeren Zunahme der Absorption.

Zellzahl

Mehrere Zellzahlwerte der drei Testorganismen waren bezogen auf die NK signifikant reduziert (Abb. 48c, Abb. 49c, Abb. 50c). Während bei *C. reinhardtii* die beiden höchsten Konzentrationen (81; 27 ng Ag/mL) eine verringerte Zellzahl aufwiesen, waren es bei *R. subcapitata* die höchsten drei (81 – 9 ng Ag/mL) und bei *C. meneghiniana* alle untersuchten Konzentrationen (10 – 0,12 µg Ag/mL). Bei der letztgenannten Art traten rechnerisch negative Zellzahlmittelwerte auf.

Chlorophyllgehalt

Bei allen drei Algenarten war in der jeweils höchsten Konzentration (Grünalgen: 81 ng Ag/mL, Diatomee: 10 µg Ag/mL) kein Chl a nachweisbar (Abb. 48d, Abb. 49d, Abb. 50d). Bei *C. meneghiniana* traf dies auch auf die beiden folgenden Konzentrationen (3,33; 1,11 µg Ag/mL) zu. Eine signifikante Reduktion des Chlorophyllgehalts war bei dieser Art bei allen untersuchten Konzentrationen (10 – 0,12 µg Ag/mL) feststellbar. Bei *R. subcapitata* wiesen die Algenkulturen, welche gegenüber den vier höchsten Ag-Konzentrationen (81 – 3 ng Ag/mL) exponiert worden waren, eine signifikante Reduktion des Chl a-Gehalts auf. In Bezug auf *C. reinhardtii* zeigten sich signifikante Effekte auf die Versuchsorganismen bei den beiden höchsten Testkonzentrationen (81; 27 ng Ag/mL).

Chlorophyllfluoreszenz

Im Fall von *R. subcapitata* konnte keine Fluoreszenz bei der höchsten NP-Konzentration (81 ng Ag/mL) gemessen werden, sodass keine Werte für die beiden Stressparameter vorlagen. Davon abgesehen waren bei allen drei Algenarten einige F_v/F_m -Werte bei höheren NP-Konzentrationen signifikant reduziert (Abb. 48e, Abb. 49e, Abb. 50e). Diese betraf bei *R. subcapitata* die zweithöchste Konzentration (27 ng Ag/mL) und bei *C. reinhardtii* und *C. meneghiniana* die beiden bzw. vier höchsten Konzentrationen (81; 27 ng Ag/mL bzw. 10 – 0,37 $\mu\text{g Ag/mL}$).

Bezüglich der NPQ trat bei *R. subcapitata* eine signifikante Reduktion bei der zweit- und dritthöchsten Konzentration (27; 9 ng Ag/mL) auf (Abb. 48f). Auch die Kieselalge zeigte signifikant reduzierte Werte, wobei die vier höchsten Ag-Konzentrationen (10 – 0,37 $\mu\text{g Ag/mL}$) betroffen waren (Abb. 50f). Im Fall von *C. reinhardtii* kam es bei den NPQ-Werten der mittleren Konzentration (9 ng Ag/mL) zu einer signifikanten Erhöhung gegenüber der NK (Abb. 49f).

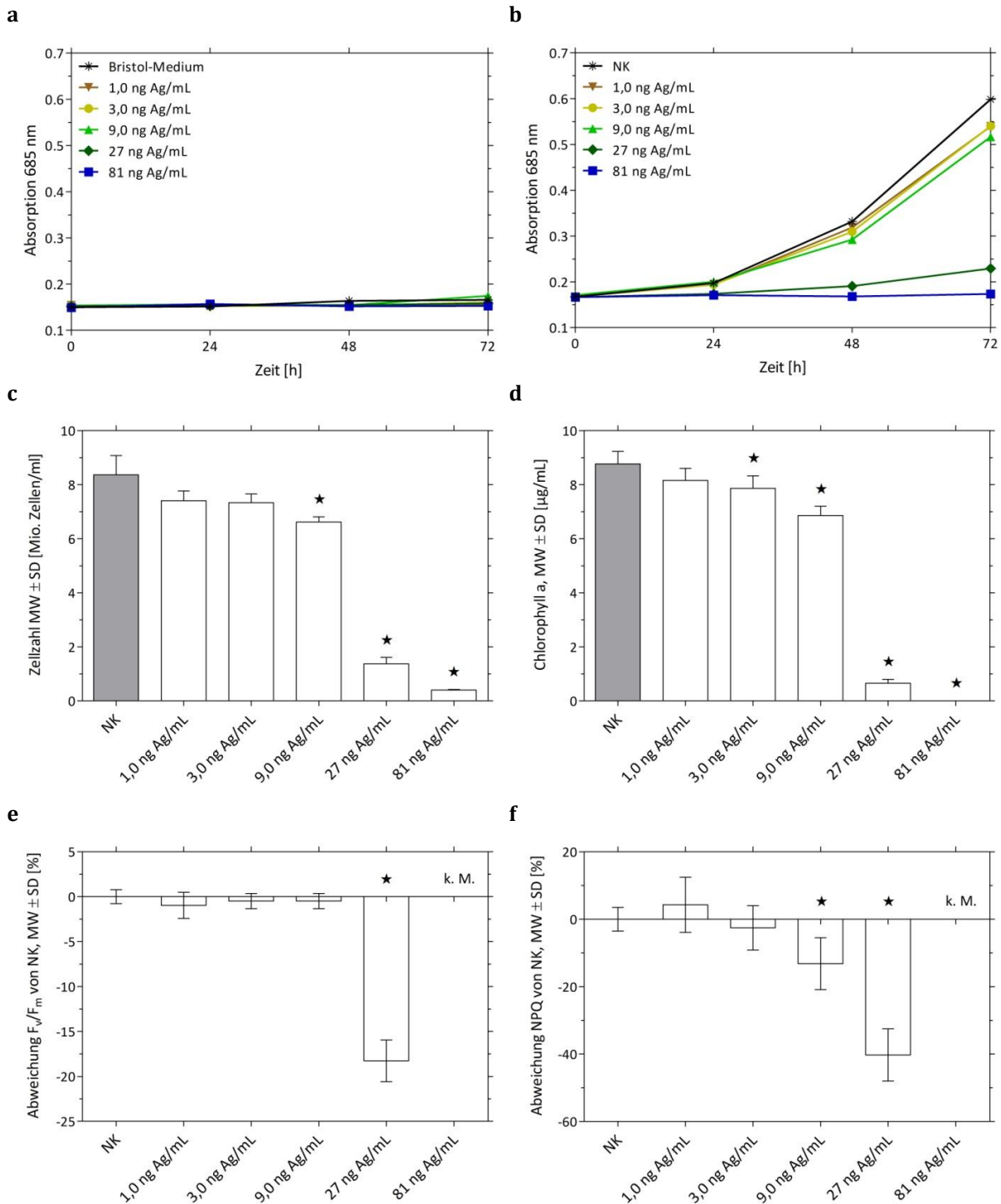


Abb. 48) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *R. subcapitata* und AgNO_3 . (a) Absorptionswerte der Testsubstanz in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Testsubstanz in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl \pm SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt \pm SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK \pm SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK \pm SD nach 72 h. $n = 6$ (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

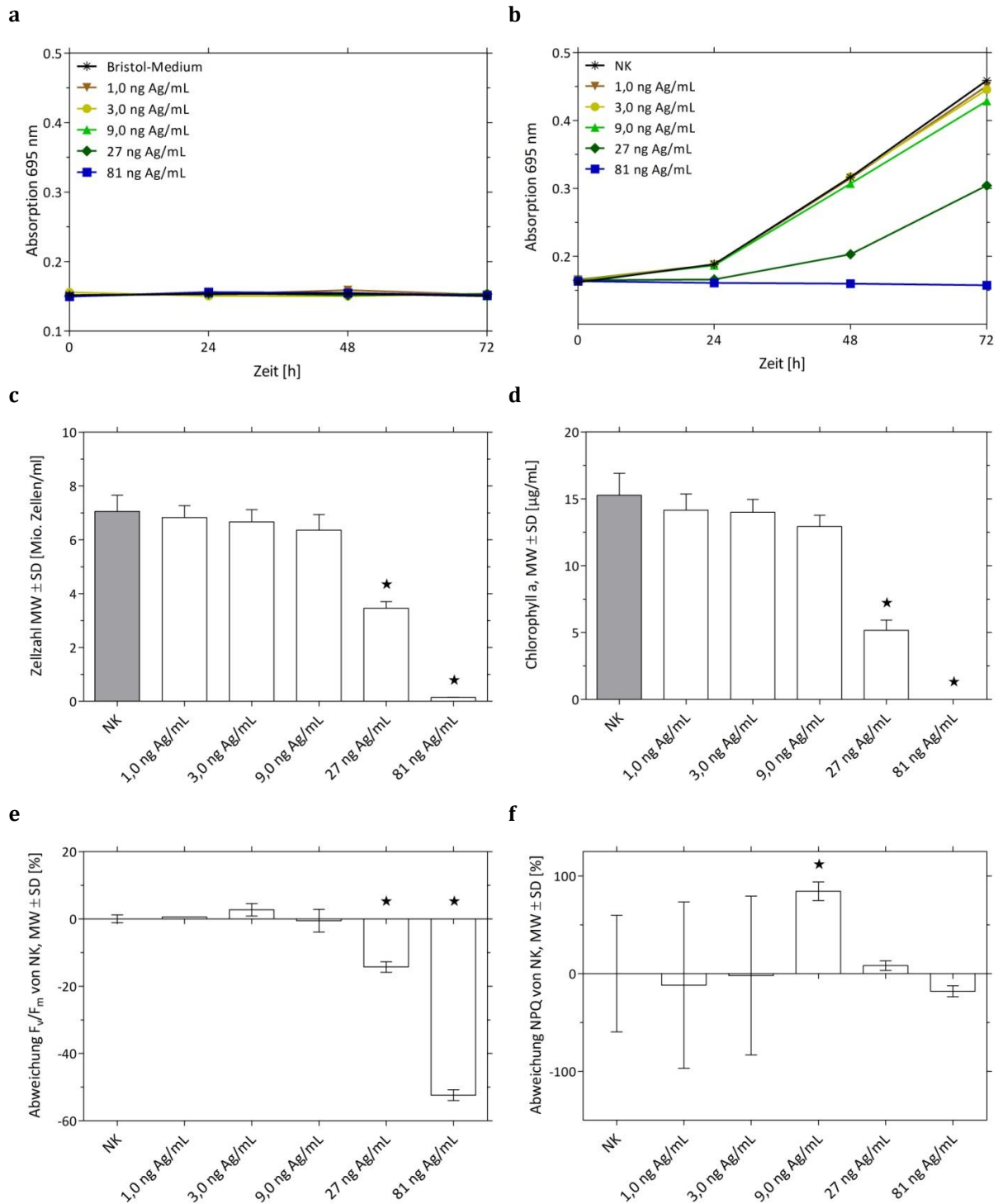


Abb. 49) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. reinhardtii* und AgNO_3 . (a) Absorptionswerte der Testsubstanz in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Testsubstanz in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl \pm SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt \pm SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK \pm SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK \pm SD nach 72 h. $n = 6$ (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

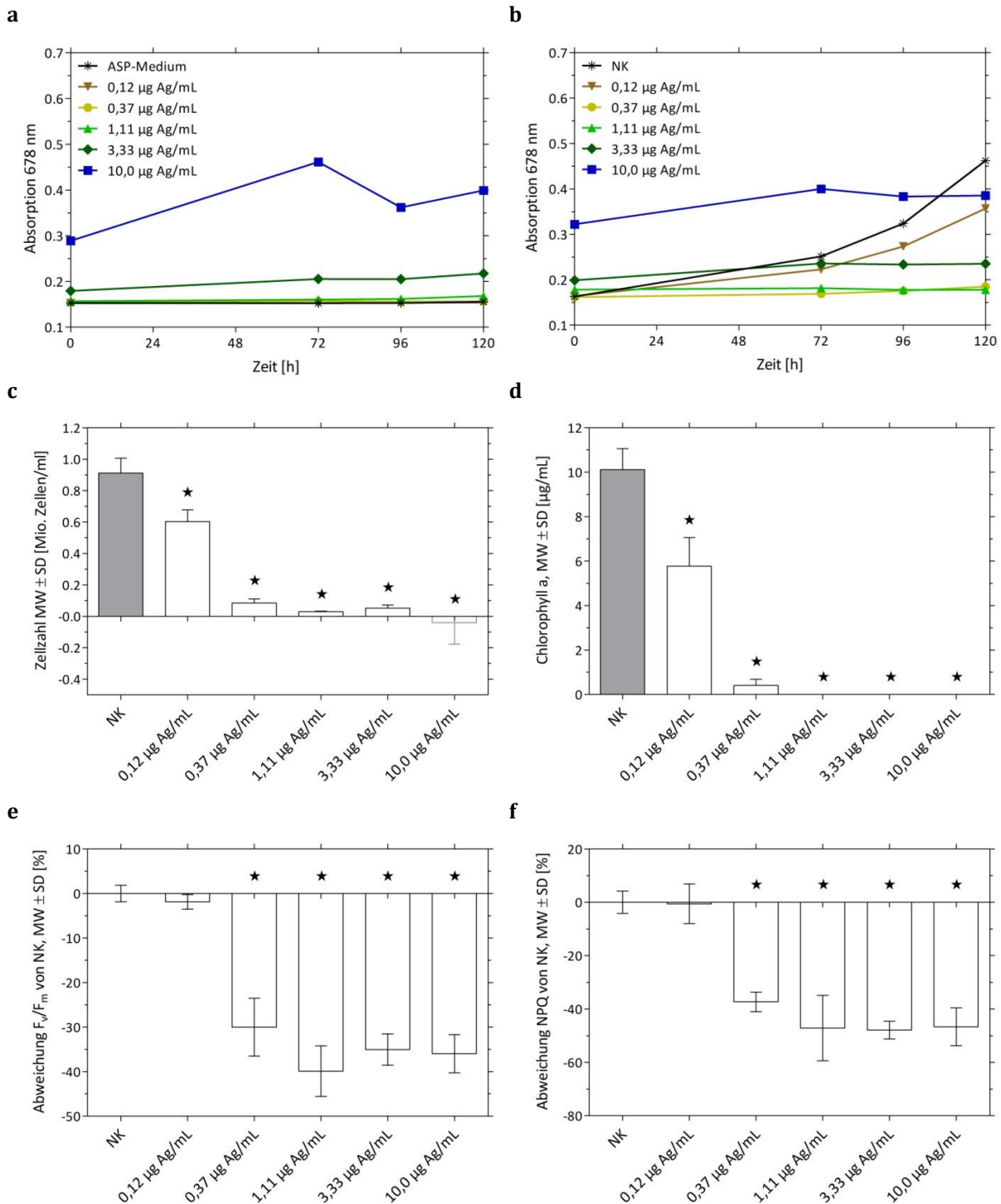


Abb. 50) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. meneghiniana* und AgNO_3 . (a) Absorptionswerte der Testsubstanz in Medium über 120 h, (b) Absorptionswerte der Testsubstanz in Algenkultur über 120 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 120 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 120 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 120 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 120 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

8.3.2 Titandioxid-Nanopartikel

Die Versuche mit TiO₂-NP wurden bei den einzelnen Algenarten mit verschiedenen Testkonzentrationen durchgeführt. Die beiden Grünalgen *R. subcapitata* und *C. reinhardtii* wurden gegenüber einer maximalen Konzentration von 300 µg TiO₂/mL exponiert. Die minimale Konzentration lag bei 3,70 µg TiO₂/mL und der Faktor zwischen den einzelnen Konzentrationen betrug jeweils drei. Die Testung von *C. meneghiniana* erfolgte bei maximal 100 µg TiO₂/mL und wurde um den Faktor drei bis zu einer Konzentration von 1,23 µg TiO₂/mL reduziert.

TiO₂-n

Absorption der Blindproben sowie der testsubstanzexponierten Algenkulturen

Die Absorptionswerte der TiO₂-n waren in allen Fällen mit ansteigender NP-Konzentration zunehmend gegenüber dem reinen Medium erhöht, welches einen Absorptionswert 0,15 bis 0,16 aufwies (Abb. 51a, Abb. 52a, Abb. 53a). Im Bristol-Medium wurde bei der höchsten NP-Konzentration (300 µg TiO₂/mL) ein Maximalwert von 0,67 erreicht, im ASP-Medium war es bei 100 µg TiO₂/mL 0,89. Die Absorptionswerte blieben über die Zeit weitgehend stabil. Eine Ausnahme hiervon stellte die Probe der höchsten getesteten NP-Konzentration im Versuch mit *R. subcapitata* dar, welche im Versuchsverlauf ansteigende Absorptionswerte zeigte.

Auch unter der Anwesenheit von Algen waren die Absorptionswerte mit steigender NP-Konzentration bereits bei der ersten Messung deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb. 51b, Abb. 52b, Abb. 53b). Im Fall von *R. subcapitata* und *C. meneghiniana* zeigte sich zudem, dass die Absorptionswerte bei der jeweils höchsten untersuchten NP-Konzentration (300 bzw. 100 µg TiO₂/mL) durchgehend niedriger waren als die zugehörigen Werte der Blindproben, welche keine Algenzellen enthielten. Im Bristol-Medium war bei den Algenkulturen im Versuchsverlauf eine Zunahme der Absorption erkennbar, wobei diese mit zunehmender NP-Konzentration geringer ausfiel. Besonders deutlich war dieser Effekt bei *C. reinhardtii* erkennbar. Im ASP-Medium zeigte sich unter Anwesenheit der Algenzellen mit fortschreitender Zeit eine leichte Zunahme der Absorption bei den niedrigen Konzentrationen bis einschließlich 11,1 µg TiO₂/mL. Bei den beiden höchsten Konzentrationen (100; 33,3 µg TiO₂/mL) verringerte sich die Absorption zunächst, ging gegen Ende des Versuchs jedoch in eine leichte Zunahme über. Hierbei wurde im Fall der höchsten Konzentration nach 120 h der Messwert zu Versuchsbeginn weiterhin unterschritten, während bei 33,3 µg TiO₂/mL ein ähnliches Niveau wie bei der ersten Messung erreicht wurde.

Zellzahl

Die Zellzahl von *R. subcapitata* war in allen NP-Behandlungsgruppen mit Ausnahme der zweitniedrigsten Konzentration (11,1 µg TiO₂/mL) signifikant reduziert (Abb. 51c). Hierbei

zeigte sich eine starke Abnahme zwischen der zweithöchsten (100 µg TiO₂/mL) und der höchsten getesteten Konzentration (300 µg TiO₂/mL), bei der sich rechnerisch eine negative Zellzahl ergab. Ein ähnliches Muster trat im Versuch mit *C. meneghiniana* auf, bei dem die Zellzahl bei der mittleren Konzentration (11,1 µg TiO₂/mL) nicht beeinflusst wurde, bei 33,3 und 100 µg TiO₂/mL jedoch rechnerisch auf negative Werte sank (Abb. 53c). Die Zellzahlen von *C. reinhardtii* wiesen in der höchsten getesteten Konzentration (300 µg TiO₂/mL) ebenfalls eine signifikante Reduktion im Vergleich zu Kontrolle auf, wohingegen die beiden folgenden, niedrigeren Konzentrationen (100 und 33,3 µg TiO₂/mL) jeweils signifikant höhere Zellzahlen als die NK zeigten (Abb. 52c).

Chlorophyllgehalt

Bei allen Testreihen mit TiO₂-n trat eine signifikante Reduktion des Chl a-Gehalts mit zunehmender NP-Konzentration auf (Abb. 51d, Abb. 52d, Abb. 53d). Im Fall von *R. subcapitata* waren alle eingesetzten Konzentrationen betroffen, wobei bei der höchsten Konzentration (300 µg TiO₂/mL) kein Chl a nachgewiesen werden konnte. In Bezug auf *C. reinhardtii* war bei dieser Konzentration ebenfalls keine Bestimmung des Chl-Gehalts möglich. Bei den übrigen Konzentrationen traten bei dieser Art keine Effekte auf. Im Fall von *C. meneghiniana* zeigte sich bei den beiden höchsten Konzentrationen (100 und 33,3 µg TiO₂/mL) eine signifikante Reduktion des Chl-Gehalts.

Chlorophyllfluoreszenz

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz zeigte bei allen untersuchten Arten eine signifikante Verringerung des F_v/F_m-Werts bei der jeweils höchsten getesteten NP-Konzentration (300 µg TiO₂/mL bei den Grünalgen, 100 µg TiO₂/mL bei der Diatomee) (Abb. 51e, Abb. 52e, Abb. 53e). Bei *C. reinhardtii* war zudem bei der zweithöchsten Konzentration (100 µg TiO₂/mL) ein gegenüber der NK signifikant reduzierter F_v/F_m-Wert festzustellen. Die Ergebnisse von *C. meneghiniana* wiesen hingegen signifikant erhöhte F_v/F_m-Werte bei den beiden niedrigsten Konzentrationen (3,7; 1,23 µg TiO₂/mL) auf, welche um etwa 4 % vom Kontrollniveau abwichen.

Bezüglich der NPQ waren signifikante Verringerungen im Vergleich zur Kontrolle bei der höchsten Testkonzentration im Versuch mit *C. meneghiniana* (100 µg TiO₂/mL) bzw. den beiden höchsten Testkonzentrationen bei *R. subcapitata* (100 und 33,3 µg TiO₂/mL) nachweisbar (Abb. 51f, Abb. 53f). Zudem trat hinsichtlich der LK von *R. subcapitata*, ein signifikant erhöhter NPQ-Wert gegenüber der NK auf. Ähnliches wurde bei der mittleren Konzentration (33,3 µg TiO₂/mL) im Test mit *C. reinhardtii* sowie bei zwei NP-Konzentrationen (11,1 und 3,7 µg TiO₂/mL) im Versuch mit *C. meneghiniana* beobachtet (Abb. 51f, Abb. 52f, Abb. 53f).

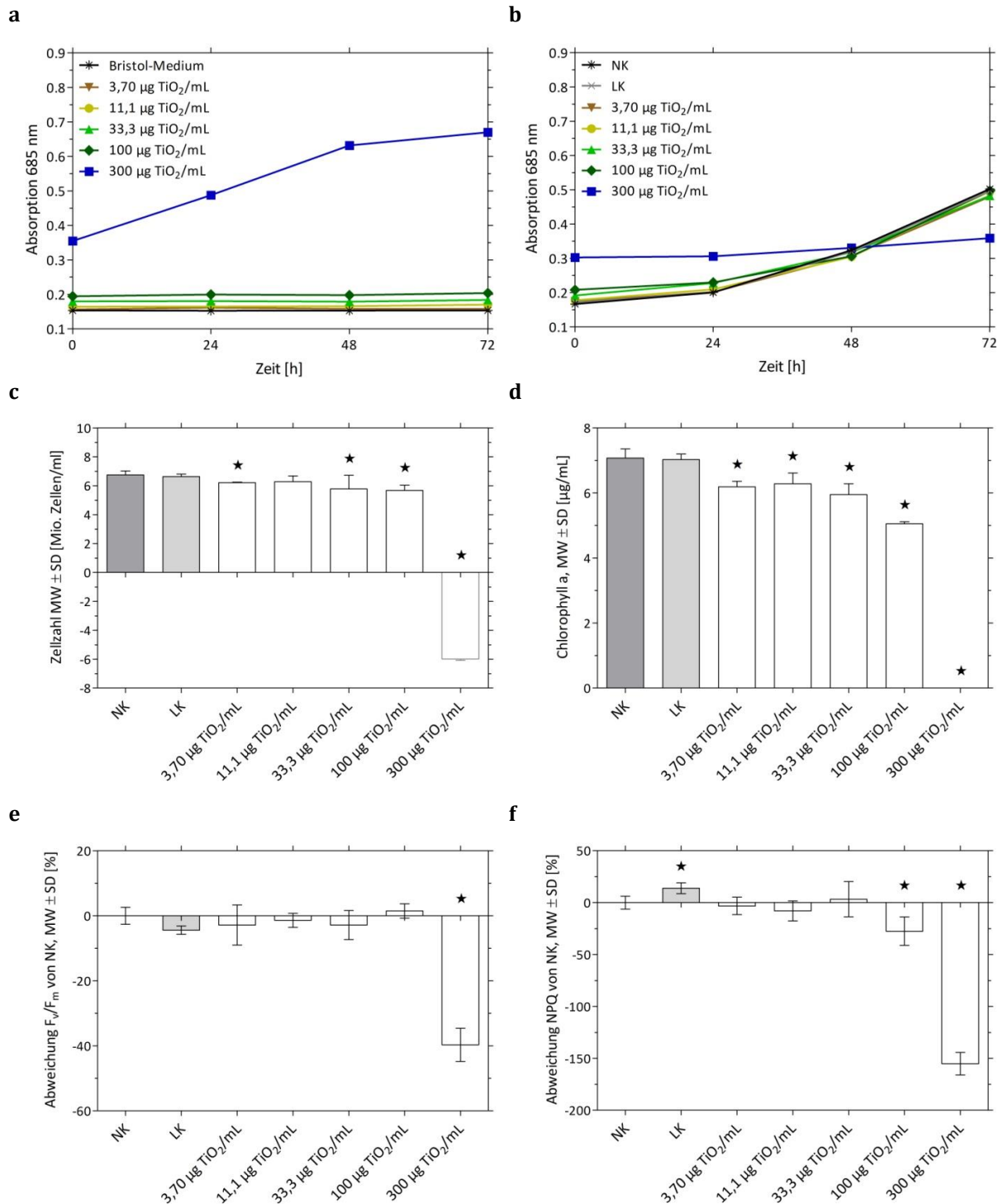


Abb. 51) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *R. subcapitata* und TiO₂-n. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m-Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

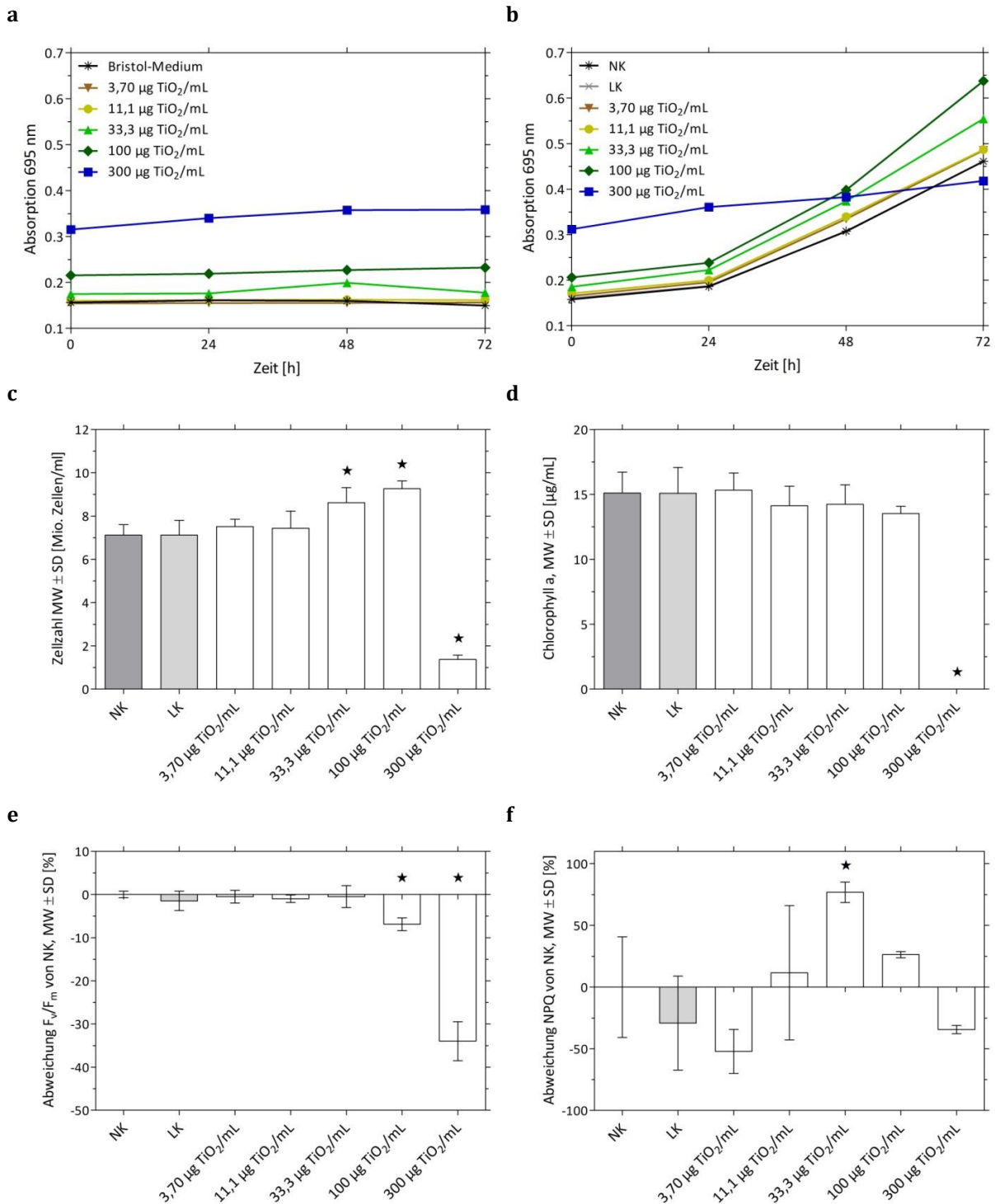


Abb. 52) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. reinhardtii* und TiO_2 -n. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl \pm SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt \pm SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK \pm SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK \pm SD nach 72 h. $n = 6$ (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

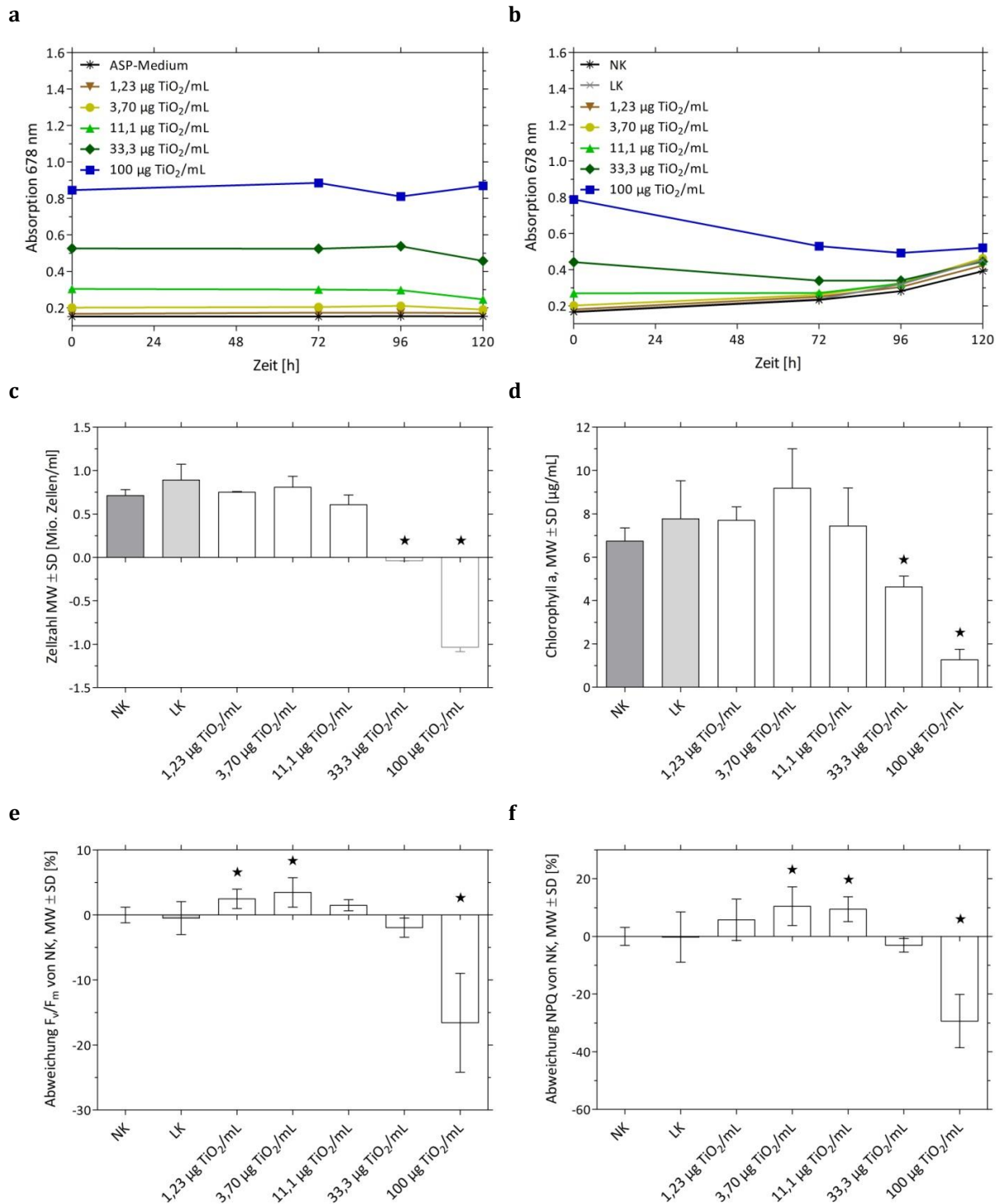


Abb. 53) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. meneghiniana* und TiO₂-n. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 120 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 120 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 120 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 120 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m-Werts von der NK ± SD nach 120 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 120 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

TiO₂-COOH

Absorption der Blindproben sowie der testsubstanzexponierten Algenkulturen

Die Absorptionswerte der TiO₂-COOH waren im Bristol-Medium verglichen zur Kontrolle mit Maximalwerten von 0,25 und 0,20 bei den beiden höchsten Konzentrationen (300 bzw. 100 µg TiO₂/mL) erkennbar erhöht. Im Versuchsverlauf traten leichte Schwankungen der Werte auf wobei kein durchgehender Zusammenhang von Absorption und NP-Konzentration gefunden wurde (Abb. 54a, Abb. 55a). Die zugehörigen Messungen der Algenkulturen zeigten eine Zunahme der Absorptionswerte mit der Zeit (Abb. 54b, Abb. 55b).

Im ASP-Medium war eine deutliche Erhöhung der Absorptionswerte mit zunehmender NP-Konzentration erkennbar, wobei die Werte im Versuchsverlauf abnahmen (Abb. 56a). Zu Versuchsbeginn wurde bei der höchsten Konzentration (100 µg TiO₂/mL) ein Maximalwert von 0,87 erreicht während die Absorption des reinen Mediums 0,15 betrug. In Anwesenheit von Algen, waren die Absorptionswerte der Proben verglichen mit den Werten der zugehörigen Blindprobe zu Versuchsbeginn niedriger (Abb. 56b). Bei den beiden höchsten NP-Konzentrationen (100; 33,3 µg TiO₂/mL) sank die Absorption zunächst ab, um gegen Versuchsende wieder leicht zuzunehmen, während die übrigen Behandlungen eine Zunahme über den gesamten Testverlauf zeigten.

Zellzahl

Sowohl bei *R. subcapitata* als auch bei *C. meneghiniana* war die Zellzahl bei den beiden höchsten untersuchten Konzentrationen (300; 100 µg TiO₂/mL bzw. 100; 33,3 µg TiO₂/mL) signifikant reduziert (Abb. 54c, Abb. 56c). Im Versuch mit *C. reinhardtii* trat hinsichtlich der Zellzahl keine signifikante Abweichung von der NK auf (Abb. 55c).

Chlorophyllgehalt

Während bei *C. reinhardtii* keine signifikanten Effekte auf den Chl a-Gehalt erkennbar waren, zeigten *R. subcapitata* und *C. meneghiniana* bei der höchsten getesteten NP-Konzentration (300 µg TiO₂/mL) bzw. den beiden höchsten NP-Konzentrationen (100; 33,3 µg TiO₂/mL) signifikante Reduktionen des Chl a-Gehalts gegenüber dem Kontrollniveau (Abb. 54d, Abb. 55d, Abb. 56d).

Chlorophyllfluoreszenz

Während die F_v/F_m-Werte von *R. subcapitata* keine signifikanten Unterschiede zur NK aufwiesen, traten bei den NPQ-Werten signifikante Reduktionen bei den beiden niedrigsten NP-Konzentrationen (11,1; 3,7 µg TiO₂/mL) auf (Abb. 54e, f). Bei den beiden übrigen Algenarten hatten die TiO₂-COOH keine signifikanten Effekte auf die NPQ (Abb. 55f, Abb. 56f). In Bezug auf

C. reinhardtii trat jedoch beim F_v/F_m -Wert eine signifikante Reduktion von weniger als 2 % bei der mittleren NP-Konzentration (33,3 $\mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$) auf (Abb. 55e). Im Versuch mit *C. meneghiniana* zeigte die Behandlungsgruppe, welche gegenüber der höchsten NP-Konzentration (100 $\mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$) exponiert war, eine signifikante Reduktion von F_v/F_m (Abb. 56e).

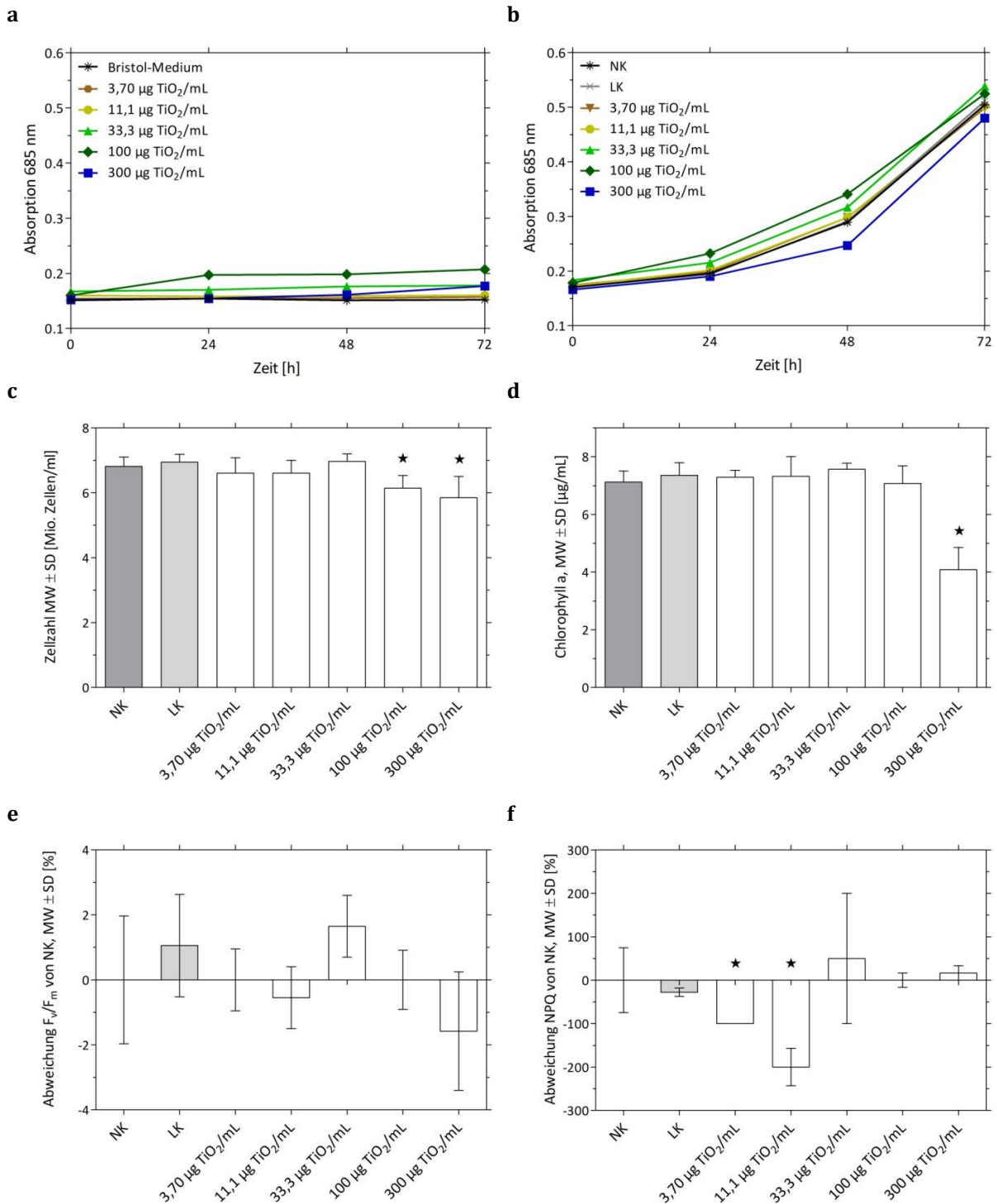


Abb. 54) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *R. subcapitata* und $\text{TiO}_2\text{-COOH}$. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl \pm SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt \pm SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK \pm SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK \pm SD nach 72 h. $n = 6$ (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

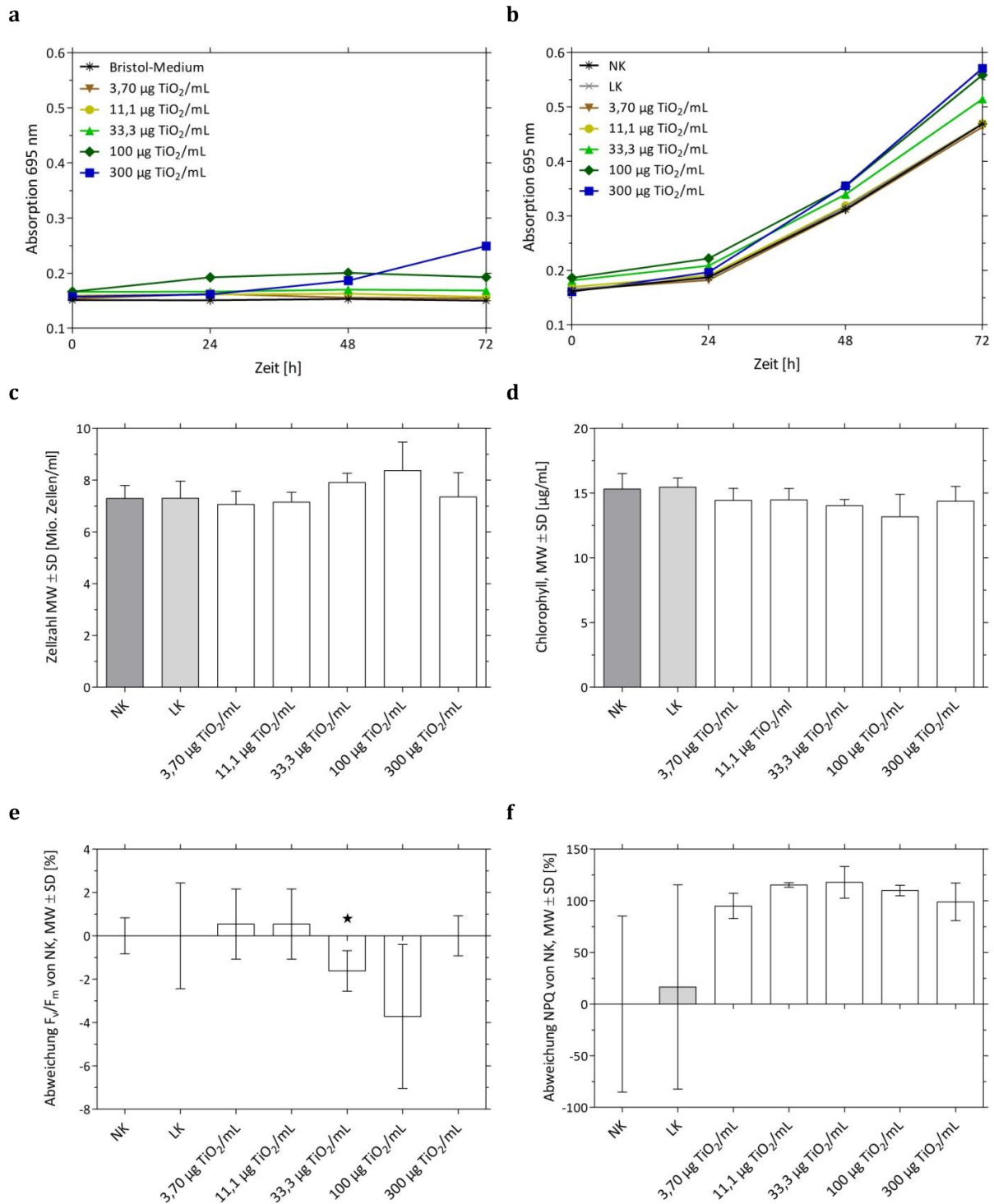


Abb. 55) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. reinhardtii* und TiO₂-COOH. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m-Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

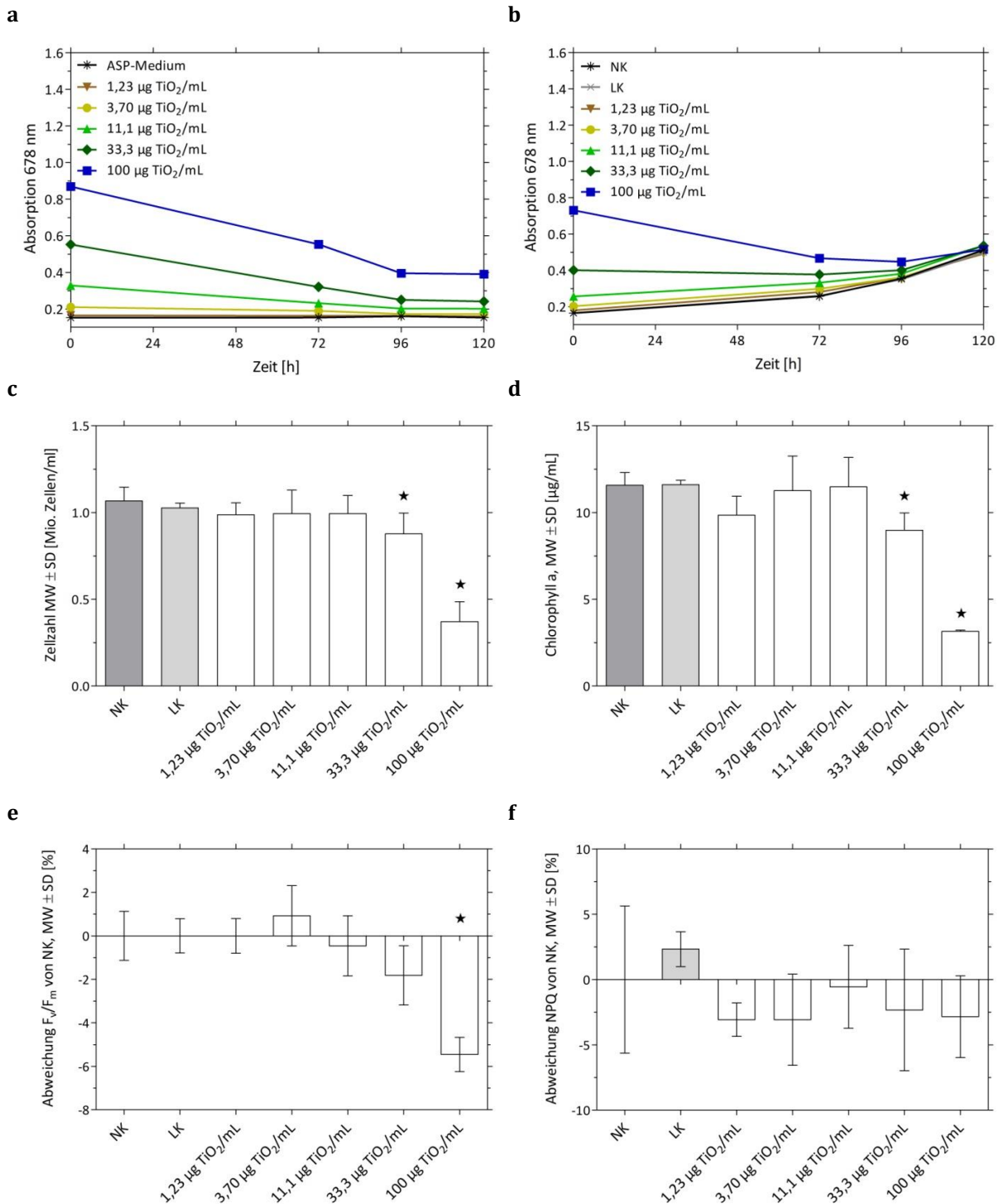


Abb. 56) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. meneghiniana* und $\text{TiO}_2\text{-COOH}$. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 120 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 120 h, (c) MW Zellzahl \pm SD nach 120 h, (d) MW Chl a-Gehalt \pm SD nach 120 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK \pm SD nach 120 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK \pm SD nach 120 h. $n = 6$ (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

TiO₂-NH₂

Absorption der Blindproben sowie der testsubstanzexponierten Algenkulturen

Die Absorptionswerte der TiO₂-NH₂ waren in beiden Medien im Vergleich zum partikelfreien Medium, welches Absorptionswerte zwischen 0,15 und 0,17 aufwies, erkennbar erhöht. Im Fall des Bristol-Mediums wurde eine Zunahme des Absorptionswerts mit ansteigender NP-Konzentration beobachtet und es wurden Maximalwerte von 0,39 erreicht (Abb. 57a, Abb. 58a). In Bezug auf das ASP-Medium galt dieser Zusammenhang ebenfalls überwiegend, die Absorption der mittleren Konzentration (11,1 µg TiO₂/mL) war jedoch höher als die der zweithöchsten Konzentration (33,3 µg TiO₂/mL) (Abb. 59a), wobei maximal ein Wert von 0,3 erreicht wurde. Im Verlauf des Versuchs blieben die Werte weitgehend konstant, es traten nur geringe Schwankungen auf.

Enthielten die Proben neben Nanomaterialien auch Algen, wurde zu Versuchsbeginn eine Erhöhung des Absorptionswerts mit zunehmender NP-Konzentration beobachtet (Abb. 57b, Abb. 58b, Abb. 59b). Im Versuchsverlauf stiegen die Werte weiter an, wobei die Zunahme bei den einzelnen Behandlungsgruppen weitgehend ähnlich war. Lediglich im ASP-Medium fiel der Anstieg bei der höchsten Konzentration (100 µg TiO₂/mL) deutlich geringer aus als bei den übrigen Konzentrationen und Kontrollen.

Zellzahl

In allen Behandlungsgruppen mit NP (300 – 3,7 µg TiO₂/mL) war die Zellzahl von *R. subcapitata* signifikant gegenüber der NK reduziert, während bei *C. reinhardtii* keine signifikanten Effekte feststellbar waren (Abb. 57c, Abb. 58c). *C. meneghiniana* zeigte bei der höchsten NP-Konzentration (100 µg TiO₂/mL) eine signifikant verringerte Zellzahl und ab der zweithöchsten Konzentration (33,3 µg TiO₂/mL) waren die Werte in allen Behandlungsgruppen gegenüber der NK signifikant erhöht (Abb. 59c).

Chlorophyllgehalt

In Bezug auf *C. reinhardtii* traten hinsichtlich des Chlorophyllgehalt keine signifikanten Unterschiede zur NK auf (Abb. 58d). Bei *C. meneghiniana* und *R. subcapitata* waren in der höchsten Konzentration (100 µg TiO₂/mL) bzw. den beiden höchsten Konzentrationen (300; 100 µg TiO₂/mL) signifikante Reduktionen des Chl a-Gehalts erkennbar (Abb. 57d, Abb. 59d). Im Versuch mit der Diatomee waren zudem bei der mittleren und der niedrigsten Konzentration (11,1; 1,23 µg TiO₂/mL) signifikante Erhöhungen des Chl a-Gehalts gegenüber dem Kontrollniveau nachweisbar.

Chlorophyllfluoreszenz

Im Versuch mit *C. meneghiniana* konnten bei der höchsten untersuchten NP-Konzentration (100 µg TiO₂/mL) aufgrund des geringen Fluoreszenzsignals keine Stressparameter gemessen werden. Die übrigen Behandlungsgruppen dieses Versuchs sowie alle Behandlungsgruppen im Versuch mit *C. reinhardtii* zeigten in Bezug auf den F_v/F_m-Wert keine signifikanten Abweichungen von der NK (Abb. 58e, Abb. 59e). *R. subcapitata* wies hingegen eine signifikante Reduktion des F_v/F_m-Werts gegenüber dem Kontrollniveau bei den beiden höchsten NP-Konzentrationen (300; 100 µg TiO₂/mL) auf (Abb. 57e). Bei diesen Konzentrationen waren zudem die NPQ-Werte des Testorganismus signifikant verringert (Abb. 57f). Auch bei der Diatomee traten signifikante Reduktionen des NPQ-Werts im Vergleich zum Kontrollniveau bei der zweithöchsten und der niedrigsten NP-Konzentration (33,3; 1,23 µg TiO₂/mL) auf. (Abb. 59f). *C. reinhardtii* zeigte hingegen bei den drei höchsten NP-Konzentrationen (300 – 33,3 µg TiO₂/mL) gegenüber der NK signifikant erhöhte NPQ-Werte (Abb. 58f).

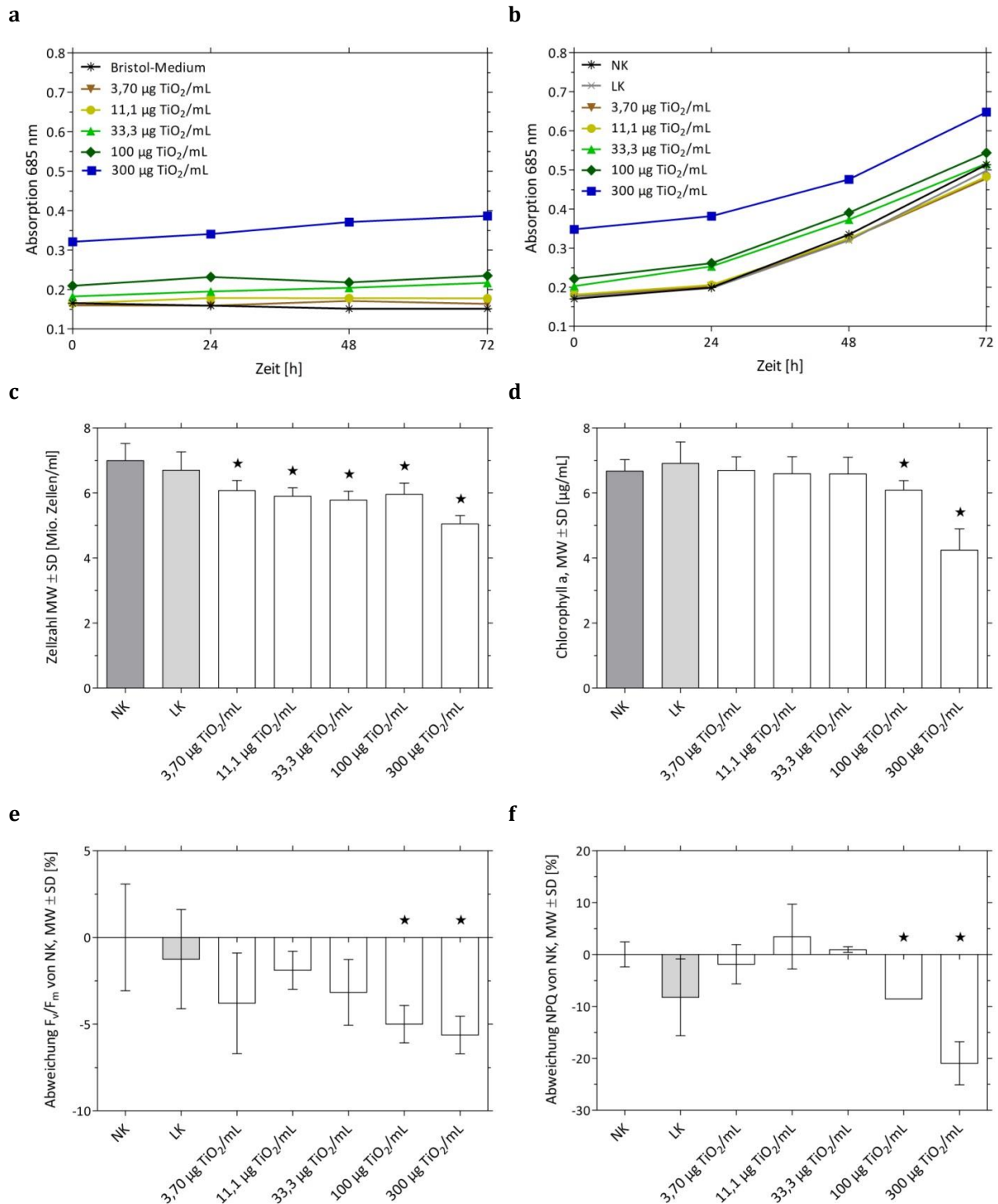


Abb. 57) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *R. subcapitata* und TiO₂-NH₂. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m-Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

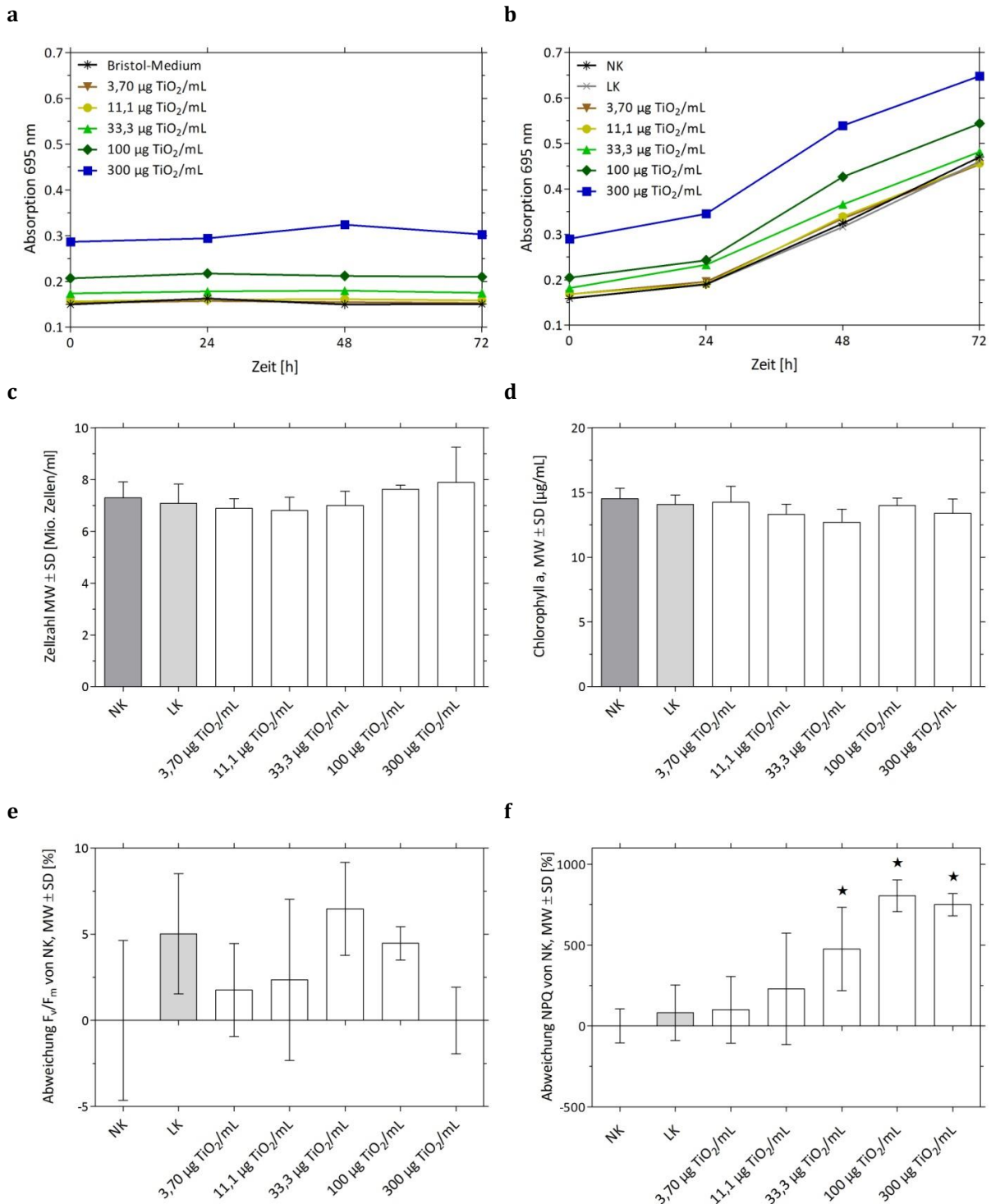


Abb. 58) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. reinhardtii* und $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl \pm SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt \pm SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK \pm SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK \pm SD nach 72 h. $n = 6$ (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

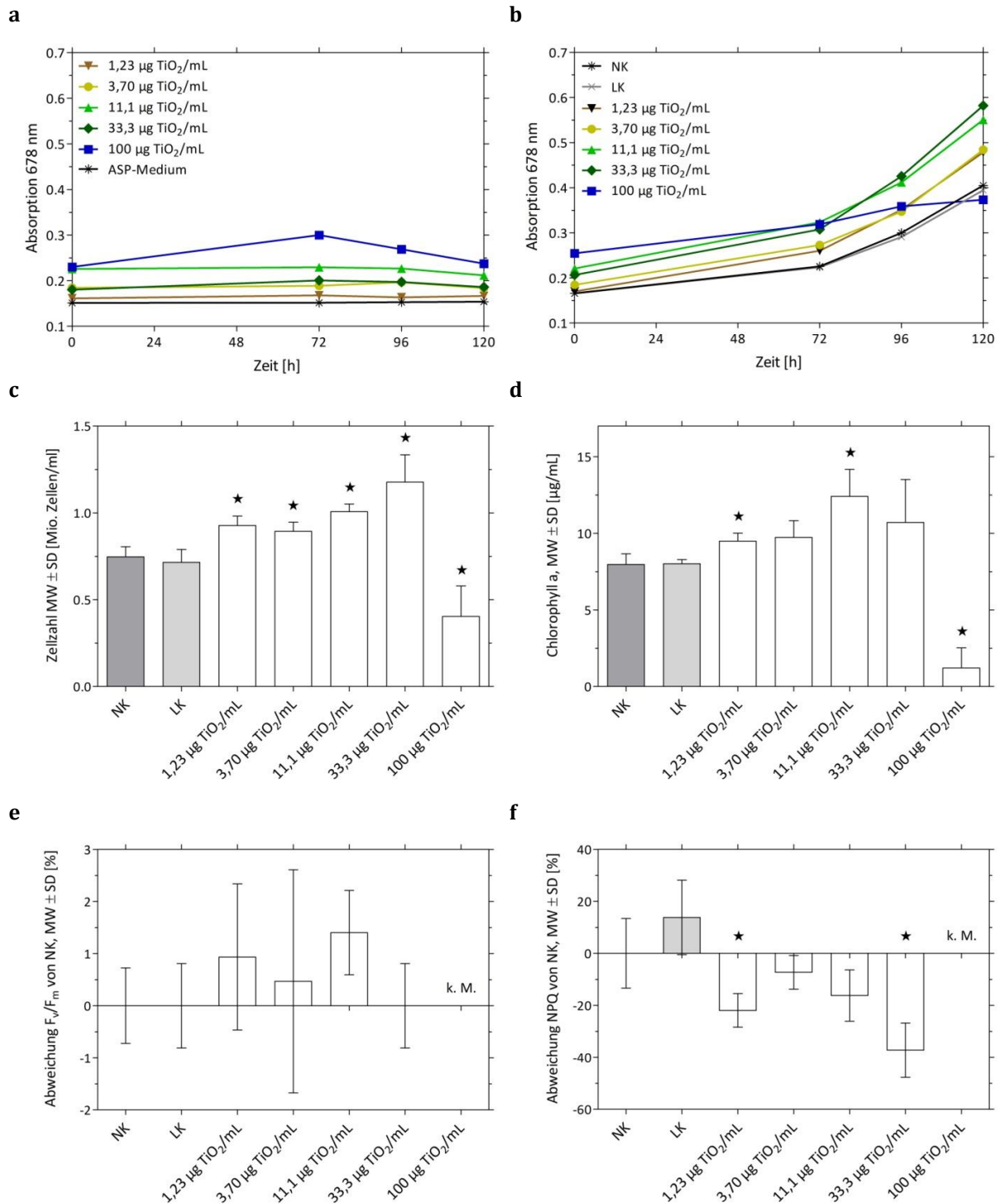


Abb. 59) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. meneghiniana* und $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 120 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 120 h, (c) MW Zellzahl \pm SD nach 120 h, (d) MW Chl a-Gehalt \pm SD nach 120 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK \pm SD nach 120 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK \pm SD nach 120 h. $n = 6$ (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

8.3.3 Polystyrol-Nanopartikel

Für die drei untersuchten PS-NP wurden in allen Testreihen die gleichen Testkonzentrationen verwendet. Diese lagen zwischen 81 und 1 µg PS/mL, mit einem Faktor von drei zwischen den einzelnen Konzentrationen. Von einer Untersuchung höherer Konzentrationen wurde abgesehen, da Vorversuche zum Suspensionsverhalten gezeigt hatten, dass ab einer Konzentration von ca. 100 µg PS/mL die untersuchten Partikel nicht mehr vollständig suspendiert waren, sondern teilweise agglomerieren und an der Mediumsoberfläche schwammen. Dieses Verhalten erlaubte keine gleichmäßige Exposition der Algenzellen gegenüber den Testsubstanzen, weshalb eine maximale Testkonzentration gewählt wurde, bei der dieser Effekt nicht auftrat.

PS-n

Absorption der Blindproben sowie der testsubstanzexponierten Algenkulturen

Die Absorption der PS-n zeigte in beiden Medien keine oder nur geringfügige Unterschiede zu den Messergebnissen der reinen Medien, welche Werte von 0,15 bis 0,16 aufwiesen (Abb. 60a, Abb. 61a, Abb. 62a). Im Bristol-Medium wurde bei der höchsten untersuchten Konzentration (81 µg PS/mL) die maximale Absorption von 0,19 erreicht. Im ASP-Medium trat der Maximalwert bei der gleichen Konzentration auf und betrug 0,22. In beiden Medien waren die Absorptionswerte im Versuchsverlauf weitgehend gleichbleibend.

Enthielten die Proben neben den NP auch Algenzellen, stiegen die Absorptionsmesswerte bei allen Versuchsorganismen im Testverlauf an (Abb. 60b, Abb. 61b, Abb. 62b). Hierbei war mit steigender NP-Konzentration eine erhöhte Zunahme erkennbar. Lediglich in Bezug auf den Versuch mit *C. reinhardtii* konnte die Abstufung nach NP-Konzentrationen bei den drei höchsten untersuchten Konzentrationen (81 – 9 µg PS/mL) nicht über den gesamten Versuchsverlauf beobachtet werden.

Zellzahl

Die Zellzahl aller Algenarten war in den Behandlungsgruppen mit den drei höchsten NP-Konzentrationen (81 – 9 µg PS/mL) gegenüber der NK signifikant erhöht. Bei den beiden niedrigsten Konzentrationen zeigten sich keine signifikanten Effekte (Abb. 60c, Abb. 61c, Abb. 62c).

Chlorophyllgehalt

Während bei *C. reinhardtii* in Bezug auf den Chl a-Gehalt keine signifikanten Veränderungen auftraten, kam es bei den beiden anderen Algenarten bei verschiedenen Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung gegenüber dem Kontrollniveau (Abb. 60d, Abb. 61d, Abb. 62d). Im Fall

von *R. subcapitata* beschränkte sich diese auf die niedrigste Konzentration (1 µg PS/mL), bei *C. meneghiniana* waren die drei höchsten Konzentrationen (81 – 9 µg PS/mL) betroffen.

Chlorophyllfluoreszenz

Die F_v/F_m -Werte der drei Behandlungsgruppen mit den höchsten NP-Konzentrationen (81 – 9 µg PS/mL) waren im Fall von *C. meneghiniana* signifikant erhöht (Abb. 62e). Sie stiegen mit der NP-Konzentration und lagen im einstelligen Prozentbereich. Bei *C. reinhardtii* traten in Bezug auf F_v/F_m keine signifikanten Effekte auf und bei *R. subcapitata* war lediglich bei der niedrigsten Konzentration (1 µg PS/mL) eine signifikante Zunahme um rund 4 % gegenüber der NK zu verzeichnen (Abb. 60e, Abb. 61e).

Während im Versuch mit *C. reinhardtii* bei der höchsten und mittleren Konzentration (81; 9 µg PS/mL) signifikante Erhöhungen des NPQ-Werts auftraten, war in Bezug auf *C. meneghiniana* eine Verringerung bei der höchsten NP-Konzentration (81 µg PS/mL) um rund 5 % festzustellen (Abb. 61f, Abb. 62f). In Bezug auf *R. subcapitata* wurden keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollniveau beobachtet (Abb. 60f).

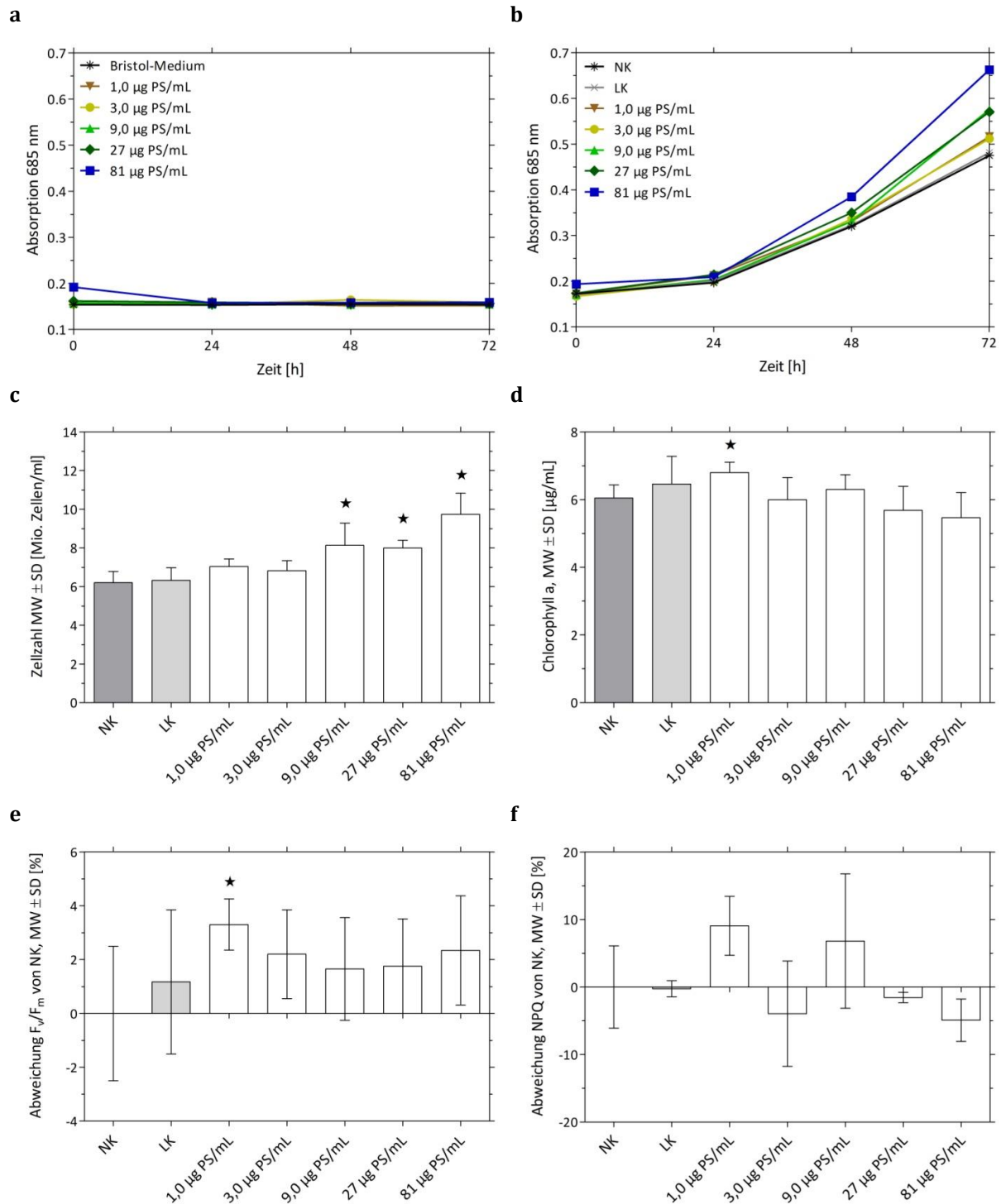


Abb. 60) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *R. subcapitata* und PS-n. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

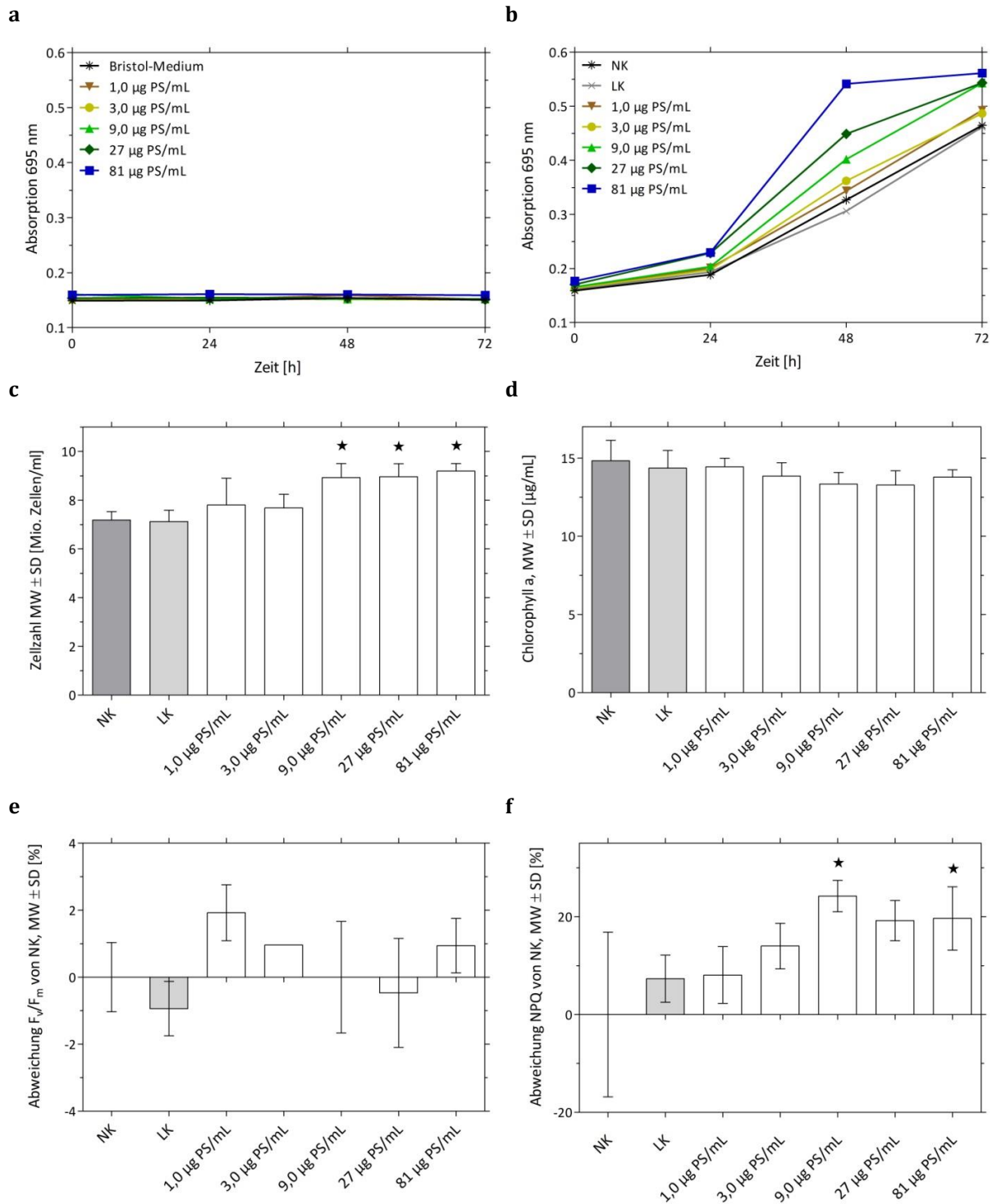


Abb. 61) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. reinhardtii* und PS-n. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: $p < 0,05$) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

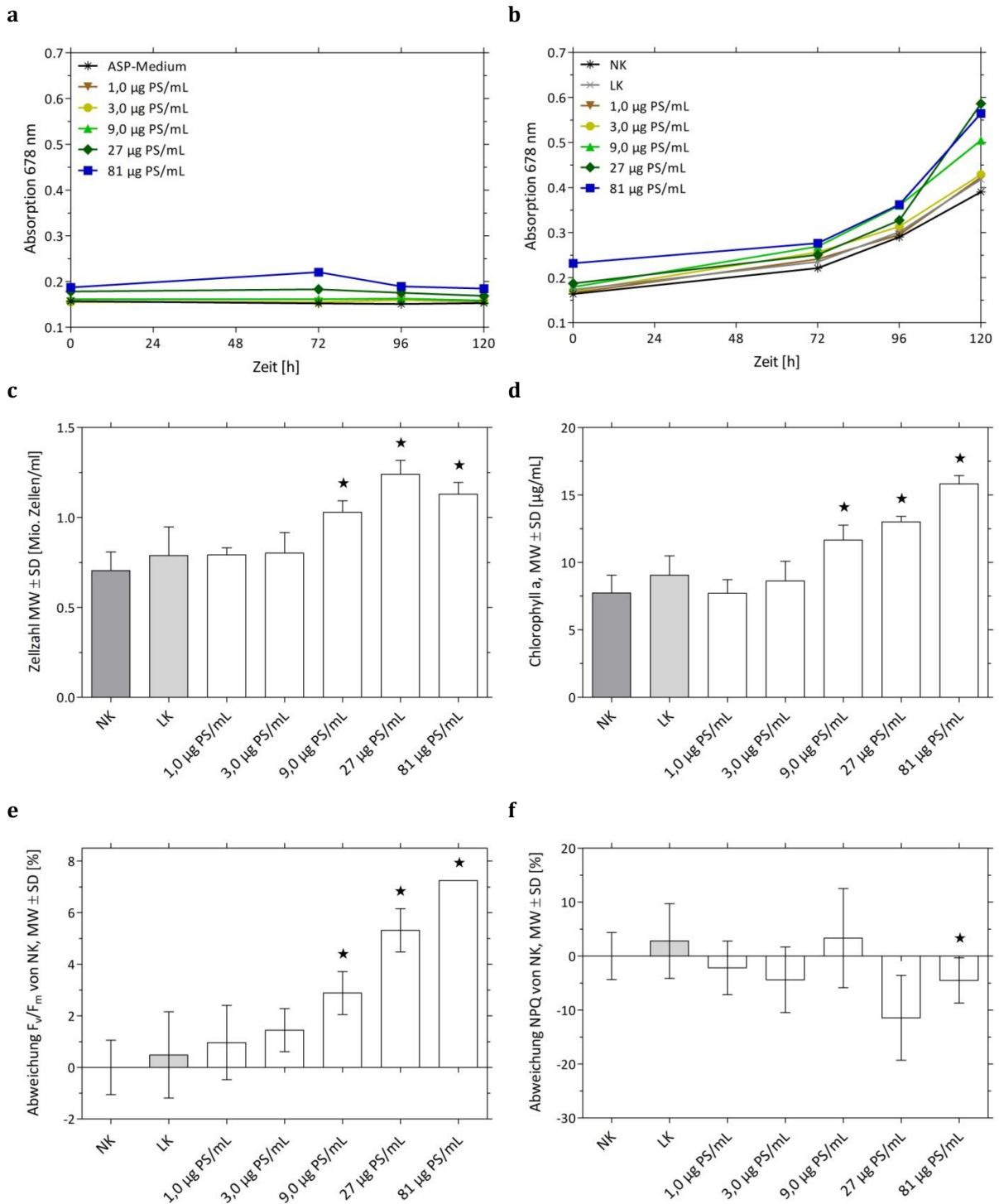


Abb. 62) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. meneghiniana* und PS-n. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 120 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 120 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 120 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 120 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 120 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 120 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

PS-COOH

Absorption der Blindproben sowie der testsubstanzexponierten Algenkulturen

Die PS-COOH wiesen im Bristol-Medium ähnliche Absorptionswerte wie das Medium selbst auf (Abb. 63a, Abb. 64a), wobei alle Werte zwischen 0,15 und 0,16 lagen. In Bezug auf das ASP-Medium war eine erhöhte Absorption bei den höheren Konzentrationen (81; 27 µg PS/mL) erkennbar, die einen Maximalwert von 0,35 erreichte (Abb. 62a). Über den Versuchsverlauf hinweg waren die Messwerte in beiden Medien weitgehend gleichbleibend.

Die Absorptionsmesswerte der Algenkulturen stiegen in allen Fällen mit der Zeit an, wobei sich die Zunahme tendenziell mit steigender NP-Konzentration erhöhte (Abb. 63b, Abb. 64b, Abb. 65b). Im ASP-Medium war die Absorption bei den Proben der beiden höchsten Konzentrationen bereits zu Beginn des Versuchs etwas höher als bei den übrigen Behandlungen.

Zellzahl

Im Versuch mit *R. subcapitata* trat bei allen NP-Konzentrationen (81 – 1 µg PS/mL) eine signifikante Zellzahlerhöhung auf, wobei das Wachstum mit steigender Konzentration zunahm (Abb. 63c). *C. reinhardtii* zeigte nur bei der höchsten NP-Konzentration (81 µg PS/mL) eine signifikante Zunahme der Zellzahl und bei *C. meneghiniana* trat keine signifikante Zellzahlabweichung von der NK auf (Abb. 64c, Abb. 65c).

Chlorophyllgehalt

Bei *R. subcapitata* zeigten sich keine signifikanten Effekte auf den Chl a-Gehalt (Abb. 63d). Im Versuch mit *C. meneghiniana* wurde eine signifikante Erhöhung bei der höchsten NP-Konzentration (81 µg PS/mL) beobachtet (Abb. 65d). In Bezug auf *C. reinhardtii* war der Chlorophyllgehalt bei der zweithöchsten Konzentration (27 µg PS/mL) signifikant gegenüber der NK reduziert (Abb. 64d).

Chlorophyllfluoreszenz

Die Messung des F_v/F_m - und NPQ-Werts bei *R. subcapitata* lieferte keine signifikanten Unterschiede zu den Werten der NK (Abb. 63e, f). Bei *C. reinhardtii* waren die F_v/F_m -Werte bei den drei niedrigsten NP-Konzentrationen (9 – 1 µg PS/mL) signifikant reduziert und die LK wies einen signifikant erhöhten Wert auf (Abb. 64e). Die Abweichungen von der NK betragen in allen Fällen weniger als 3 %. Im Zusammenhang mit der NPQ kam es zu einer signifikanten Erhöhung des MW bei der mittleren Konzentration (9 µg PS/mL) (Abb. 64f). Bei *C. meneghiniana* trat bei der zweitniedrigsten Konzentration (3 µg PS/mL) der F_v/F_m - sowie NPQ-Messung eine signifikante Reduktion auf, wobei die Abweichungen von der NK weniger als 2 bzw. 10 % betragen (Abb. 65e, f).

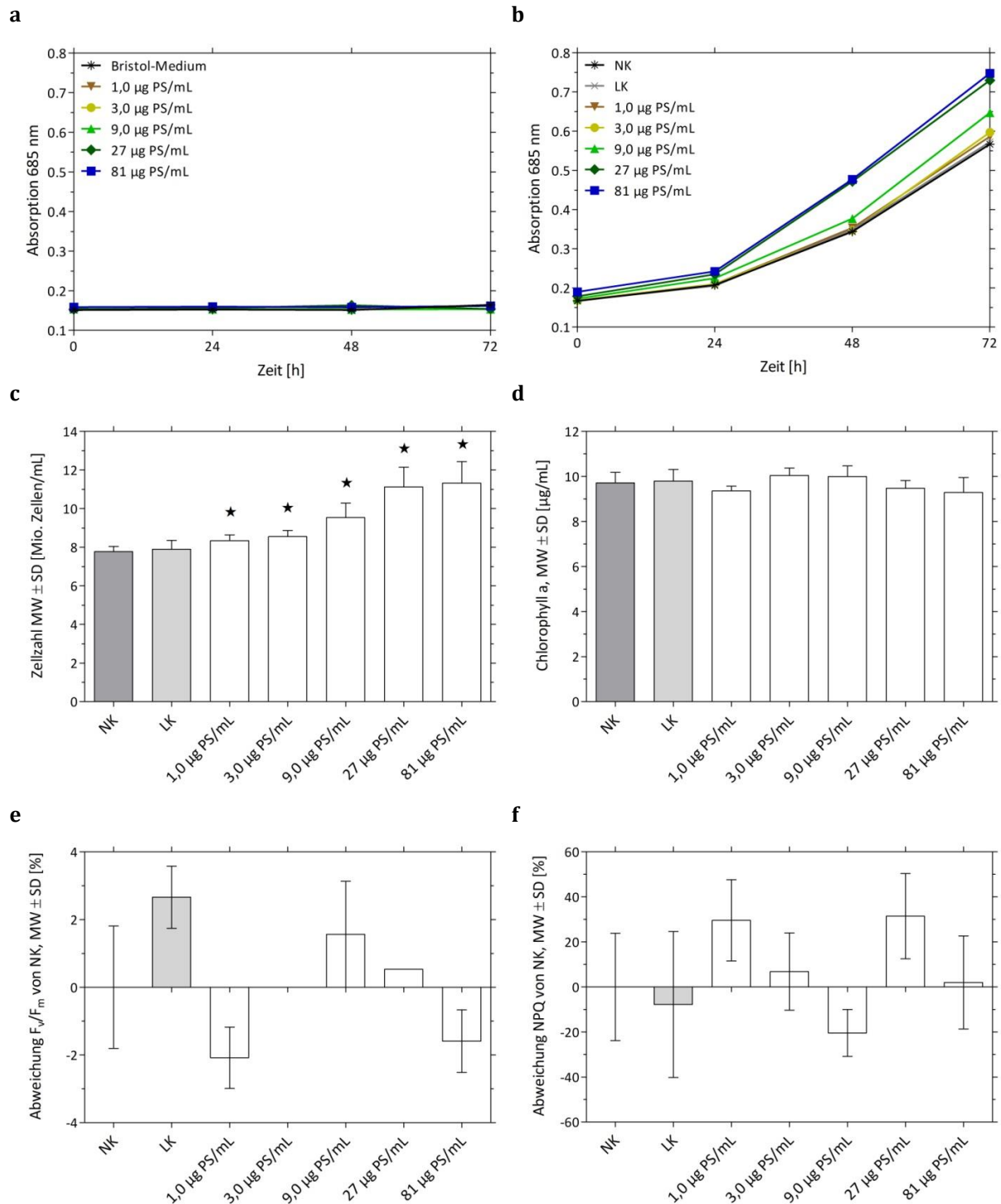


Abb. 63) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *R. subcapitata* und PS-COOH. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

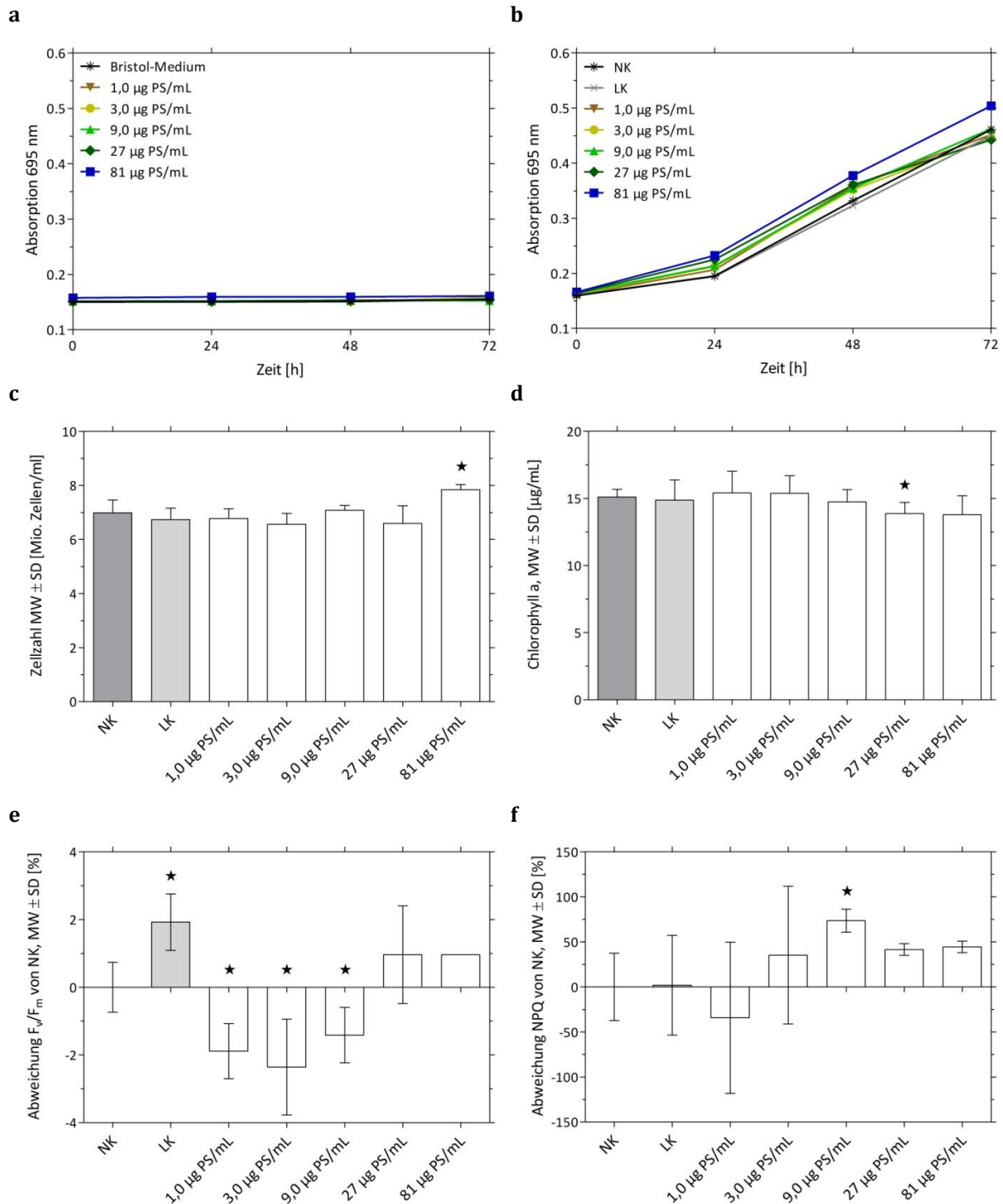


Abb. 64) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. reinhardtii* und PS-COOH. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

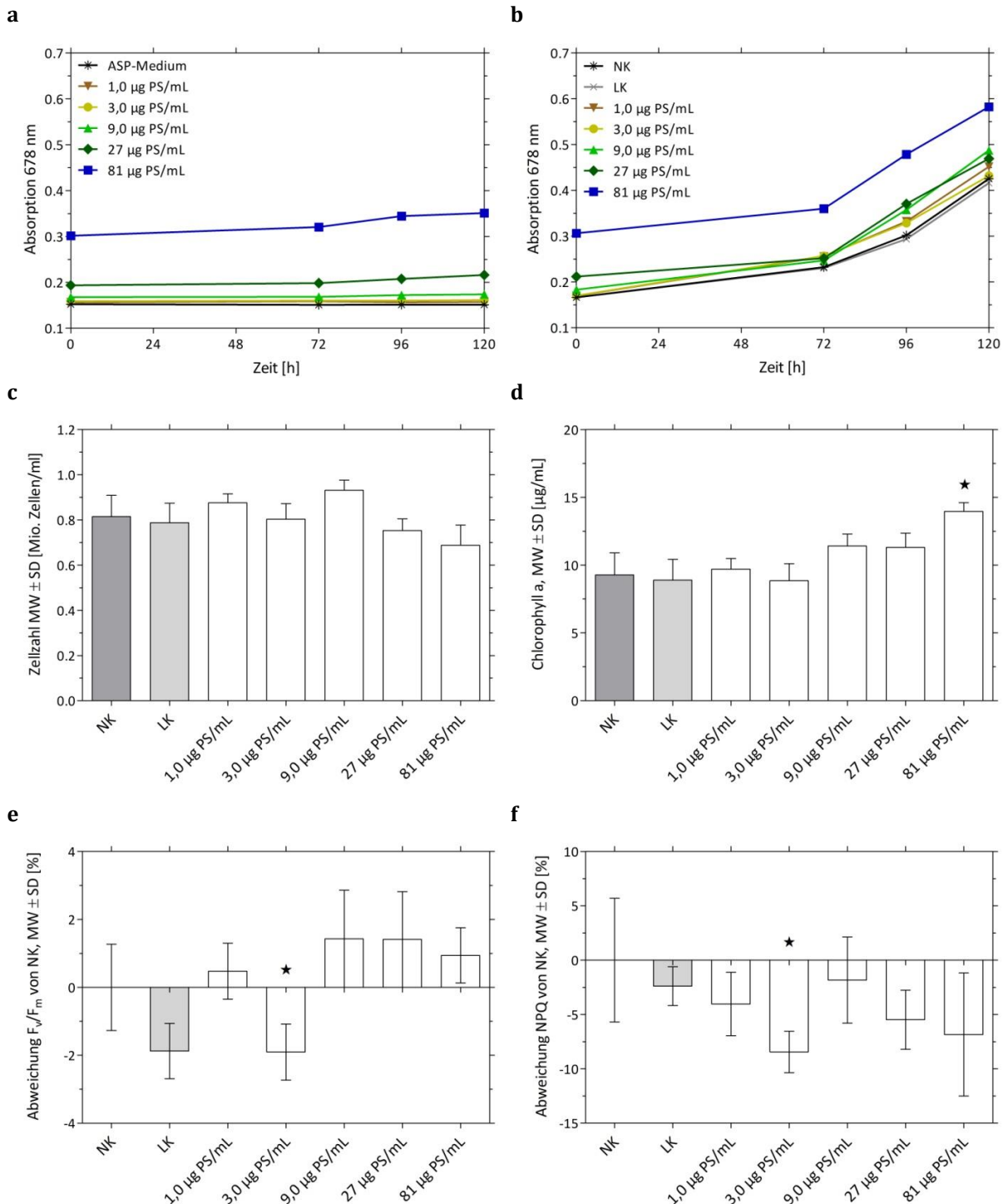


Abb. 65) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. meneghiniana* und PS-COOH. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 120 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 120 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 120 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 120 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 120 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 120 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

PS-NH₂

Absorption der Blindproben sowie der testsubstanzexponierten Algenkulturen

Die PS-NH₂ wiesen in beiden Medien weitgehend ähnliche Absorptionswerte wie das Medium selbst auf, dessen Messwerte zwischen 0,15 und 0,16 lagen (Abb. 66a, Abb. 67a, Abb. 68a). Mit zunehmender NP-Konzentration wurde eine geringfügige Erhöhung beobachtet. Bei der höchsten untersuchten Konzentration (81 µg PS/mL) wurde im Bristol-Medium ein Maximalwert von 0,21 und im ASP-Medium von 0,20 erreicht. Die Werte blieben im Verlauf des Versuchs weitgehend auf einem Niveau.

Befanden sich neben den Nanomaterialien auch Algen in den Proben, stiegen die Absorptionswerte in allen Fällen mit der Zeit an (Abb. 66b, Abb. 67b, Abb. 68b). Bei den höheren Konzentrationen waren zu Beginn des Versuchs etwas höhere Absorptionswerte zu beobachten als bei den Kontrollen.

Zellzahl

Die Zellzahl war bei *C. reinhardtii* und *C. meneghiniana* in den Behandlungsgruppen mit NP teilweise signifikant gegenüber dem Kontrollniveau erhöht (Abb. 67c, Abb. 68c). Dies betraf bei der Grünalge die beiden höchsten (81; 27 µg PS/mL) und bei der Diatomee alle Konzentrationen bis auf die zweitniedrigste (81 – 9 µg PS/mL; 1 µg PS/mL). Bei diesem Versuch zeigte zudem die LK einen signifikanten Effekt im Sinne einer Erhöhung. In Bezug auf *R. subcapitata* wurden bezüglich der Zellzahl keine signifikanten Abweichungen von der NK festgestellt (Abb. 66c).

Chlorophyllgehalt

Während bei *C. reinhardtii* eine signifikante Reduktion des Chl a-Gehalts bei der zweithöchsten Konzentration (27 µg PS/mL) auftrat, kam es bei den beiden übrigen Algen zu signifikanten Zunahmen des Gehalts gegenüber der NK (Abb. 66d, Abb. 67d, Abb. 68d). Hiervon war bei *R. subcapitata* die zweitniedrigste Konzentration (3 µg PS/mL) betroffen, bei *C. meneghiniana* waren bei den drei höchsten Konzentrationen (81 – 9 µg PS/mL) sowie der LK signifikante Effekte nachweisbar.

Chlorophyllfluoreszenz

Bezüglich des Stressparameters F_v/F_m zeigte *R. subcapitata* keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollniveau, wohingegen bei der NPQ die Werte bei allen Konzentrationen (81 – 1 µg PS/mL) signifikant gegenüber der NK verringert waren (Abb. 66e, f). Auch bei *C. meneghiniana* war eine signifikante Reduktion der NPQ erkennbar, von der die beiden höchsten sowie die zweitniedrigste Konzentration (81; 27; 3 µg PS/mL) betroffen waren (Abb. 68f). Im

Versuch mit *C. reinhardtii* traten hingegen bei den drei höchsten Konzentrationen (81 – 9 µg PS/mL) signifikant erhöhte Werte auf (Abb. 67f).

Die F_v/F_m -Werte von *C. reinhardtii* und *C. meneghiniana* wiesen jeweils bei der mittleren NP-Konzentration (9 µg PS/mL) signifikant von der NK abweichende Erhöhungen auf (Abb. 67e, Abb. 68e). Bei der Grünalge war zudem die zweitniedrigste Konzentration (3 µg PS/mL) von einer signifikanten Zunahme von F_v/F_m betroffen. Die Abweichungen von der NK betragen in diesen Fällen jeweils weniger als 3 %.

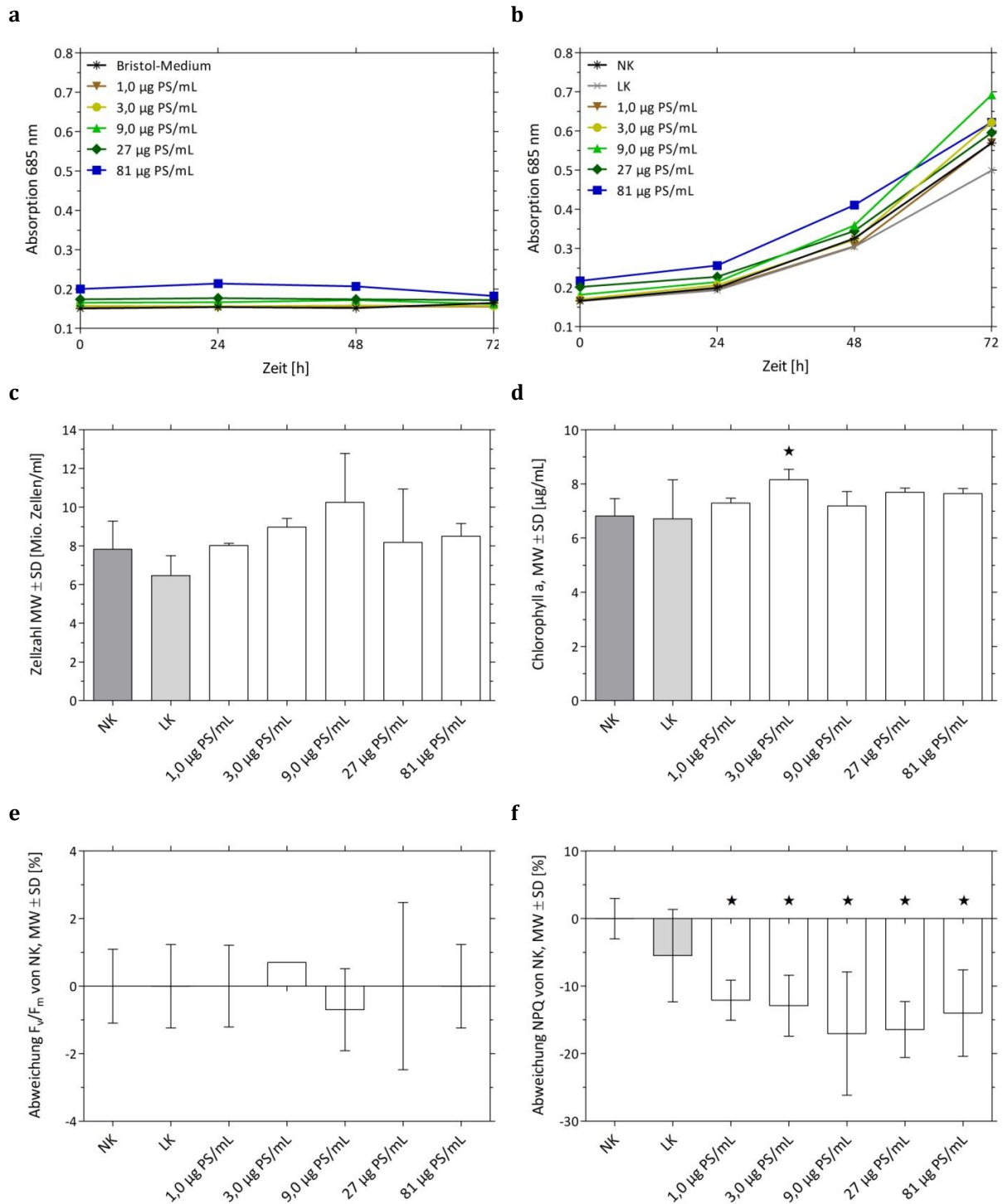


Abb. 66) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *R. subcapitata* und PS-NH₂. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m-Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

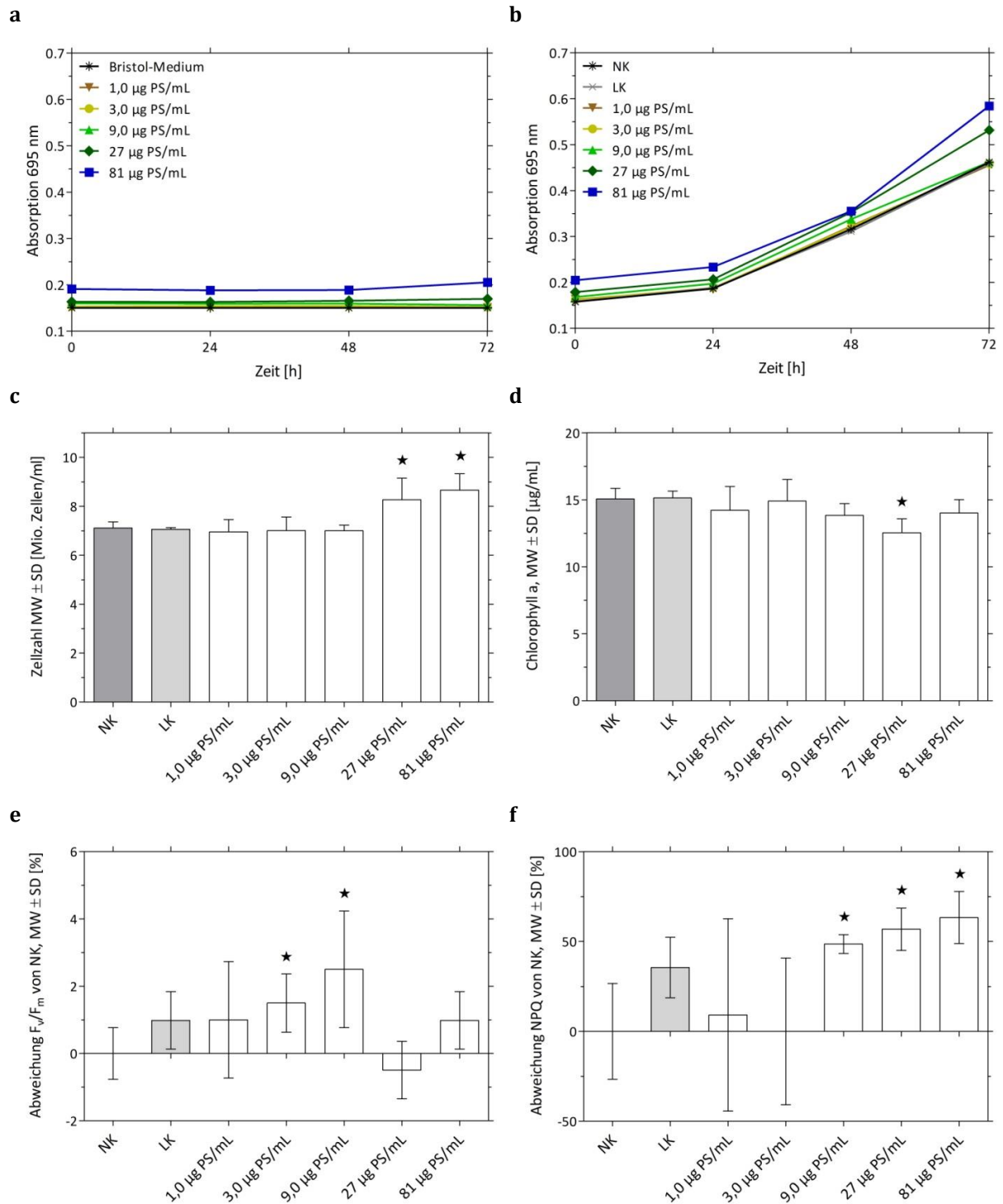


Abb. 67) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. reinhardtii* und PS-NH₂. (a) Absorptionswerte der Nanopartikel in Medium über 72 h, (b) Absorptionswerte der Nanopartikel in Algenkultur über 72 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 72 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 72 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m -Werts von der NK ± SD nach 72 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 72 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

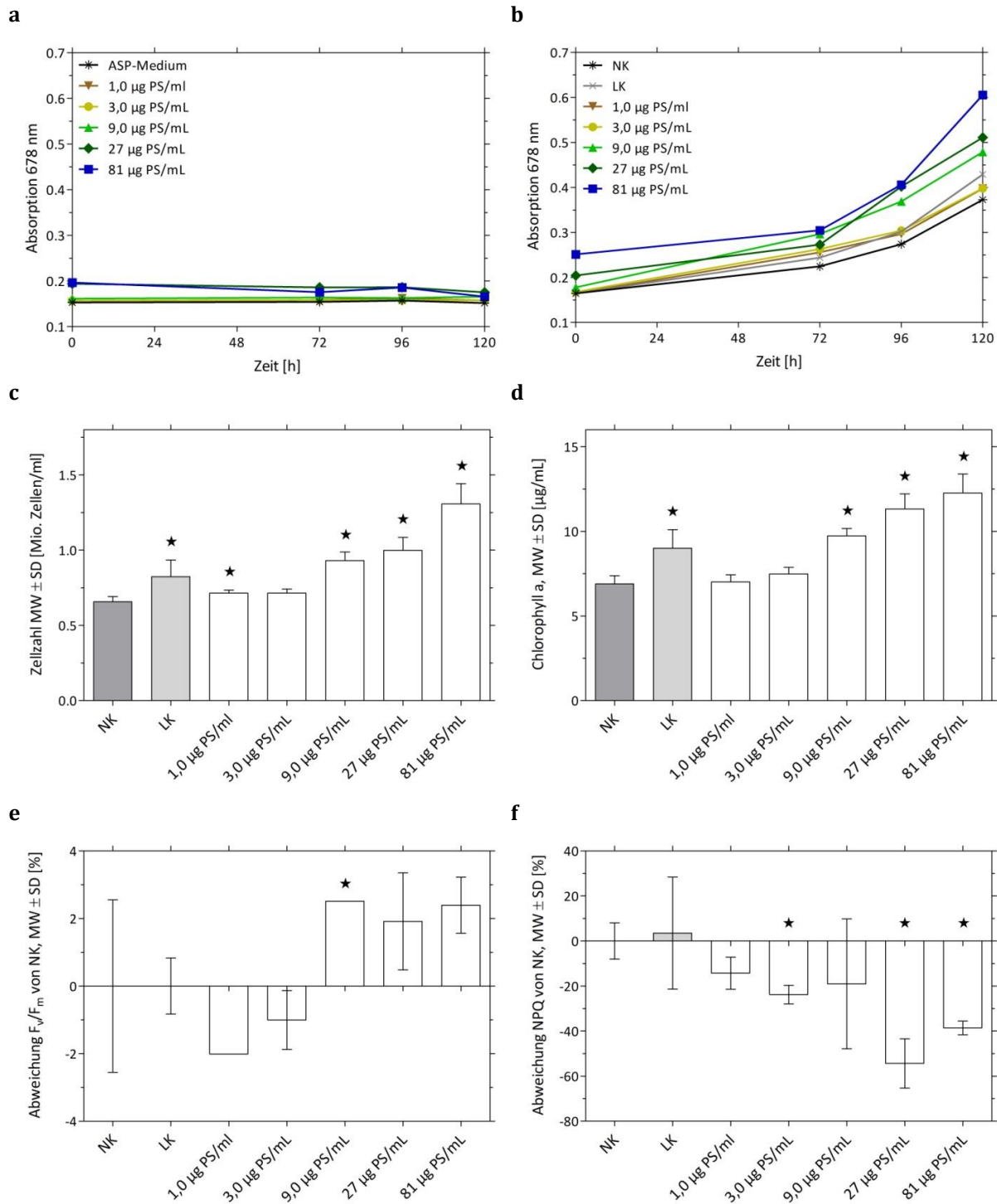


Abb. 68) Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchung von *C. meneghiniana* und PS-NH₂. (a) Absorptionwerte der Nanopartikel in Medium über 120 h, (b) Absorptionwerte der Nanopartikel in Algenkultur über 120 h, (c) MW Zellzahl ± SD nach 120 h, (d) MW Chl a-Gehalt ± SD nach 120 h, (e) Prozentuale Abweichung des F_v/F_m-Werts von der NK ± SD nach 120 h, (f) Prozentuale Abweichung des NPQ-Werts von der NK ± SD nach 120 h. n = 6 (NK) bzw. 3 (übrige Behandlungsgruppen). Darstellung signifikanter Abweichungen von der NK (*: p < 0,05) gemäß dem Mann-Whitney-Test.

8.3.4 EC₅₀, LOEC, NOEC

Aus den Ergebnissen der Toxizitätstests wurde für die einzelnen Versuche die Konzentration ermittelt, bei der ein halbmaximaler Effekt auftritt (EC₅₀). Berechnet wurde der Wert in der vorliegenden Arbeit für Effekte auf die Zellzahl und den Chlorophyllgehalt am jeweiligen Versuchsende. Die EC₅₀-Werte sowie LOEC und NOEC für negative Effekte sind in Tab. 6 aufgeführt. Die entsprechenden Werte für positive Effekte, wie sie im Zusammenhang mit den PS-NP festgestellt wurden, sind in Tab. 7 dargestellt. Eine Auflistung aller berechneten EC₅₀-Werte sowie des jeweils zugehörigen 95 %-Konfidenzintervalls und der Anpassungsgüte können dem Anhang (Tab. 14, Tab. 15) entnommen werden. In Bezug auf die TiO₂-NP wurde im Zusammenhang mit der Zellzahlmessung von einer Abbildung der EC₅₀, LOEC und NOEC abgesehen, da von einer Beeinflussung der Messung durch die Nanomaterialien ausgegangen werden muss. Eine ausführliche Erläuterung hierzu kann Kapitel 9.4.1 entnommen werden.

Tab. 6) EC₅₀-Werte, LOEC und NOEC bezogen auf Verringerungen der Endpunkte Zellzahl und Chl a-Gehalt nach 72 h (*R. subcapitata*, *C. reinhardtii*) bzw. 120 h (*C. meneghiniana*). Fehlende Werte: a = Ermittlung einer eindeutigen Dosis-Wirkungskurve nicht möglich, b = keine signifikanten, konzentrationsabhängigen Effekte der Testsubstanz nachweisbar, c = aufgrund von Messartefakten keine Ermittlung von aussagekräftigen Werten.

Testsubstanz	Testorganismus	Einheit	Zellzahl			Chlorophyllgehalt		
			EC ₅₀	LOEC	NOEC	EC ₅₀	LOEC	NOEC
AgPure	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	19,6	9,00	3,00	16,0	9,00	3,00
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	a	81,0	27,0	a	27,0	9,00
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	1,59	1,11	0,37	1,42	1,11	0,37
Ag-COOH	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	17,2	≤ 1,00	< 1,00	15,7	9,00	3,00
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	a	81,0	27,0	a	81,0	27,0
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	a	1,11	0,37	2,67	1,11	0,37
Ag-NH ₂	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	a	81,0	27,0	a	27,0	9,00
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	b	> 243	≥ 243	b	> 243	≥ 243
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	3,64	0,37	0,12	a	0,37	0,12
AgNO ₃	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	16,3	9,00	3,00	14,4	3,00	1,00
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	28,9	27,0	9,00	22,7	27,0	9,00
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	a	≤ 0,12	< 0,12	a	≤ 0,12	< 0,12

Testsubstanz	Testorganismus	Einheit	Zellzahl			Chlorophyllgehalt		
			EC ₅₀	LOEC	NOEC	EC ₅₀	LOEC	NOEC
TiO ₂ -n	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	c	c	c	a	≤ 3,70	< 3,70
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	c	c	c	a	300	100
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	c	c	c	34,5	33,3	11,1
TiO ₂ -COOH	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	c	c	c	a	300	100
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	c	c	c	b	> 300	≥ 300
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	c	c	c	a	33,3	11,1
TiO ₂ -NH ₂	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	c	c	c	288	100	33,3
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	c	c	c	b	> 300	≥ 300
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	c	c	c	a	100	33,3
PS-n	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	b	> 81,0	≥ 81,0
PS-COOH	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	b	> 81,0	≥ 81,0
PS-NH ₂	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	b	> 81,0	≥ 81,0

Tab. 7) EC₅₀-Werte, LOEC und NOEC für Erhöhungen der Endpunkte Zellzahl und Chl a-Gehalt nach 72 h (*R. subcapitata*, *C. reinhardtii*) bzw. 120 h (*C. meneghiniana*). Fehlende Werte: a = Ermittlung einer eindeutigen Dosis-Wirkungskurve nicht möglich, b = keine signifikanten, konzentrations-abhängigen Effekte der Testsubstanz nachweisbar.

Testsubstanz	Testorganismus	Einheit	Zellzahl			Chlorophyllgehalt		
			EC ₅₀	LOEC	NOEC	EC ₅₀	LOEC	NOEC
PS-n	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	a	9,00	3,00	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	a	9,00	3,00	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	a	9,00	3,00	39,3	9,00	3,00

Testsubstanz	Testorganismus	Einheit	Zellzahl			Chlorophyllgehalt		
			EC ₅₀	LOEC	NOEC	EC ₅₀	LOEC	NOEC
PS-COOH	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	a	≤ 1,00	< 1,00	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	a	81,0	27,0	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	a	81,0	27,0
PS-NH ₂	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	b	> 81,0	≥ 81,0	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	a	27,0	9,00	b	> 81,0	≥ 81,0
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	a	9,00	3,00	8,87	9,00	3,00

Negative Effekte

Im Hinblick auf die Zellzahl konnten sechs EC₅₀-Werte ermittelt werden, bezüglich des Chlorophyllgehalts waren es acht (Tab. 6). Bei rund der Hälfte der Versuche konnten zudem LOEC und NOEC bestimmt werden, da signifikante Effekte im untersuchten Konzentrationsbereich auftraten. Insbesondere bei der Untersuchung der Zellzahlveränderung unter Anwesenheit von PS-NP zeigte die jeweils höchste getestete Konzentration keine signifikante Verringerung gegenüber der NK. Auch bei anderen Nanomaterialien wurden in Versuchen mit *C. reinhardtii* keine negativen Effekte beobachtet. In diesen Fällen wurde angenommen, dass die NOEC höher als die höchste getestete Konzentration war oder ihr entsprach und, dass die LOEC in jedem Fall höher als die höchste getestete Konzentration war. Es trat auch der umgekehrte Fall mehrfach auf, wobei alle NP-Behandlungsgruppen gegenüber der NK signifikante Unterschiede aufwiesen. In diesen Fällen wurde angegeben, kleiner welchem Wert die NOEC bzw. kleiner oder gleich welchem Wert die LOEC war.

Toxizität der Testsubstanzen

Die geringsten EC₅₀-Werte in Bezug auf die beiden Endpunkte Zellzahl und Chl a-Gehalt traten in Versuchen mit AgNO₃, gefolgt von Ag-COOH und AgPure auf. Insgesamt lagen die zwölf für die silberhaltigen Testsubstanzen ermittelten Effektwerte zwischen 14,4 ng Ag/mL und 3,64 µg Ag/mL. Die EC₅₀-Werte, welche in zwei Fällen für TiO₂-NP ermittelt wurden, waren mit 34,5 und 288 µg TiO₂/mL deutlich höher.

Die EC₅₀ und LOEC-Werte zeigten, dass insbesondere die Ag-NP und das Silbernitrat bereits bei Konzentrationen im unteren Nanogramm-Bereich Effekte auf Zellzahl und Chl-Gehalt hatten. Im unteren Mikrogramm-Bereich begann gemäß der EC₅₀- und LOEC-Werte eine Beeinflussung des Chlorophyllgehalts der Testorganismen durch TiO₂-n und TiO₂-COOH. Für die modifizierten TiO₂-NP waren erste Effekte in einigen Versuchen erst bei LOEC Werten von 100 bzw.

300 µg TiO₂/mL nachweisbar oder es traten keinerlei signifikanten Veränderungen gegenüber der NK auf.

Einfluss der Partikelmodifikation

Ein Vergleich der EC₅₀-Werte von verschiedenen silberhaltigen Testsubstanzen eines Testorganismus war für *R. subcapitata* und *C. meneghiniana* möglich. Für diese beiden Arten konnten somit Vergleiche hinsichtlich der Toxizität der unterschiedlich modifizierten Ag-NP sowie des Silbernitrats gezogen werden. Im Fall der Grünalge waren die ermittelte EC₅₀ sowohl für die Zellzahl als auch den Chlorophyllgehalt in Gegenwart von AgNO₃ am niedrigsten (16,3 bzw. 14,6 ng Ag/mL). Etwas höhere Effektwerte traten in den Versuchen mit den carboxylierten NP auf (Zellzahl: 17,2 ng Ag/mL, Chl a-Gehalt: 15,7 ng Ag/mL). Darauf folgten die EC₅₀-Werte der unmodifizierten NP, welche in Bezug auf die Zellzahl bei 19,6 ng Ag/mL und den Chlorophyllgehalt bei 16 ng Ag/mL lagen.

Die Versuchsreihe mit *C. meneghiniana* zeigte, dass der ermittelte EC₅₀-Wert des Chl a-Gehalts für unmodifizierte Partikel (1,42 µg Ag/mL) niedriger als der entsprechende Effektwert für Ag-COOH (2,67 µg Ag/mL) war. Auch bei der Betrachtung der EC₅₀-Werte der Zellzahl lag für die unmodifizierten Ag-NP eine geringere Konzentration (1,59 µg Ag/mL) als für die aminierten Partikel (3,64 µg Ag/mL) vor.

Die Testreihen mit den beiden Grünalgen zeigten unter Berücksichtigung der LOEC-Werte, dass die NH₂-modifizierten Ag- und TiO₂-NP erst bei höheren Konzentrationen Effekte auslösten als die nicht modifizierten und carboxylierten Nanoobjekte sowie das Silbernitrat. Im Zusammenhang mit der Diatomee war kein eindeutiger Einfluss der Modifikation auf die beobachteten Effekte erkennbar.

Eignung der Testorganismen

Der zwischenartliche Vergleich offenbarte, dass die EC₅₀-Werte der silberhaltigen Testsubstanzen in den Versuchen mit *R. subcapitata* durchgehend niedriger waren als die entsprechenden Werte von *C. reinhardtii* und *C. meneghiniana*. Die LOEC-Werte zeigten zudem, dass in Bezug auf *R. subcapitata* ausnahmelos bei niedrigeren Ag-Konzentrationen signifikante Effekte ausgelöst wurden als bei den beiden anderen Testorganismen. Ein Vergleich der Reaktion von *C. reinhardtii* und *C. meneghiniana* war auf Grundlage der EC₅₀-Werte nicht möglich, da für keine der Testsubstanzen Werte für beide Arten ermittelt werden konnten. Die LOEC-Werte zeigten jedoch in den Fällen, in denen entsprechende Werte für beide Arten vorlagen, dass signifikante Abweichungen von der NK bei *C. meneghiniana* bei höheren Konzentrationen auftraten als bei *C. reinhardtii*.

In Bezug auf die TiO₂-NP war ein zwischenartlicher Vergleich der EC₅₀-Werte nicht möglich, da keine Werte für eine Testsubstanz von verschiedenen Organismen vorlagen. Die LOEC-Werte zeigten jedoch, dass signifikante Abweichungen von der NK bei *C. reinhardtii* durchgehend bei höheren Konzentrationen auftraten als bei *R. subcapitata* und *C. meneghiniana*. Bei den beiden letztgenannten Arten zeigten die LOEC-Werte keine durchgehend sensitivere Reaktion der einen oder anderen Mikroalge.

Sensitivität der Endpunkte

Für fünf Versuche mit silberhaltigen Testsubstanzen konnte die EC₅₀ sowohl für die Zellzahl als auch für den Chlorophyllgehalt berechnet werden. In jedem dieser Fälle war der ermittelte Effektwert für den Chlorophyllgehalt niedriger als für die Zellzahl, wobei der Faktor zwischen 1,1 und 1,3 betrug. In zehn Fällen konnte zudem anhand der LOEC-Werte ermittelt werden, bei welcher Konzentration erste signifikante Effekte bei den beiden Endpunkten nachweisbar waren. Bei sechs Versuchen waren die LOEC-Werte für Zellzahl und Chlorophyllgehalt identisch. In drei Fällen traten signifikante Effekte beim Chlorophyllgehalt bei einer niedrigeren Konzentration als bei der Zellzahl auf und in einem Fall war es umgekehrt.

In Bezug auf die TiO₂-NP war ein Vergleich der Endpunktsensitivität nicht möglich, da keine aussagekräftigen EC₅₀- oder LOEC-Werte für die Zellzahl ermittelt worden waren.

Positive Effekte

In zwei Fällen konnten für die beobachtete Zunahme des Chl a-Gehalts EC₅₀-Werte berechnet werden (Tab. 7). Da nicht in allen Versuchen mit PS-NP Effekte auftraten bzw. bei allen untersuchten Konzentrationen Effekte nachweisbar waren, lagen genaue LOEC-Werte nur in neun Fällen vor.

Wirkung der Testsubstanzen

Die beiden ermittelten EC₅₀-Werte wurden für Effekte auf den Chl a-Gehalt in Versuchen mit *C. meneghiniana* bestimmt und betragen für die PS-n 39,9 µg PS/mL und für die PS-NH₂ 8,37 µg PS/mL. Die LOEC-Werte zeigten, dass erste signifikante Effekte bei einer Konzentration von 1 µg PS/mL im Versuch mit PS-COOH auftraten.

Einfluss der Partikelmodifikation

Der Vergleich der beiden ermittelten EC₅₀-Werte in Bezug auf die Partikelmodifikation zeigt, dass PS-NH₂ bei einer geringeren Konzentration eine Zunahme des Chlorophyllgehalts verursachten als PS-n (8,37 bzw. 39,9 µg PS/mL).

In Bezug auf die LOEC lagen Werte von vier Vergleichsgruppen vor. Ein versuchsübergreifendes Muster hinsichtlich der Partikelmodifikation und der Konzentration, bei der erste signifikante Effekte auftreten, war nicht ersichtlich.

Eignung der Testorganismen

Da beide ermittelten EC₅₀-Werte von Versuchen mit *C. meneghiniana* stammen, war ein interspezifischer Vergleich der Testorganismen auf Grundlage dieser Werte nicht möglich. In Bezug auf die LOEC zeigte sich, dass das Konzentrationsniveau, bei dem signifikante Effekte auf Zellzahl und Chl a-Gehalt auftraten, bei *C. meneghiniana* in vier von sechs Fällen niedriger als bei den beiden Grünalgen war. Im Versuch mit PS-n war die LOEC der Zellzahl für alle drei Arten identisch und im Versuch mit PS-COOH traten die Effekte auf die Zellzahl bei den Grünalgen bei geringeren Konzentrationen auf als bei der Kieselalge. Da bezüglich des Chlorophyllgehalts im Zusammenhang mit PS-NP keine Effekte auf *R. subcapitata* und *C. reinhardtii* festgestellt wurden, beschränkte sich der Vergleich zwischen den beiden Arten auf die LOEC-Werte der Zellzahl. Es zeigte sich, dass in den Versuchen mit PS-COOH *R. subcapitata* eine niedrigere LOEC aufwies als *C. reinhardtii*. Im Versuch mit PS-NH₂ war es umgekehrt und in Bezug auf die unmodifizierten PS-NP traten die ersten signifikanten Effekte bei identischen Konzentrationen auf.

Sensitivität der Endpunkte

Da nur für den Chlorophyllgehalt EC₅₀-Werte vorlagen, war ein Vergleich der beiden Endpunkte auf Grundlage dieser Daten nicht möglich. Die LOEC-Werte zeigten allerdings, dass in fünf Fällen signifikante Effekte auf die Zellzahl nachweisbar waren, während in Bezug auf den Chlorophyllgehalt keine Abweichung vom Kontrollniveau feststellbar war. In zwei Fällen traten erste Effekte auf die beiden Endpunkte bei identischen Konzentrationen auf und in einem Fall waren hinsichtlich des Chl a-Gehalts Abweichungen von der NK zu beobachten, während gleichzeitig keine Auswirkungen auf die Zellzahl zu beobachten waren. In einem Versuch wurden für beide Endpunkte keinerlei Effekte ermittelt, sodass ein Vergleich nicht möglich war.

8.4 Elektronenmikroskopische Zelluntersuchung

In diesem Kapitel werden beispielhaft Aufnahmen von Zellen jener Versuche abgebildet, bei denen optische Auffälligkeiten im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchung beobachtet wurden. Aufnahmen der unauffälligen Zellen der übrigen Versuche können dem Anhang (Abb. 82 bis Abb. 107) entnommen werden.

8.4.1 *Raphidocelis subcapitata*

Im TEM waren bei den Zellen der NK von *R. subcapitata* verschiedene Schnittebenen erkennbar, darunter sowohl Längs- als auch Querschnitte (Abb. 69a). In den Zellen konnten unter anderem Organellen wie Zellwand, Zellkern, Chloroplasten, Mitochondrien und Vakuolen identifiziert werden (Abb. 69b, c).

Im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Algen, welche gegenüber den Testsubstanzen exponiert worden waren, konnte keine Aufnahme von NP in die Zellen beobachtet werden. Auffälligkeiten bezüglich der Zellstruktur, verglichen mit der NK, traten im Fall der Exposition gegenüber TiO₂-n auf (Abb. 70). In den übrigen Behandlungsgruppen konnten keine optischen Veränderungen nachgewiesen werden.

TiO₂-n

Die Zellen waren im TEM gut erkennbar und es lagen verschiedenen Schnittebenen vor (Abb. 70a). Zwischen den Zellen befanden sich Agglomerate aus TiO₂-NP. Beim Vergleich des Zellaufbaus dieser Zellen mit jenen der NK war festzustellen, dass deutlich mehr Lipidvakuolen erkennbar waren (Abb. 70b, c). Zudem zeigten sich außen an den Zellwänden der Algen Ansammlungen von NP.

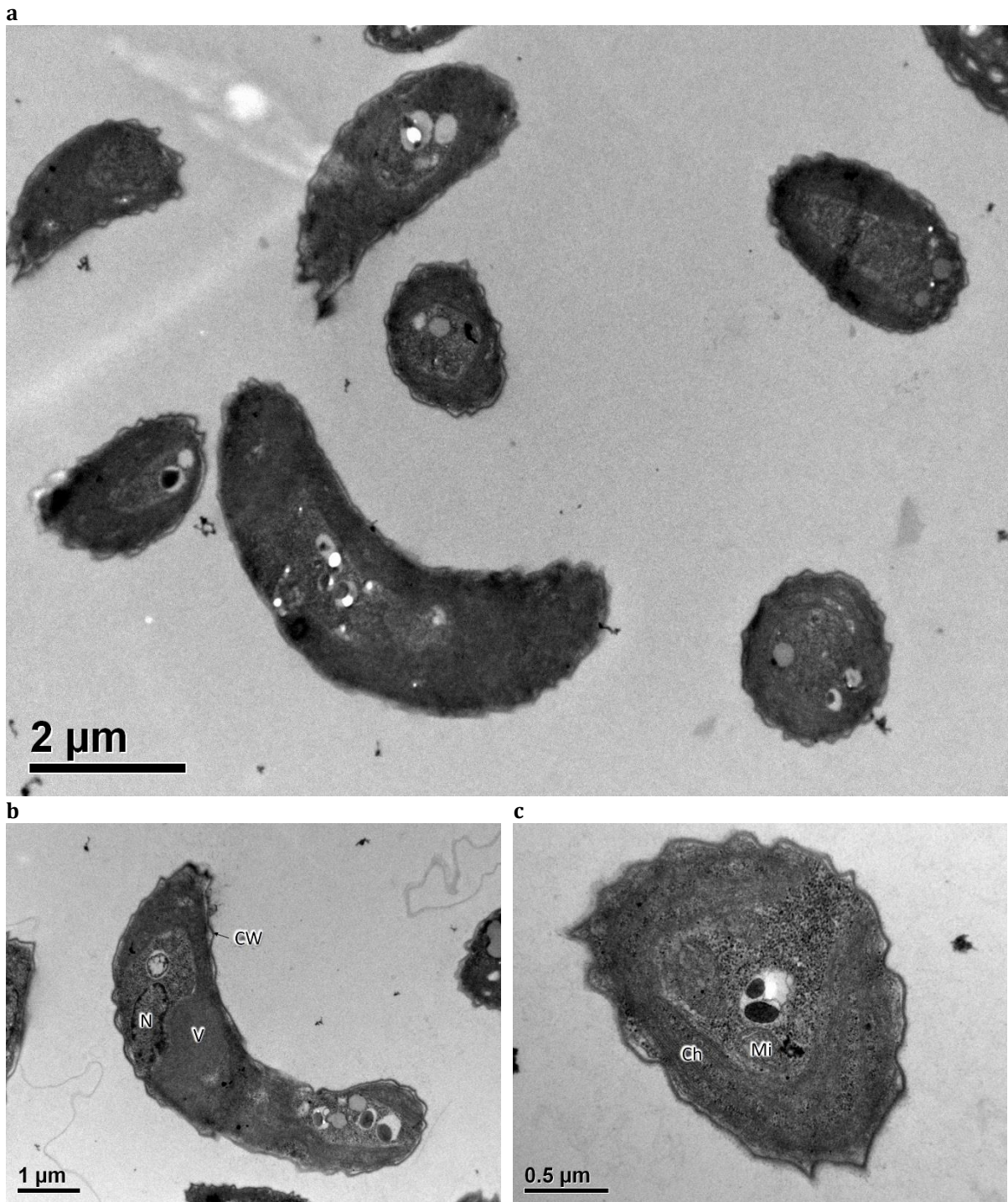


Abb. 69) Schnitte durch Zellen der Negativkontrolle von *R. subcapitata* im TEM. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Längsschnitt einer einzelnen Zelle, (c) Querschnitt einer einzelnen Zelle. Beschriftung: Ch = Chloroplast, CW = Zellwand, N = Zellkern, Mi = Mitochondrium, V= Vakuole.

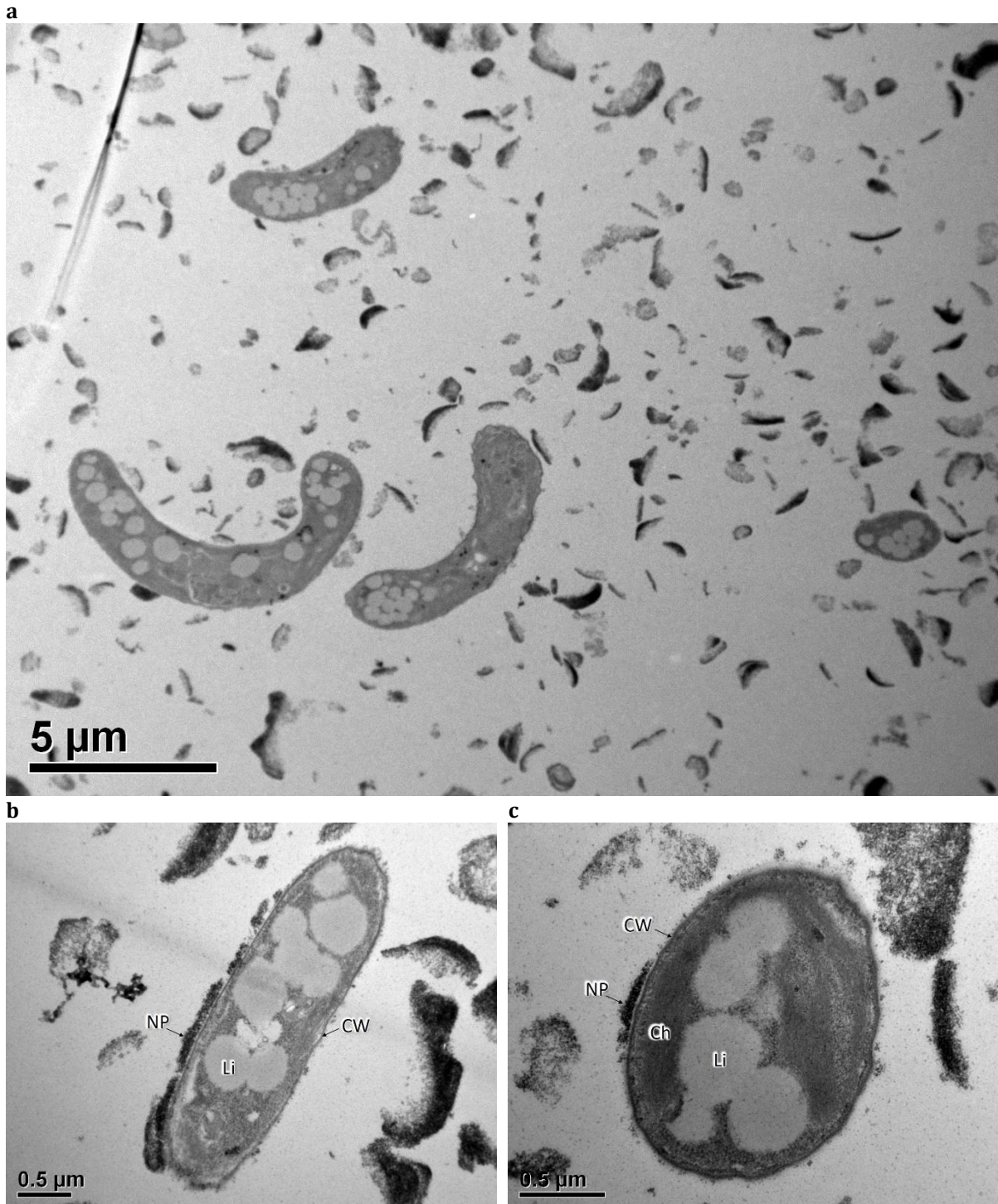


Abb. 70) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *R. subcapitata* nach 72-stündiger Exposition gegenüber $\text{TiO}_2\text{-n}$ in einer Konzentration von $300 \mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Längsschnitt einer einzelnen Zelle, (c) Querschnitt einer einzelnen Zelle. Beschriftung: Ch = Chloroplast, CW = Zellwand, Li = Lipidvakuole, NP = Nanopartikelansammlung.

8.4.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Die elektronenmikroskopische Betrachtung der NK von *C. reinhardtii* zeigte mehrere Zellen in unterschiedlichen Schnittebenen (Abb. 71a). Es waren Zellorganellen wie z. B. die Zellwand, der becherförmige Chloroplast, Vakuolen, das Pyrenoid sowie das Flagellum erkennbar (Abb. 71b, c).

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung der testsubstanzexponierten Algen, konnte keine Aufnahme von NP in die Zellen beobachtet werden. Strukturelle Veränderungen im Vergleich mit den Zellen der NK traten in zwei Versuchen auf. Sowohl die TiO₂-n als auch das Silbernitrat bewirkten eine erkennbare Veränderung der Zellmorphologie.

AgNO₃

Die Algenzellen wiesen eine deutliche morphologische Veränderung gegenüber der NK auf. Der Protoplast war bei den meisten Zellen zusammengezogen und von der Zellwand losgelöst (Abb. 72a, b). Viele der Mikroalgen ließen zudem eine gegenüber der NK erhöhte Stärkeeinlagerung erkennen (Abb. 72a, c).

TiO₂-n

Die Zellen wiesen teilweise starke Veränderungen im Vergleich zu den Zellen der Kontrollreihe auf. Die Zellorganellen wirkten fragmentiert und waren nicht mehr eindeutig identifizierbar (Abb. 73a). Zellwand und Zellmembran zeigten ebenfalls starke Beschädigungen bzw. waren nicht mehr zu erkennen. Um die Zellen herum befanden sich NP-Agglomerate. Einige Zellen waren in der abgebildeten Schnittebene nahezu vollständig von Partikeln umschlossen (Abb. 73b). Ein weiterer Unterschied zu den Zellen der NK bestand in einem verstärkten Auftreten von länglich-ovalen Stärkeeinlagerungen in den Zellen (Abb. 73a, c).

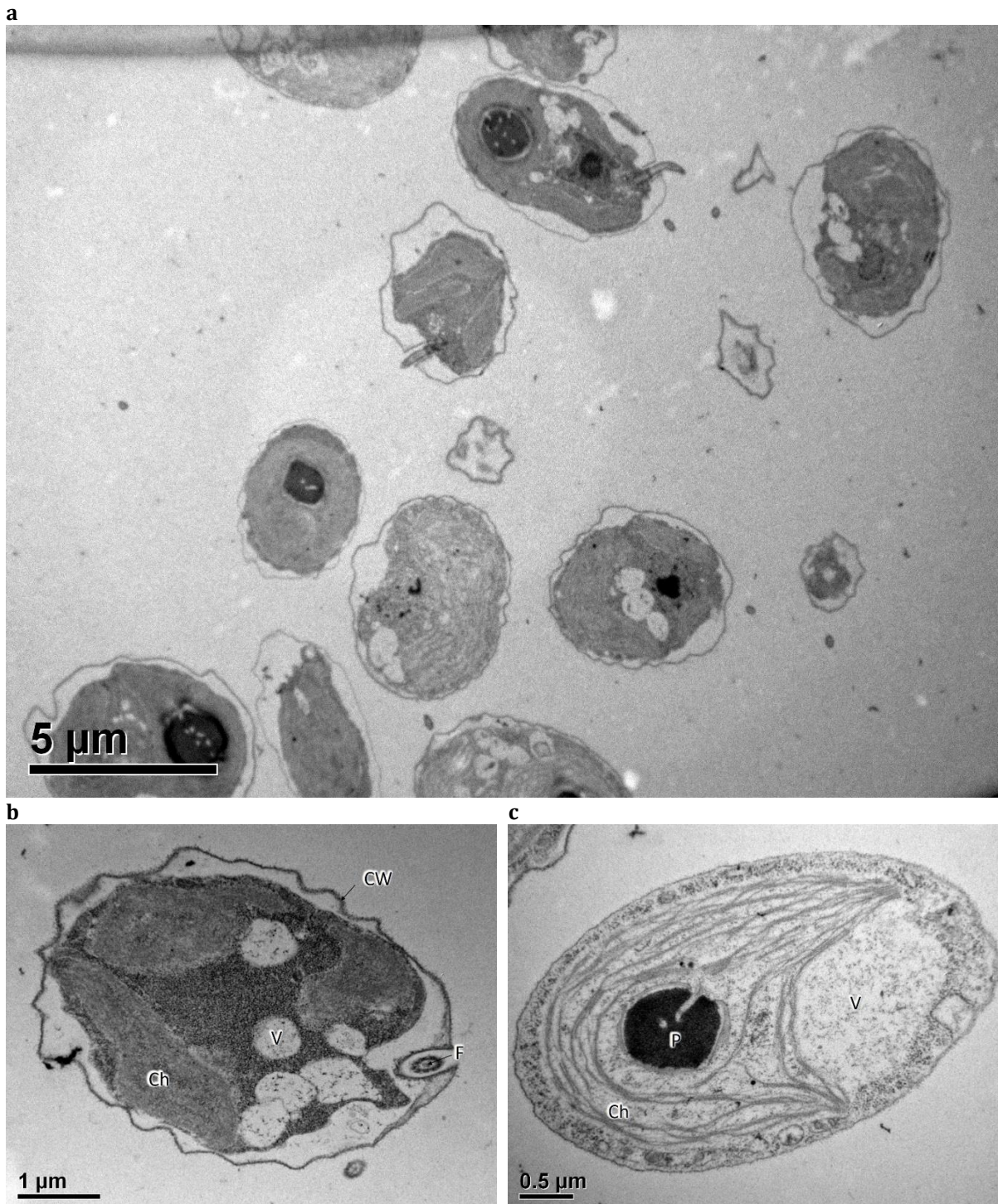


Abb. 71) Schnitte durch Zellen der Negativkontrolle von *C. reinhardtii* im TEM. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b, c) Detailaufnahmen einzelner Zellen unterschiedlicher Schnittebenen. Beschriftung: Ch = Chloroplast, CW = Zellwand, F = Flagellum, P = Pyrenoid, V= Vakuole.

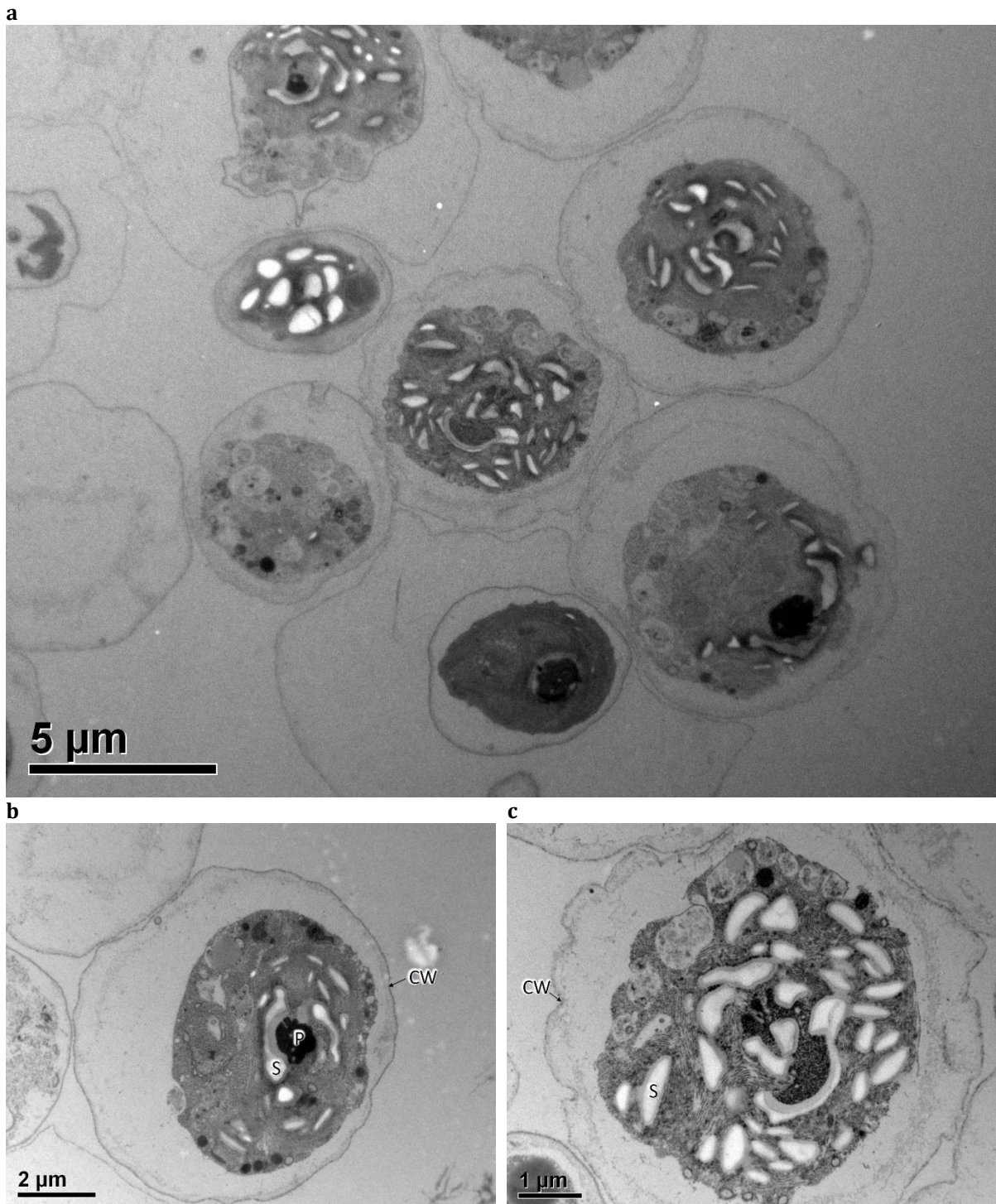


Abb. 72) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. reinhardtii* nach 72-stündiger Exposition gegenüber AgNO_3 in einer Konzentration von 27 ng Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b, c) Detailaufnahmen einzelner Zellen unterschiedlicher Schnittebenen. Beschriftung: CW = Zellwand, P = Pyrenoid, S = Stärkeeinlagerung.

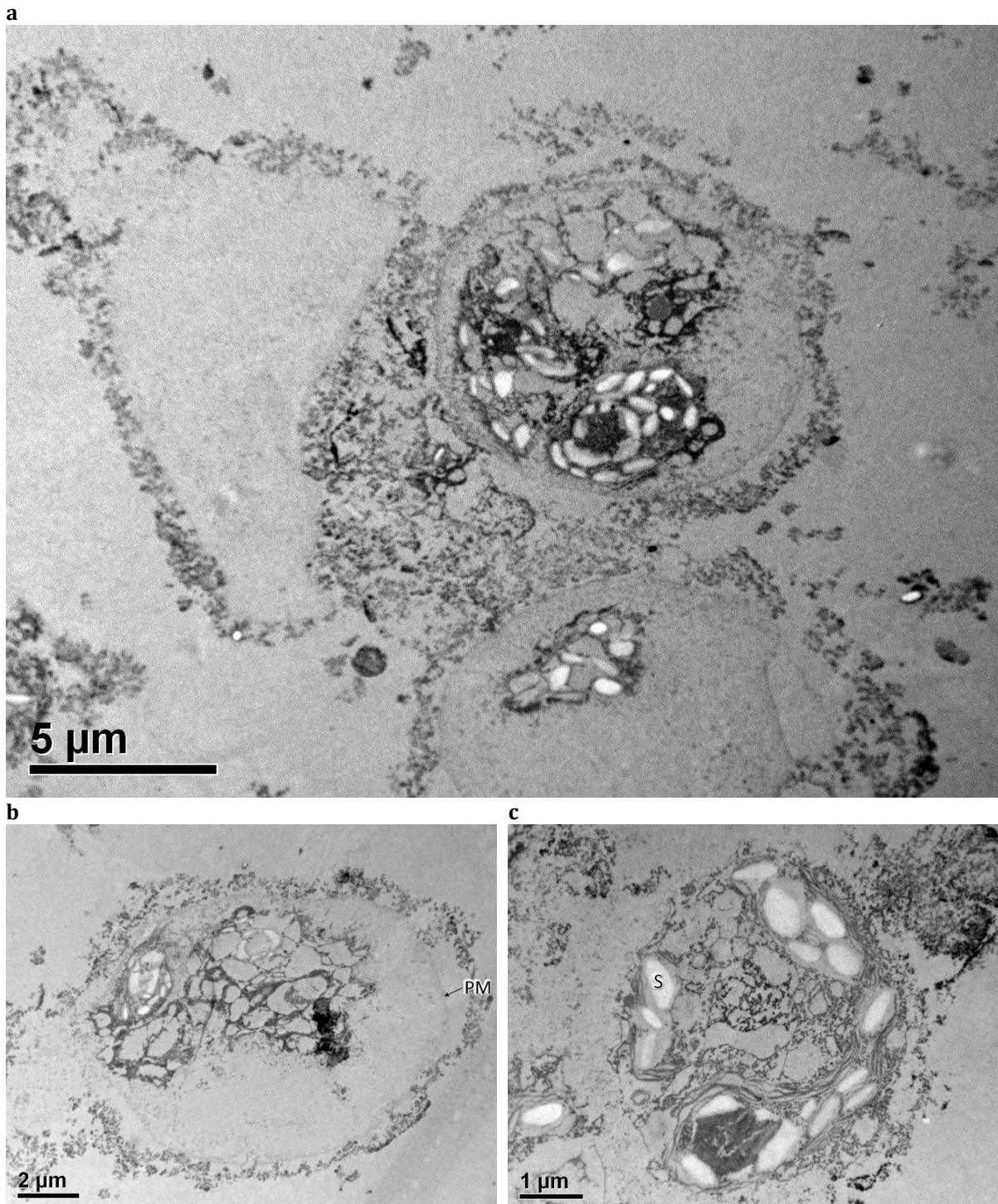


Abb. 73) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. reinhardtii* nach 72-stündiger Exposition gegenüber TiO_2 -n in einer Konzentration von $300 \mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b, c) Detailaufnahmen einzelner Zellen unterschiedlicher Schnittebenen. Beschriftung: PM = Zellmembran, S = Stärkeeinlagerung.

8.4.3 *Cyclotella meneghiniana*

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellen der NK von *C. meneghiniana* zeigte unterschiedliche Schnittebenen durch die Algenzellen. Neben der siliziumdioxidhaltigen Zellhülle waren Zellkern, Vakuole und Chloroplasten abgrenzbar (Abb. 74a, b, c).

Die TEM-Untersuchung der testsubstanzexponierten Algenzellen lieferte keine Hinweise auf eine Aufnahme von Nanomaterialien durch die Zellen. Eine Veränderung der Zellstruktur gegenüber den Kontrollzellen war im Fall der Exposition gegenüber Ag-COOH erkennbar.

Ag-COOH

Die Zellen wiesen fragmentierte Zellorganellen auf, die sich nicht eindeutig voneinander abgrenzen ließen (Abb. 75a). Der Protoplast war teilweise von der Zellwand zurückgezogen (Abb. 75b). Die Chloroplasten waren aufgrund der stark fragmentierten Membransysteme nur anhand des Pyrenoide erkennbar (Abb. 75b, c).

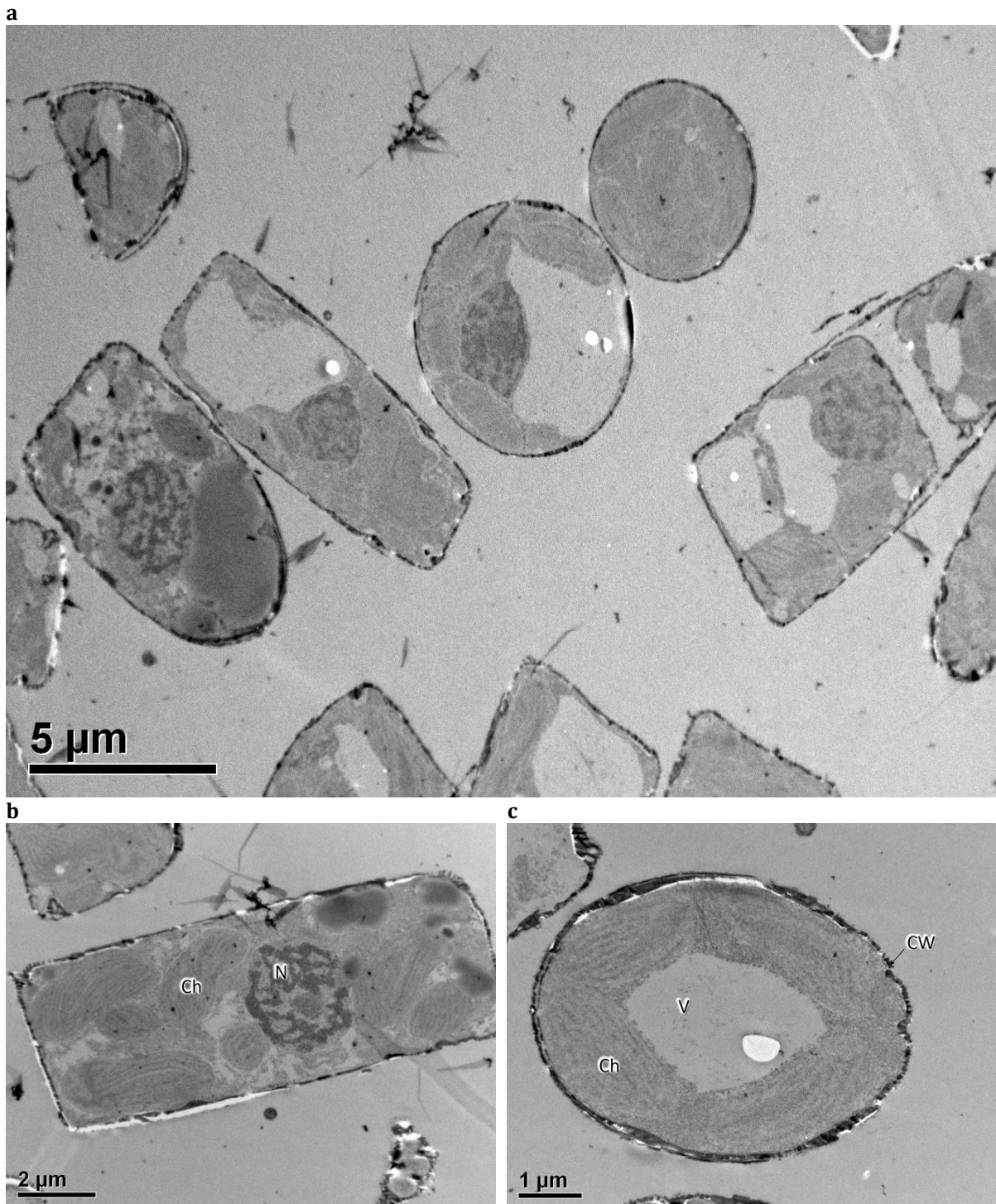


Abb. 74) Schnitte durch Zellen der Negativkontrolle von *C. meneghiniana* im TEM. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Längsschnitt einer einzelnen Zelle, (c) Querschnitt einer einzelnen Zelle. Beschriftung: Ch = Chloroplast, CW = Zellwand, N = Zellkern, V = Vakuole.

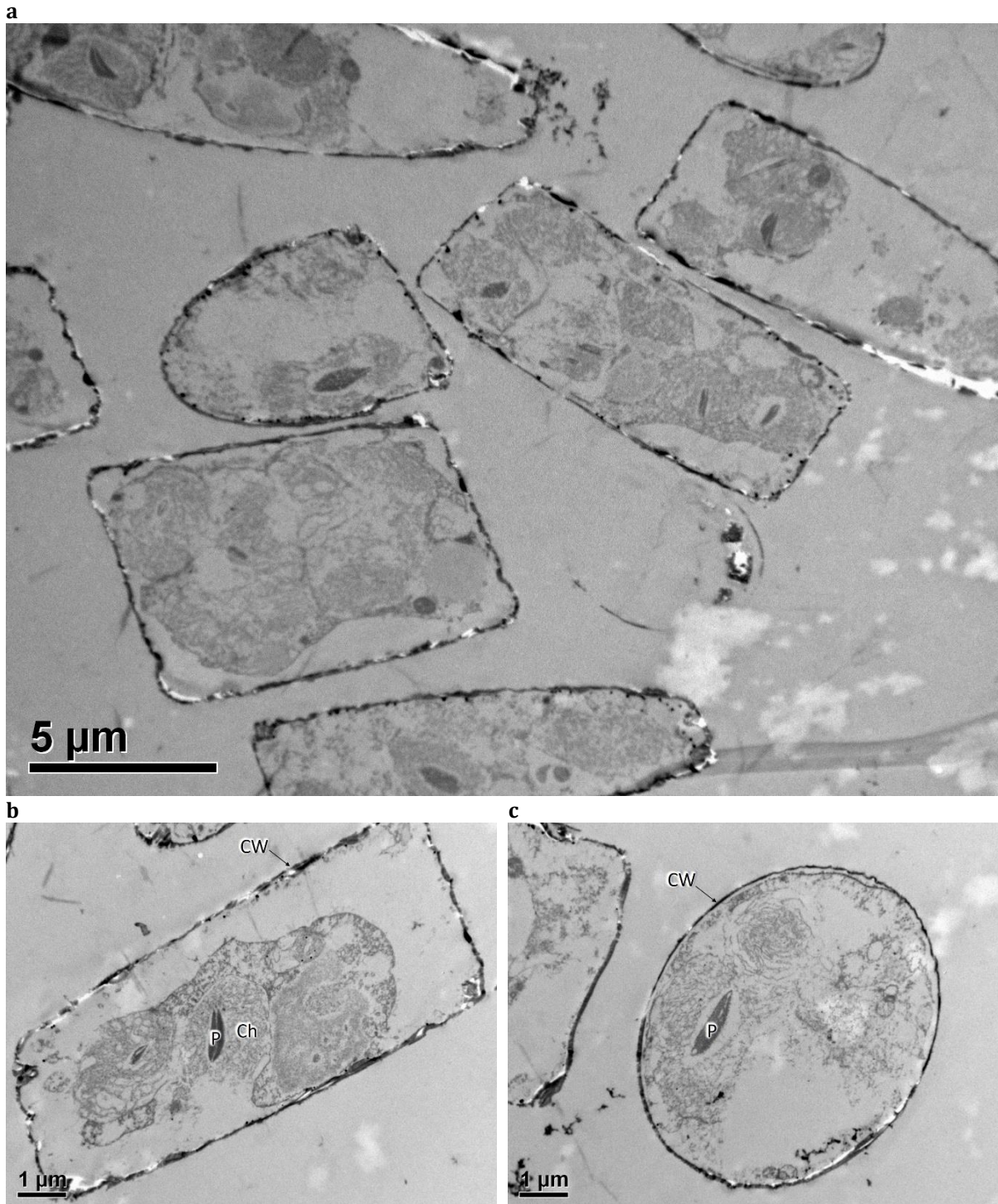


Abb. 75) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. meneghiniana* nach 120-stündiger Exposition gegenüber Ag-COOH in einer Konzentration von 3,33 μg Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b, c) Detailaufnahmen einzelner Zellen unterschiedlicher Schnittebenen. Beschriftung: Ch = Chloroplast, CW = Zellwand, P = Pyrenoid.

9 Diskussion (Teil II)

9.1 Umrechnung der Absorption in die Zellzahl

Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurden das Wachstum bzw. die Zellzahl der Algen indirekt über die Messung der Absorption bestimmt. Um eine vergleichbare Größe zu erhalten, wurde eine Umrechnung der Messwerte in die Zellzahl durchgeführt.

Die Korrelation zwischen Absorption und Zellzahl beruht auf physikalischen Grundsätzen. Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz wird die Intensität einer Strahlung beim Durchgang einer absorbierenden Substanz abgeschwächt. Die Abschwächung erfolgt in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanz, der Schichtdicke des durchstrahlten Körpers sowie dem Extinktionskoeffizienten. Aufgrund dieses Gesetzes ist zu erwarten, dass die Absorption einer Algenkultur in definiertem Volumen mit zunehmender Zellzahl ansteigt. Je mehr Zellen sich zwischen der Lichtquelle und dem Detektor des Photometers befinden, desto mehr Licht wird absorbiert. Diese indirekte Messung der Zellzahl ist weit verbreitet und wird bereits seit Jahrzehnten angewandt (OECD, 2011; RODRIGUES et al., 2011; LEWIS et al., 1994; APHA & AWWA, 1989).

RODRIGUES et al. (2011) konnten in ihrer Untersuchung zeigen, dass der Zusammenhang zwischen Absorption und Zellzahl weitgehend linear ist. Ab einer Zellzahl von ca. 5×10^6 Zellen nimmt die Abweichung von der Linearität jedoch deutlich zu, was auf die gegenseitige Beschattung der Zellen untereinander zurückgeführt wird. Daher wird empfohlen, die Proben zu verdünnen (RODRIGUES et al., 2011). Da die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht mit Standard-Küvetten, mit einem Lichtweg von 1 cm, sondern in Well-Platten durchgeführt wurden, war die zu durchstrahlende Probe weniger als 3 mm dick und somit die Anzahl an Zellen zwischen Lichtquelle und Detektor deutlich geringer als es bei der gleichen Zell-Konzentration in einer 1 cm-Küvette der Fall gewesen wäre. Ein maßgeblicher Einfluss von Beschattungseffekten auf die Messergebnisse ist somit nicht zu erwarten und konnte auch nicht beobachtet werden. Die ermittelten Umrechnungsfaktoren können somit plausibel zur Berechnung der Zellzahl verwendet werden.

9.2 Absorptionsverhalten der Nanopartikel

Während der Toxizitätsuntersuchungen wurden Absorptionsmessungen von mit NP versetztem Algenkulturmedium vorgenommen. Diese Blindprobe und ihr Vergleich mit den gegenüber NP exponierten Algenkulturen geben Hinweise auf das substanzspezifische Absorptionsverhalten der Nanomaterialien.

In Bezug auf den Versuchsaufbau muss berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse für die Blindprobe auf dem Messwert von nur einem Replikat pro Konzentration beruhen und daher eine gewisse Fehleranfälligkeit gegeben ist, da Ausreißerwerte nicht durch die Einbeziehung weiterer Replikate und die Bildung eines MW abgeschwächt werden. Dennoch liefern die Messergebnisse über den Vergleich der verschiedenen Konzentrationen und den zeitlichen Verlauf Hinweise auf das Absorptionsverhalten der Nanomaterialien, welche insbesondere in der Methodenbewertung (vgl. Kapitel 9.4.1) von Relevanz sind.

Für einige der untersuchten NP wurden vom Hersteller PlasmaChem Absorptionsspektren zur Verfügung gestellt. Diese lassen Rückschlüsse darauf zu, ob die untersuchten Partikel im für die Absorptionsmessung verwendeten Wellenlängenbereich Licht absorbieren oder ob mögliche Effekte eher auf Streuung zurückgeführt werden können. Die Spektren sind im Anhang (Abb. 108, Abb. 109) abgebildet. Entsprechende Messungen liegen nicht für alle Partikel vor, weshalb nicht in jedem Fall eine sichere Unterscheidung zwischen Absorption und Streuung vorgenommen werden kann.

9.2.1 Silber-Nanopartikel und Silbernitrat

In Bezug auf Ag-NP liegen nur für die beiden modifizierten Partikeltypen Absorptionsspektren von PlasmaChem vor. Diese zeigen für beide Partikel eine Absorptionsbande zwischen 400 und 410 nm. Während die Absorption für die Ag-COOH gegen einen Wert von null tendiert, zeigt das Spektrum der Ag-NH₂, dass im langwelligeren Bereich nach der Absorptionsbande Streuungsverhalten besteht, welches an dem konstanten Absorptionswert (ca. 0,2) zu erkennen ist.

Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass im Bristol-Medium im Rahmen der Absorptionsmessung der Blindproben keine Absorption bzw. Streuung der NP oder des Silbernitrats erkennbar ist, weshalb kein Einfluss der Testsubstanzen auf die Absorptionsmessung der Algenkulturen zu erwarten ist. Im ASP-Medium ist bezüglich der gemessenen NP-Absorptionen bei der höchsten untersuchten Konzentration durchaus eine Zunahme des Absorptionswerts gegenüber den anderen Behandlungsgruppen erkennbar, welche im Verlauf des Versuchs abnimmt. Im Fall des Silbernitrats tritt ebenfalls ein erhöhter Absorptionswert auf, der jedoch tendenziell mit der Zeit zunimmt. Dass im ASP-Medium im Gegensatz zum Bristol-Medium ein Effekt erkennbar ist, kann daraus resultieren, dass eine wesentlich höhere NP- bzw. Silbernitrat-Konzentration von 10 µg Ag/mL in den Versuchen mit der Diatomee eingesetzt wurde, während die Grünalgen maximal gegenüber 0,24 µg Ag/mL exponiert wurden. Der mit fortschreitender Versuchsdauer beobachtete Rückgang der Absorption bzw. Streuung kann dadurch bedingt sein, dass die NP Silberionen abgeben und somit nach und nach in Lösung gehen, wodurch ihr Durchmesser reduziert und die Streuung verringert wird. Im Fall von Silbernitrat war keine Streuung zu erwarten, da sich das Silbersalz in wässrigen Medien löst. Ein möglicher Grund für

den dennoch auftretenden deutlichen Effekt kann die Zusammensetzung des ASP-Kulturmediums sein. Dieses enthält im Vergleich zu Süßwasser-Medien einen vergleichsweise hohen Anteil an Natriumchlorid (NaCl), um die ökologischen Ansprüche der hauptsächlich im Brackwasser vorkommenden Kieselalge *C. meneghiniana* abzudecken. Die dem NaCl entstammenden Chlorionen gehen wahrscheinlich in Lösung und stehen somit den gelösten Silberionen aus dem Silbernitrat als Reaktionspartner zur Verfügung. Unter diesen Voraussetzungen kann sich im Medium Silberchlorid (AgCl) bilden. Dieses Silbersalz ist in Wasser nahezu unlöslich, weshalb damit zu rechnen ist, dass es ausfällt und als Feststoff zu einer Beeinflussung der Absorptionsmessung führen kann. Es wurde bereits gezeigt, dass sich unter dem Einfluss von pflanzlichen Extrakten NP aus Silberchlorid bilden (SHETE et al., 2014) bzw. sich in Zellen NP aus Ionen assimilieren können (TRIPATHI et al., 2017; LECLERC & WILKINSON, 2014; BARWAL et al., 2011). Ein Auftreten von solchen neu gebildeten Partikeln unbekannter Größe im Medium könnte den Effekt des Silbernitrats auf die Absorptionsmessung erklären.

Da die beobachteten Unterschiede im Absorptionsverhalten der NP und des Silbernitrats überwiegend sehr gering sind und zudem in sehr ähnlicher Ausprägung in den Algenkulturmessungen auftreten, stellt der Abzug des Absorptionswerts der Blindprobe von den Messwerten der Algenkulturen eine sinnvolle Korrektur zur Ermittlung der algeneigenen Absorption dar. In einzelnen Fällen kommt es dadurch allerdings bei der Berechnung der Zellzahl zu niedrigen negativen Werten. Dies kann damit begründet werden, dass besonders bei niedrigen Absorptionswerten eine gewisse Messungenauigkeit auftritt. Da eine negative Zellzahl biologisch keinen Sinn ergibt, da zumindest die zu Beginn der Messung eingesetzten Zellen nachweisbar sein sollten, ist bei den entsprechenden Versuchen davon auszugehen, dass kein nachweisbares bzw. nur sehr geringes Wachstum stattgefunden hat.

9.2.2 Titandioxid-Nanopartikel

Für die untersuchten TiO₂-NP liegen Absorptionsspektren von PlasmaChem vor, die für TiO₂-n und TiO₂-COOH keine Absorption im für die Toxizitätsuntersuchung verwendeten Wellenlängenbereich zeigen. Bei diesen Partikeln ist somit davon auszugehen, dass auftretende Effekte durch Streuung verursacht werden. In Bezug auf TiO₂-NH₂ kann neben der Streuung auch die Absorption eine Rolle spielen, da im Absorptionsspektrum eine sehr breite Absorptionsbande um 413 nm zu sehen ist. Deren langwellige Flanke zieht sich bis in den für die Toxizitätsuntersuchung verwendeten Wellenlängenbereich hinein.

Insgesamt verursachen die TiO₂-NP mitunter eine starke Streuung bei der Messung der Absorption der Blindproben, was zum einen durch die vergleichsweise sehr hohen eingesetzten Konzentrationen und zum anderen durch den hohen Brechungsindex von TiO₂ bedingt sein kann. Hinzu kommt, dass bei den beiden Grünalgen, welche im gleichen Medium untersucht wurden,

Unterschiede bei den beiden Messungen der Blindproben gleicher Konzentration auftreten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass insbesondere die TiO_2 -n unter gleichen Bedingungen ein nicht einheitliches Streuungsverhalten zeigen, was dazu führt, dass die Absorptionsmessung insgesamt mit Unsicherheiten behaftet ist, deren Ursprung auf Basis der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden kann. Es lassen sich aus den Ergebnissen jedoch Rückschlüsse ziehen, welche Faktoren einen Einfluss auf das Streuungsverhalten der NP haben könnten. Die Streuung ist unter anderem vom verwendeten Medium abhängig. So wurden im ASP-Medium, obwohl hier niedrigere NP-Konzentrationen verwendet wurden, zumindest für TiO_2 -n und TiO_2 -COOH deutlich höhere Absorptionswerte gemessen als im Bristol-Medium. Als Grund hierfür ist von Interaktionen der NP mit Mediumbestandteilen auszugehen, welche eventuell zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Partikel führen. Es ist zu erwarten, dass bei einer sehr gleichförmigen Verteilung der Partikel mehr Licht absorbiert bzw. gestreut wird als es bei einer inhomogenen Verteilung der Fall ist. Somit ergeben sich vermutlich höhere Absorptionswerte als bei einer Probe, in der die NP zu Zusammenlagerungen neigen. In Kulturen von *C. meneghiniana* war zudem teilweise eine Abnahme der Absorptionswerte mit der Zeit zu beobachten, auch wenn die Werte der Blindproben weitgehend konstant waren und zu erwarten gewesen wäre, dass die Absorptionswerte aufgrund zunehmender Zellzahlen ansteigen. Die Abnahme der Absorptionswerte ist ein Hinweis auf eine Interaktion der Algen mit den NP, welche zu einer geringeren Streuung der Partikel führen könnte. Mögliche Gründe hierfür sind, dass die Algen und NP sich aneinander anheften, wie es im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchung beobachtet wurde. Hier wurden Ansammlungen von NP im Bereich der äußeren Zellwand festgestellt. Zudem könnten Stoffwechselprodukte der Algen im Medium zu einer Verklumpung der NP führen. In jedem Fall zeigen die Ergebnisse, dass sich das Streuungsverhalten der NP in Medium mit und ohne Algen deutlich voneinander unterscheidet. So wurden für die Proben, welche nur Medium und NP enthielten, mitunter deutlich höhere Absorptionswerte ermittelt als für jene Proben, in welchen sich zusätzlich Algen befanden. Auch die Oberflächenmodifikation scheint einen Einfluss auf das Streuungsverhalten der Nanomaterialien zu haben (vgl. Kapitel 9.2.4).

In Bezug auf die TiO_2 -NP hat die Streuung und teilweise die Absorption in Abhängigkeit von verwendetem Medium und Partikelmodifikation einen großen Einfluss auf die Absorptionsmessung. Eine Korrektur der Absorptionswerte der Algenkulturen durch den Abzug des ermittelten Blindwerts ist für TiO_2 -NP aus mehreren Gründen nicht empfehlenswert. Zum einen liefert die Absorptionsmessung der NP in verschiedenen Versuchen nicht immer reproduzierbare Ergebnisse, sodass die Aussagekraft der gemessenen Werte gering ist. Zum anderen wurde gezeigt, dass sich das Streuungsverhalten der NP bei der Anwesenheit von Algen deutlich vom Verhalten in der Blindprobe unterscheidet und ein Abzug des Blindwerts somit keine sinnvollen Ergebnisse liefert.

9.2.3 Polystyrol-Nanopartikel

Für die PS-NP liegen keine Absorptionsspektren von PlasmaChem vor, sodass keine sichere Unterscheidung vorgenommen werden kann, ob Effekte auf Absorption oder auf Streuung beruhen.

Die PS-NP verursachen trotz der vergleichsweise hohen eingesetzten Konzentrationen nur eine geringe Veränderungen des Absorptionswerts gegenüber dem Messwert des Mediums ohne Partikel. Bei einigen Partikeln sind die Effekte im ASP-Medium etwas stärker ausgeprägt, was auf Einflüsse durch das Medium schließen lässt. Sofern Absorption bzw. Streuung auftritt, werden die entsprechenden Effekte auf die Absorptionswerte nicht nur in der Blindprobe, sondern auch in der zugehörigen Messung der Algenkultur sichtbar, wie z. B. anhand eines erhöhten Werts zu Beginn des Tests festgestellt werden kann, da hier noch kein Einfluss der NP auf die Zellzahlentwicklung zu erwarten ist und dennoch der Absorptionsmesswert höher als in der Kontrolle ohne NP ist.

Die nachgewiesenen Absorptions- bzw. Streuungseffekte der NP sind überwiegend sehr gering und treten zudem auch in den Ergebnissen der Absorptionsmessung der zugehörigen Algenkulturen auf. Daher ist der Abzug des Blindwerts von den Messwerten der Algenkulturen für diese NP als eine sinnvolle Korrektur anzusehen.

9.2.4 Einfluss der Oberflächenmodifikation

Die Streuung der NP schwankt in Abhängigkeit von den beiden verwendeten Kulturmedien mitunter stark, weshalb eine gesonderte Betrachtung erforderlich ist. Im Bristol-Medium sind voneinander abweichende Absorptionswerte der unterschiedlichen Partikelmodifikationen nur im Zusammenhang mit TiO_2 -NP feststellbar. Bei den übrigen Nanomaterialien treten keine deutlichen Effekte auf. In Bezug auf das ASP-Medium sind bei allen drei NP-Materialien absorptionsbezogene Unterschiede zwischen den unterschiedlich modifizierten Partikeltypen zu erkennen.

Titandioxid-Nanopartikel

Bei den TiO_2 -NP ist feststellbar, dass die unmodifizierten Partikel im Bristol-Medium die höchste Streuung verursachen. Darauf folgen die aminierten und schließlich die carboxylierten Partikel. Ziel der Oberflächenmodifikation ist es, für eine gleichmäßigere Verteilung der Partikel in Flüssigkeiten zu sorgen, da sich die Partikel durch die Oberflächenladung abstoßen. Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass Wechselwirkungen zwischen NP-Oberfläche und Mediumsbestandteilen einen gegenteiligen Effekt haben und eher zu einer Zusammenlagerung der Partikel führen, die dann eine geringere Streuung als gleichmäßig verteilte Primärpartikeln verursachen. Dieser Effekt ist auch im ASP-Medium erkennbar, wobei hier allerdings die Streuung der TiO_2 -COOH

höher als die der $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$ ist. Als Grund ist die unterschiedliche Zusammensetzung der Medien anzunehmen, welche das Agglomerationsverhalten beeinflussen kann.

Silber-Nanopartikel

In Bezug auf Ag sind im Bristol-Medium insgesamt keine Effekte erkennbar, während im ASP-Medium die carboxylierten Partikel am stärksten streuen. Der im Zusammenhang mit TiO_2 beobachtete Effekt der höheren Absorption unmodifizierter Partikel ist somit nicht auf Ag-Nanomaterialien übertragbar. Aufgrund des unterschiedlichen Ausgangsmaterials ist davon auszugehen, dass die Interaktion mit Mediumbestandteilen zwischen TiO_2 - und Ag-NP variiert und damit ggf. auch die Partikelverteilung im Medium. Zudem könnte die Oberflächenmodifikation die Abgabe von Silberionen und die Bildung von Silberchlorid beeinflussen, welche sich wiederum auf die Streuung auswirken kann. Welchen Anteil am modifikationsabhängigen Effekt die Entstehung von Silberchlorid bzw. die Zusammenlagerung der Partikel hat, kann anhand der vorliegenden Daten nicht ermittelt werden.

Polystyrol-Nanopartikel

Auch in Bezug auf PS wird eine stärkere Streuung durch PS-COOH als durch die beiden übrigen Partikel verursacht. Dies unterstützt den Erklärungsansatz, dass diese funktionelle Gruppe zumindest bei PS und Ag zu einer besseren Verteilung der Nanoobjekte im ASP-Medium führt.

9.2.5 Fazit

Aufgrund der wenigen vorliegenden Daten und dem Fehlen detaillierter Zusatzuntersuchungen, können die Gründe für das variierende Streuungsverhalten der Nanomaterialien nicht abschließend geklärt werden. Es ist jedoch festzuhalten, dass die Oberflächenmodifikation von Nanomaterialien einen Einfluss auf deren Streuungs- bzw. Absorptionsverhalten haben kann. Ein möglicher Einflussfaktor ist hierbei die Verteilung der Nanomaterialien aufgrund der funktionellen Gruppen. Diese ist allerdings in den verwendeten Medien nicht unbedingt mit dem Verhalten in reinem Wasser vergleichbar, wie es in Teil I dieser Arbeit untersucht wurde. Da es bereits in unterschiedlichen Medien bei dem gleichen NP-Typ zu deutlichen Änderungen des Absorptionsverhaltens kommt, die mitunter aus einem differierenden Verteilungsverhalten resultieren können, ist eine Übertragung der in Wasser ermittelten Ergebnisse hinsichtlich des Nanopartikelverhaltens auf die Kulturmedien nicht sinnvoll. Generell muss berücksichtigt werden, dass die Streuung der NP von verschiedenen Faktoren abhängig ist, worunter das Grundmaterial des Partikels, seine Oberflächenmodifikation, die eingesetzte Konzentration, das Medium sowie die Anwesenheit von Algenzellen sind.

9.3 Beschattungseffekt

Die eingesetzten Nanomaterialmengen führen in einigen Fällen zu einer makroskopisch wahrnehmbaren Trübung bzw. Färbung des Test-Mediums. Signifikante Abweichungen von der NK treten in Bezug auf die Zellzahl jedoch in keinem Fall auf. Es ist daher davon auszugehen, dass die Beschattung durch die Partikel, ohne direkten Kontakt zwischen Algenzellen und Nanoobjekten, in den eingesetzten Konzentrationen keinen messbaren Einfluss auf das Wachstum der Algen hat.

In anderen Arbeiten konnten ähnliche Schlüsse bezüglich des Beschattungseffekts gezogen werden. So konnten für TiO₂-NP und andere Metall-Nanomaterialien bestehend aus Zink-, Kupfer und Ceroxid zwar toxische Effekte bei direktem Kontakt zwischen Organismus und Partikel nachgewiesen werden, die Beschattung von Algen durch Partikel bei physischer Trennung führte jedoch zu keinen negativen Auswirkungen auf das Wachstum (ARUOJA et al., 2009; VAN HOECKE et al., 2009; HUND-RINKE & SIMON, 2006).

Obwohl die Beschattungsversuche aufgrund des erreichten Wachstumsfaktors als valide angesehen werden können, sind die erreichten Zellzahlen jeweils etwas geringer als die bei den Toxizitätsuntersuchungen erreichten Werte. Dies kann aus den unterschiedlichen Haltungsbedingungen resultieren. Aus technischen Gründen wurden in den Beschattungsversuchen gestapelte Well-Platten eingesetzt, während in den Toxizitätsuntersuchungen Glaskolben verwendet wurden. Bei Letzteren befand sich damit lediglich eine Glasschicht zwischen den Zellen und der Lichtquelle. Im Fall der gestapelten Well-Platten waren die Algen durch drei Kunststoffschichten vom Licht getrennt. Zudem kondensierten an den Deckeln der Platten Wassertropfen. Durch diese Faktoren kann es zu einer erhöhten Streuung des Lichts und damit einer reduzierten Lichtintensität gekommen sein. Die veränderten Lichtbedingungen können sich negativ auf das Wachstum der Algen auswirken, da weniger Energie zur Photosynthese und somit zur Zellteilung zur Verfügung steht.

Sowohl positive als auch negative Wachstumseffekte, welche in einem Toxizitätstest auftreten, können somit nicht auf eine Dispersionstrübung durch die Nanomaterialien zurückgeführt werden. Allerdings kann eine verstärkte Anheftung von NP an einzelne Zellen zu einer Beschattung der Organismen oder anderen Beeinträchtigungen, wie einer Verringerung der Mobilität, führen (METZLER et al., 2011). Diese Interaktion zwischen Nanomaterial und Organismus ist jedoch nur bei direktem Kontakt möglich und kann über den durchgeführten Beschattungsversuch daher nicht ausgeschlossen werden. Aufschluss über diese Art von Beschattung kann allerdings ggf. durch die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen erlangt werden.

9.4 Toxizitätsuntersuchung und elektronenmikroskopische Zelluntersuchung

Im Rahmen der Toxizitätsuntersuchungen wurden die vier Endpunkte Zellzahl, Chlorophyllgehalt, F_v/F_m und NPQ ermittelt. Sie sollen zusammen mit den Ergebnissen der transmissionselektronenmikroskopischen Analyse Aufschluss über die Toxizität und Wirkweise der Nanomaterialien sowie die Eignung der gewählten Methoden und Testorganismen geben. In diesem Kapitel werden die hemmenden bzw. negativen Effekte der Nanomaterialien auf die Algenzellen betrachtet. Stimulierende Effekte, wie sie insbesondere im Zusammenhang mit PS-NP nachgewiesen wurden, werden gesondert in Kapitel 9.4.6 betrachtet.

9.4.1 Bewertung der Endpunkte und Testverfahren

Im Rahmen des Wachstumsinhibitionstests wurden mehrere Endpunkte gemessen und ausgewertet. Die Zellzahl ist hierbei eine standardmäßig erhobene Variable (OECD, 2011), welche häufig zur Bewertung der Toxizität von Chemikalien genutzt wird (RODRIGUES et al., 2011; LEWIS et al., 1994). Die Variablen Chlorophyllgehalt, F_v/F_m und NPQ werden zur Untersuchung des Zustands photosynthetisch aktiver Organismen ebenfalls oft eingesetzt (JIANG et al., 2012; MAXWELL & JOHNSON, 2000). Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Zellen insbesondere im Zusammenhang mit Nanomaterialien ist ebenfalls sinnvoll, da hierbei nicht nur morphologische Veränderungen der Organismen, sondern auch eine mögliche Aufnahme von NP in die Zellen nachgewiesen werden können.

Da aus insgesamt 30 Tests Daten zu mehreren Endpunkten vorliegen, kann verglichen werden, welcher von ihnen bereits bei niedrigen Konzentrationen von der Testsubstanz verursachte Effekte anzeigt. In die Betrachtung werden Effekte einbezogen, die eine Konzentrationsabhängigkeit zeigen und damit die Ableitung eines robusten Vergleichswerts (z. B. EC_{50}) erlauben. Nicht berücksichtigt werden einzelne signifikante Werte, welche keinen Zusammenhang mit der steigenden Exposition gegenüber den eingesetzten Substanzen erkennen lassen. Unter Einbeziehung möglicher Nachteile der einzelnen Methoden kann somit eine Gesamtbewertung vorgenommen werden.

Absorption

Bei der Messung der Absorption sind mehrere Fehlerquellen zu berücksichtigen. Um sicherzustellen, dass eine repräsentative Probe entnommen wird, muss der Kolben mehrfach geschwenkt und die Probe anschließend zügig entnommen werden. Eine weitere Ungenauigkeit stellte das ungleichmäßige Absetzen der Zellen in den Well-Platten dar, was zu falschen Messwerten führen kann. Dem kann durch eine Resuspendierung der Zellen kurz vor der Messung entgegengewirkt werden.

Die Untersuchung der Nanopartikelstreuung zeigt, dass diese durchaus einen Einfluss auf die Ergebnisse der Absorptionsmessungen haben kann. Die im Fall von silber- und polystyrol-basierten Testsubstanzen ermittelte Streuung ist vergleichsweise gering und kann als Blindwert von der Absorption der gemessenen Algenkultur abgezogen werden (vgl. Kapitel 9.2). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass sich durch die zusätzlich erforderlichen Messungen Messungenauigkeiten ggf. addieren und die Aussagekraft des Ergebnisses nachlässt. Es müssen dadurch zwar keine starken Verfälschungen des Endergebnisses befürchtet werden, der ermittelte Wert ist jedoch mit Ungenauigkeiten behaftet. Im Fall der TiO₂-NP ist die Eignung der Absorptionsmessung als Methode zur Zellzahlbestimmung als deutlich geringer einzustufen als bei den beiden anderen Materialien, da Einflüsse der Partikel auf die Messung nachgewiesen wurden. Da das Absorptionsverhalten der in den durchgeführten Versuchen eingesetzten Nanomaterialien bei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht wurde, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass Ag- und PS-NP in ähnlich hohen Konzentrationen wie die getesteten TiO₂-NP ebenfalls deutliche Einflüsse auf die Absorptionsmessung haben.

Der angewandte Wachstumsinhibitionstest, welcher die Berechnung der Zellzahl über die Absorption beinhaltet, wird standardmäßig zur Risikoabschätzung von Chemikalien verwendet (OECD, 2011). Das Verfahren ist jedoch, wie auch die übrigen Standardtests, bisher noch nicht an die Untersuchung von Nanomaterialien angepasst. Durch eine 2006 eingerichtete Arbeitsgruppe, welche diese Problematik untersucht, wurde ermittelt, dass die bisher verwendeten Richtlinien auch auf Nanomaterialien anwendbar sind, wobei jedoch teilweise Anpassungen empfohlen werden, insbesondere was die Probenvorbereitung und Dosimetrie betrifft (OECD, 2012b). Im Jahr 2016 wurden schließlich Vorschläge für individuelle Anpassungen der Tests veröffentlicht (HUND-RINKE et al., 2016). Bezüglich des Wachstumsinhibitionstests mit Algen wurden unter anderem die Methoden zur Bestimmung des Zellwachstums näher betrachtet. Bei der Testung von Nanomaterialien kann es demnach zu Komplikationen bei der Ermittlung des Algen-Wachstums kommen. TiO₂-Nanomaterialien können Absorptionsmessungen stören, wobei kein linearer Einfluss zugrunde liegt (HUND-RINKE et al., 2016). HUND-RINKE et al. (2016) empfehlen die Ermittlung der Biomasse über die Bestimmung des Chl a-Gehalts, räumen jedoch ein, dass dieser durch toxische Substanzen auch unabhängig von der Zellteilungsrate beeinflusst werden kann. Insgesamt haben alle gängigen Messmethoden zur Bestimmung der Biomasse Nachteile, welche bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen sind. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen stimmen mit den Beobachtungen von HUND-RINKE et al. (2016) dahingehend überein, dass insbesondere im Zusammenhang mit TiO₂-NP die Messung der Absorption keine geeignete Methode zur Ermittlung der Biomasse-Zunahme von Algenzellen darstellt.

Chlorophyllgehalt

Auch bei der Messung des Chl a-Gehalts ist eine Durchmischung der Zellkultur essentiell, um eine repräsentative Probe entnehmen zu können. Neben der ungleichen Verteilung der Zellen in der Suspension stellt der Verlust von Zellen bei der Entfernung des Überstands nach dem Zentrifugieren eine weitere mögliche Fehlerquelle dar. Die Messung erfordert zudem einen nicht unerheblichen Zeitaufwand und Chemikalieneinsatz. Vorteilhaft ist, dass während der Probenbearbeitung der Hauptteil der NP entfernt wird, sodass die finale Messung unbeeinflusst von den Partikeln stattfinden kann.

Im vorliegenden Fall wurde der Chlorophyllgehalt *in vitro* gemessen und pro Kulturvolumen angegeben. Hierbei kann keine Aussage bezüglich der Unterscheidung, zu welchem Anteil eine Reduktion durch eine verringerte Zellteilung oder einen geringeren Chlorophyllgehalt pro Zelle verursacht wird, getroffen werden. Es wäre möglich gewesen den Chl a-Gehalt pro Zelle zu berechnen, um so Veränderungen der Pigmentmenge im Organismus ggf. von einer Wachstumsinhibition unterscheiden zu können. Allerdings können der Pigmentgehalt einer Zelle und ihr Wachstum nicht als voneinander unabhängige Parameter betrachtet werden. So muss ein reduzierter Chlorophyllgehalt der Zelle nicht zwangsläufig aus einer direkten Schädigung der Chloroplasten resultieren, sondern kann auch durch einen schlechten Allgemeinzustand des Organismus entstehen. Der zusätzliche Erkenntnisgewinn durch eine solche Auswertung ist somit vergleichsweise gering. Zudem hätte eine Berechnung des Chl a-Gehalts pro Zelle eine Berücksichtigung der Zellzahl vorausgesetzt. Um die Methode der Chlorophyllgehaltbestimmung unabhängig bewerten zu können, wurde von der Einbeziehung eines anderen Endpunkts abgesehen. Eine zweifelsfreie Bestimmung der Zellzahl über die verwendete Messmethode wäre zumindest für die TiO₂-NP ohnehin nicht möglich gewesen.

Die Verwendung des Chlorophyllgehalts zur Bewertung des Wachstums von Algen wird in anderen Untersuchungen durchaus kritisch betrachtet (HUND-RINKE et al., 2016; KRUSKOPF & FLYNN, 2006). Es wird eingeräumt, dass der Chlorophyllgehalt durch toxische Substanzen mitunter unabhängig vom Wachstum der Zellen beeinflusst werden kann (HUND-RINKE et al., 2016). KRUSKOPF & FLYNN (2006) betonen, dass sich die Aussagekraft des Parameters lediglich auf die Menge an Chlorophyll beschränkt und nur eingeschränkt Schlussfolgerungen auf das Wachstum und den Allgemeinzustand von Zellen zulässt. Dies kann anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen so nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass für die untersuchten Partikel und Testorganismen durchaus ähnliche Effekte in Bezug auf Zellzahl und Chlorophyllgehalt messbar waren und dass die Bestimmung des Chl a-Gehalts zudem häufig die sensitivste Methode ist.

Die ermittelten EC_{50} -Werte zeigen, dass der Chlorophyllgehalt ein etwas sensitiverer Endpunkt als die Zellzahl ist, die Ergebnisse liegen jedoch nah beieinander. Dies wird auch durch die Auswertung der LOEC bestätigt, welche in vielen Fällen für beide Endpunkte identisch ist, jedoch insgesamt niedrigere Werte für den Chlorophyllgehalt zeigt.

Die etwas höhere Sensitivität des Endpunktes Chl a-Gehalt kann dadurch bedingt sein, dass bei der Messung sowohl ein geringeres Wachstum als auch eine Verringerung des Chlorophyllgehalts der einzelnen Zelle abgebildet wird. Da sich diese beiden Effekte addieren können und damit ein stärkerer Gesamteffekt auftritt, kann dieser eventuell bereits bei niedrigeren Konzentrationen nachgewiesen werden.

Chlorophyllfluoreszenz

Die Methode erfordert nur geringen Materialeinsatz, ist jedoch insgesamt zeitlich vergleichsweise aufwändig. Auch für die verlässliche Messung dieses Endpunkts spielt die gleichmäßige Durchmischung der Algenkulturen vor der Probeentnahme eine wichtige Rolle.

Der F_v/F_m -Wert scheint, verglichen mit der Zellzahl und dem Chlorophyllgehalt, kein besonders sensitiver Parameter zu sein. Lediglich in fünf der 28 Versuche, in denen ein Effekt der Testsubstanzen erkennbar war, gehörte er zu den Endpunkten, welche die niedrigsten Effektkonzentrationen lieferten bzw. war sensitiver als die übrigen Endpunkte. Hinzu kommt, dass in sieben Versuchen signifikante Unterschiede zum Kontrollniveau auftreten, welche weder durch einen Einfluss der Testsubstanzen noch durch die Ergebnisse der übrigen Endpunkte erklärt werden können. Die Annahme, dass durch diese Messmethode teilweise signifikante Ergebnisse entstehen, welche nicht durch die Toxizität der Testsubstanzen verursacht werden, liegt daher nah. In vielen dieser Fälle beträgt die Abweichung des Messwerts der betreffenden Behandlungsgruppe weniger als 4 % von der NK und ist damit von geringer Aussagekraft bezüglich der Ableitung eines robusten Effektwerts. Teilweise treten deutliche Schwankungen zwischen den Replikaten auf, die zu sehr hohen SD und somit zu hohen Unsicherheiten bezüglich der Aussagekraft der Daten führen.

Die NPQ-Messung stellt mit acht Fällen, in denen sie u. a. die sensitivsten Ergebnisse liefert, einen etwas sensitiveren Parameter als F_v/F_m dar. Allerdings treten bei ebenso vielen Versuchen fragwürdige signifikante Unterschiede zum Kontrollniveau auf. Die jeweiligen Abweichungen dieser Werte von der NK sind jedoch für die NPQ mit teilweise über 150 % deutlich höher als bei der Messung von F_v/F_m . Da die übrigen Endpunkte im Fall ebendieser signifikanten Effekte weitgehend keine Auswirkungen der Testsubstanzen erkennen lassen, handelt es sich gegebenenfalls um Effekte, welche unabhängig von den eingesetzten Nanomaterialien sind. In einigen Fällen wird durch den Endpunkt NPQ zudem ein verbesserter Umgang der testsubstanz-

exponierten Zellkulturen mit Lichtstress im Vergleich mit der NK angezeigt, während die Werte der übrigen Parameter auf deutliche Beeinträchtigungen der Zellen hindeuten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass ein hoher NPQ-Wert zum einen aus Prozessen resultieren kann, die vor lichtinduzierten Schäden schützen oder zum anderen durch bereits entstandene Schäden verursacht werden kann. Schutzmechanismen sind die Abgabe von Wärme sowie die Umverteilung von Lichtsammelkomplexen. Durch Lichtstress bereits entstandene Schäden können zur Photoinhibition führen (MAXWELL & JOHNSON, 2000). Hierbei durchläuft das D1-Protein in PS II eine irreversible Konformationsänderung, die zum Funktionsverlust und damit zum Ausfall des entsprechenden Reaktionszentrums führt (ARO et al. 1993). In einem solchen Fall kann sich ein hoher NPQ-Wert ergeben, der jedoch kein Indiz für eine gute Wirksamkeit der Schutzmechanismen eines Organismus ist. Ein guter Allgemeinzustand des Versuchsorganismus kann damit nicht automatisch aus einem hohen NPQ-Wert abgeleitet werden.

Eventuell ist die In-vivo-Chlorophyllfluoreszenzmessung nicht gut geeignet, um Algen in einer Well-Platte zu untersuchen. Es treten viele Unstimmigkeiten auf, welche die Eignung der Methode zur Ermittlung des Einflusses von Nanomaterialien als vergleichsweise gering erscheinen lassen.

Die Messung der Werte F_v/F_m und NPQ kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. So besteht z. B. ein gewisser Zeitverzug, da die Zellen zwar relativ zeitgleich in die Wellplatten überführt, diese jedoch mit jeweils fünfzehnminütigem Zeitabstand gemessen wurden, da zunächst eine Dunkeladaptation der Zellen bzw. ihrer Photosysteme abgewartet werden musste. Es wurden maximal vier Platten direkt nacheinander gemessen, sodass der größtmögliche Abstand zwischen der ersten und letzten Messung ca. 45 Minuten betrug. In dieser Zeit wurden die Zellen zwar unter möglichst versuchsnahen Bedingungen gehalten, eine Beeinflussung der mit Verzögerung gemessenen Zellkulturen kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Weitere Ungenauigkeiten können bei der teils manuellen Auswertung am Computer entstehen. Hierbei werden auf der durch die Kamera aufgenommenen Abbildung der Wellplatte die auszuwertenden Bereiche mit dem Cursor markiert. Da die Fluoreszenzmessungen unter Anwesenheit von Nanomaterialien in den Proben erfolgt, kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass durch Streuung an den NP die Ergebnisse beeinflusst werden. Auch HUND-RINKE et al. (2016) weisen im Zusammenhang mit TiO_2 -NP auf eine Beeinflussung der Messung der Chlorophyllfluoreszenz hin. KRUSKOPF & FLYNN (2006) betonen zudem, dass ein unveränderter F_v/F_m -Wert nicht mit dem Fehlen von Stress gleichgesetzt werden sollte. In ihrer Studie stellten sie fest, dass es deutliche zwischenartige Unterschiede hinsichtlich der Beziehung von F_v/F_m und der Wachstumsrate gibt und zudem bei einem Nährstoffmangel nicht zwangsläufig eine Stressreaktion über F_v/F_m erkennbar ist.

Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Untersuchung der eingebetteten und geschnittenen Algenzellen ermöglicht grundsätzlich eine optische Identifikation von morphologischen Zellveränderungen. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurden jedoch nur in wenigen Fällen entsprechende Abweichungen vom Aussehen der Kontroll-Zellen nachgewiesen, obwohl andere ermittelte Endpunkte Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Mikroalgen lieferten. Dies kann daraus resultieren, dass in vielen Fällen nicht die höchsten in der Toxizitätsuntersuchung getesteten NP-Konzentrationen für die Untersuchungen mit dem TEM eingesetzt wurden, da bei diesen nur eine sehr geringe Teilungsaktivität der Zellen feststellbar war. Da für die Probenvorbereitung eine gewisse Mindestmenge an Algenzellen benötigt wird, muss entweder eine Konzentration gewählt werden, bei der noch ausreichend Wachstum stattfindet oder es muss für die Messung ein sehr großes Kulturvolumen verwendet werden, um so eine ausreichende Zahl an Algen zu erreichen. Die Menge an benötigtem Probenmaterial stellt somit einen limitierenden Faktor bezüglich der Einsatzfähigkeit der Methode dar, da nur schwach toxische Testkonzentrationen untersucht werden können oder eine zeit- und raumfordernde Anzucht von ausreichenden Mengen an Zellmaterial notwendig ist, welche den Rahmen dieser Arbeit überstiegen hätte. Da die Algen bei Testkonzentrationen mikroskopisch untersucht wurden, welche weiterhin eine erkennbare Zellteilung ermöglichen, ist es nicht unerwartet, dass in vielen Fällen keine sichtbaren morphologischen Beeinträchtigungen der Zellen zu erkennen waren. Bevor die Zellen mikroskopisch wahrnehmbar geschädigt sind, ist mit einer Verringerung der Teilungsintensität und anderen zellinternen Stressreaktionen zu rechnen, mit der sie eine gewisse Beeinträchtigung bzw. das Abweichen von optimalen Umgebungsbedingungen anzeigen.

Die Untersuchung der Zellproben mittels TEM ermöglicht die Beobachtung der Wechselwirkung zwischen Nanomaterialien und Algenzellen. Diese Interaktion kann jedoch durch die Probenvorbereitung beeinflusst werden. Zur Einbettung der Zellproben ist das mehrfache Waschen und Zentrifugieren der Zellen erforderlich, welches dazu führen kann, dass an der Zellwand angeheftete Nanoobjekte abgelöst werden und verloren gehen. Es muss somit berücksichtigt werden, dass das im TEM sichtbare Bild nicht zwangsläufig mit dem Verhalten der NP in der lebenden Algenkultur übereinstimmt.

Die Aufnahme von Nanomaterialien durch Algenzellen wurde durch andere Studien bereits nachgewiesen (SKJOLDING et al., 2016; GARCÍA et al., 2014; VON MOOS & SLAVEYKOVA, 2014; PERREAULT et al., 2012; MIAO et al., 2010). Durch die eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte allerdings keine Aufnahme von Nanomaterialien durch die Mikroalgen festgestellt werden. Dies kann unter anderem daran liegen, dass einige Nanomaterialien die Zellwand nicht passieren können, da diese bei Mikroalgen eine effektive Barriere darzustellen

scheint (TRIPATHI et al., 2017; SKJOLDING et al., 2016). Hiervon sind insbesondere größere Nanoobjekte betroffen, kleine NP können hingegen im Bereich der 5 bis 20 nm großen Poren zur Zellmembran gelangen und dort in den Protoplasten aufgenommen werden (TRIPATHI et al., 2017). Bei den PS-NP ist aufgrund der Größe von über 30 nm damit zu rechnen, dass eine Aufnahme durch die Zellwand gänzlich unmöglich ist. Die verwendeten Ag- und TiO₂-NP sind dagegen deutlich kleiner, wobei jedoch die Möglichkeit berücksichtigt werden muss, dass ggf. gebildete Sekundärpartikel aufgrund ihrer Größe die Zellwand eventuell nicht passieren können. Die toxischen Effekte der Partikel lassen sich auch ohne eine Aufnahme in die Zelle erklären (vgl. Kapitel 9.4.3). Allerdings kann nur auf Basis des Negativnachweises mit dem Elektronenmikroskop nicht ausgeschlossen werden, dass NP in die Zellen gelangt sind. Die TiO₂-NP sind aufgrund ihrer geringen Größe als einzelne Partikel nicht sicher zu identifizieren. Auch die Ag-NP weisen keine besonders charakteristische Form auf und könnten zudem durch Lösungsvorgänge hinsichtlich ihres Erscheinungsbildes deutlich verändert sein. Einzelne Partikel vor dem Hintergrund eines Zellendünnschnittes nachzuweisen gestaltet sich äußerst schwierig. Es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, NP zu übersehen bzw. sie nicht als solche wahrzunehmen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus Teil I der vorliegenden Arbeit, in dem sich der Nachweis von Nanomaterialien durch verschiedene humane Zelllinien ebenfalls als problematisch herausstellte (Teil I, Kapitel 5.3).

Bewertung und Vergleich der Methoden

Die Qualität einer Methode zur Ermittlung der Toxizität von Nanomaterialien wird anhand verschiedener Kriterien beurteilt. Von besonderer Wichtigkeit ist eine hohe Sensitivität, durch die bereits geringe Effekte erfasst werden. Zudem sollte die Methode unabhängig von den Versuchsparametern wie z. B. Testorganismus, Testsubstanz und Medium sein und keine übermäßige Anfälligkeit für Fehler aufweisen. Ein geringer Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand ist ebenfalls wünschenswert.

Die Absorptionsmessung ist eine vergleichsweise lohnenswerte Methode zur Ermittlung von Effekten und kostet wenig Material, Zeit und Arbeit. Sie stellte sich zudem als eine der sensitivsten Methoden hinsichtlich der Effektschwelle heraus. Ein Nachteil ist, dass die Methode nicht bei allen Nanomaterialien angewandt werden kann. Es ist zunächst eine auf die Absorptionseigenschaften der Testsubstanzen abzielende Charakterisierung erforderlich, welche mögliche Einflussfaktoren wie Partikelart, Konzentration und Medium berücksichtigt und zudem ermittelt, ob eine Beeinflussung des Streuverhaltens durch die Testorganismen vorliegt. Eine derartige Untersuchung würde weitere Ressourcen in Anspruch nehmen und zudem ggf. zu dem Ergebnis kommen, dass die Methode für die Testsubstanz nicht geeignet ist. Als Standard-Methode zur indirekten Bestimmung der Zellzahl für Toxizitätsversuche mit Nanomaterialien ist die Messung

der Absorption somit nicht ohne Weiteres geeignet. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse werden die ermittelten Ergebnisse zur Zellzahl im Zusammenhang mit den TiO₂-NP in der folgenden Diskussion nur als Trend berücksichtigt, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Methode zu ungenauen Messwerten führt.

Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts stellt im Vergleich zu den anderen Methoden eine sehr sensible Nachweismöglichkeit für Beeinträchtigungen der Zellen dar. Lediglich in Bezug auf den Nachweis der stimulierenden Wirkung von PS-NP liefert die Zellzahlbestimmung oft bei geringeren Konzentrationen signifikante Ergebnisse (vgl. Kapitel 9.4.6). Da jedoch die Eignung für Toxizitätsuntersuchungen im Vordergrund steht, welche primär der Ableitung negativer Effekte dienen, ist dies kein bedeutender Nachteil. Zudem konnte die Methode ohne Probleme auf alle untersuchten Testorganismen, Nanomaterialien und Medien angewandt werden. Der ausschlaggebende Vorteil der Chlorophyllgehaltbestimmung ist, dass die Messung nicht durch die Anwesenheit von Nanomaterialien beeinflusst wird. Die Methode konnte unabhängig von Testorganismus und -substanz eingesetzt werden und hat somit ein großes Potenzial als Standardtestmethode für Nanomaterialien verwendet zu werden. Nachteile im Vergleich zur Absorptionsmessung sind der etwas höhere Zeit-, Arbeits- und Materialaufwand. Insgesamt hat sich die Bestimmung des Chlorophyllgehalts von allen untersuchten Methoden als das geeignetste Messverfahren erwiesen, um die Toxizität von Nanomaterialien für Algen zu untersuchen.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz ist relativ zeit- und arbeitsintensiv und lässt keine besondere Sensitivität hinsichtlich des Nachweises von Effekten feststellen. Die Ergebnisse der Berechnung der Stressparameter F_v/F_m und NPQ weichen in vielen Fällen von denen der übrigen Untersuchungen ab und lassen zudem häufig keinen eindeutigen Zusammenhang mit dem Vorhandensein der Testsubstanzen erkennen. Die Messung scheint gegenüber äußeren Einflüssen empfindlich zu sein, welche jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht näher bestimmt werden können. Die Methode ist für zukünftige Versuche in der durchgeführten Form nicht zu empfehlen. Hier wären umfangreiche Untersuchungen notwendig, um aufzuklären, welche zusätzlichen Faktoren Einfluss auf die Messergebnisse haben und inwiefern diese eliminiert werden können. Aufgrund des häufigen Fehlens von eindeutig konzentrations-abhängigen Effekten sowie den auftretenden Unstimmigkeiten wurde auf die Bestimmung von EC₅₀-, LOEC- und NOEC-Werten für F_v/F_m und NPQ verzichtet, da deren Angabe häufig nicht möglich gewesen wäre und ihre Aussagekraft anzuzweifeln ist.

Auf Grundlage der durchgeführten Versuche ist die TEM-Untersuchung nicht geeignet relevante eigenständige Erkenntnisse bezüglich der Toxizität von NP auf Algenzellen zu liefern. Da mit sichtbaren Effekten erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen zu rechnen ist und der Nachweis, ob eine tatsächliche Aufnahme der Nanoobjekte durch die Zellen erfolgt, in der Regel

nicht zweifelsfrei möglich ist, kann die Methode nur zur Ergänzung anderer Ergebnisse dienen. Zudem ist die Bearbeitung der Proben sehr zeit-, kosten- und arbeitsintensiv. Eine Eignung als Standardmethode bei Toxizitätstests mit Nanomaterialien ist somit nicht gegeben. Allerdings kann eine transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Zellen durchaus Hinweise über die Wirkung von Nanomaterialien sowie, bei einer erkennbaren Aufnahme von Nanoobjekten, Erkenntnisse zu deren Verteilung in der Zelle liefern.

9.4.2 Toxizität der Testsubstanzen

Die Toxizität von Substanzen kann über die in Versuchen ermittelten EC_{50} -Werte verglichen werden. Eine weitere Möglichkeit ist der versuchsübergreifende Vergleich von LOEC und NOEC. In diesem Kapitel erfolgt zunächst eine Validierung der Berechnung entsprechender Werte für die durchgeführten Versuche. Anschließend wird auf Basis der ermittelten Werte die Toxizität der einzelnen Substanzen miteinander und zudem mit Ergebnissen anderer Studien verglichen. Schließlich wird eine Einordnung der Toxizität in Bezug auf das Umweltrisiko anhand von zu erwartenden Umweltkonzentrationen vorgenommen.

Bewertung der ermittelten Toxizitätsvergleichswerte

Zunächst ist festzustellen, dass nicht für alle Versuche belastbare EC_{50} -Werte ermittelt werden konnten. Dies ist zum einen auf die geringe Anzahl der untersuchten Konzentrationen zurückzuführen, da sich aus den fünf Datenpunkten, welche aus den fünf eingesetzten Konzentrationen resultieren, nur bei gut zueinander passenden Werten eine sinnvolle bzw. eindeutige Dosis-Wirkungs-Kurve ermitteln lässt. Ein Auftreten von Ausreißern führt aufgrund der geringen Stichprobengröße in der Regel dazu, dass keine passende Kurve modelliert werden kann bzw. mehrere Kurvenverläufe ähnlich wahrscheinlich sind. Zum anderen ist erkennbar, dass sich die EC_{50} -Werte insbesondere dann berechnen lassen, wenn die Testsubstanz in den höheren Konzentrationen eine deutliche Wirkung auf den Testorganismus hat und diese Wirkung bei den niedrigen Konzentrationen nicht oder kaum noch auftritt, wie es in vielen der Versuche mit Ag-NP und Silbernitrat der Fall war. Dies liegt daran, dass in solchen Fällen durch die ermittelten Werte bereits das obere und untere Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve zumindest teilweise abgedeckt werden und somit die Anzahl der Möglichkeiten, sigmoide Kurven durch die Punkte zu legen, deutlich reduziert wird. Problematisch ist die Berechnung der EC_{50} für Substanzen, deren Dosis-Wirkungs-Beziehungen keinem sigmoiden bzw. monotonen Verlauf folgen, da sie in hohen Konzentrationen toxisch wirken, in geringeren Konzentrationen aber positive Effekte beim Testorganismus verursachen und bei sehr niedrigen Konzentrationen keine Wirkung mehr haben. In solchen Fällen müssten für einzelne Konzentrationsbereiche Dosis-Wirkungs-Kurven modelliert werden, was die Untersuchung eines sehr breiten Konzentrationsspektrums voraussetzt. Die Vergleichbarkeit von EC_{50} -Werten hängt unter anderem von den Versuchsbe-

dingungen sowie der Auswertung der Daten ab. In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche unter den gleichen Voraussetzungen durchgeführt und identisch ausgewertet. Innerhalb der Versuche ist somit eine gute Vergleichbarkeit gegeben. Beim Gegenüberstellen der eigenen Ergebnisse mit anderen Untersuchungen sind gewisse Unterschiede nicht ungewöhnlich, da in der Regel Abweichungen hinsichtlich des Versuchsdesigns bestehen, die sich geringfügig auf das Ergebnis auswirken können. Die jeweils ermittelten Werte können jedoch in Bezug auf ihre Größenordnung zueinander in Bezug gesetzt werden.

Insgesamt ist die Ermittlung von EC_{50} -Werten sinnvoll, um Testergebnisse miteinander zu vergleichen, was standardmäßig getan wird (OECD, 2011). Damit die Ergebnisse allerdings eine hohe Aussagekraft haben, ist es empfehlenswert, möglichst viele Konzentrationen zu untersuchen und jenen Konzentrationsbereich abzudecken, in dem bei niedrigen Konzentrationen keine Wirkung nachweisbar ist, bis hin zur maximalen Reaktion bei hohen Konzentrationen der Testsubstanz. Dies ist insgesamt sehr aufwändig und kann die Durchführung mehrerer Versuche bzw. Tests mit einer breiten Konzentrationsspanne erfordern, um die für eine Dosis-Wirkungs-Kurve relevanten Konzentrationen der Testsubstanz zu identifizieren.

Die LOEC und NOEC wurden in der Vergangenheit standardmäßig genutzt, um die Toxizität und das Risiko einer Testsubstanz zusammenfassend darzustellen (OECD, 2002). Im Vergleich zu einer regressionsbasierten Methode wie der Berechnung der EC_{50} , bei der alle Testergebnisse einfließen und die weitgehend unabhängig von den eingesetzten Testkonzentrationen ist, sind LOEC und NOEC direkt von der Auswahl der Testkonzentrationen abhängig. Je weiter die einzelnen Testkonzentrationen in einem Versuch auseinander liegen, desto ungenauer sind LOEC und NOEC hinsichtlich der Ermittlung tatsächlicher Effektschwellen. Zudem sind aussagekräftige Vergleiche mit anderen Tests nur möglich, sofern ähnliche Testkonzentrationen ermittelt wurden. Da die beiden Werte zudem auf den signifikanten bzw. nicht signifikanten Ergebnissen von jeweils einer Testkonzentration beruhen, können einzelne Messwerte die Ergebnisse relativ stark beeinflussen und sich somit negativ auf die Genauigkeit auswirken. Hinzu kommt, dass die LOEC nicht direkt die Stärke der Toxizität einer Substanz widerspiegelt, sondern nur anzeigt, ab welcher Konzentration Effekte nachweisbar sind. In einigen Fällen können LOEC und NOEC zudem nicht angegeben werden, da in allen bzw. keiner der untersuchten Testkonzentrationen signifikante Effekte auftreten. Ist die Berechnung des EC_{50} -Werte allerdings wie im vorliegenden Fall nicht für alle Versuche möglich und wurden ähnliche bzw. die gleichen Testkonzentrationen eingesetzt, lassen NOEC und LOEC durchaus einen Vergleich der Versuche zu.

Vergleich der Toxizität

Hinsichtlich der EC_{50} -Werte sind Vergleiche zwischen den Partikeln in Bezug auf ihre Ausgangsmaterialien nur begrenzt möglich, da entsprechende Effektwerte fast nur für Ag-NP und

Silbernitrat vorliegen. Aus diesem Grund ist die Berücksichtigung der LOEC- bzw. NOEC-Werte als zusätzliche Vergleichsgröße sinnvoll. Aus den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die Toxizität von silberhaltigen Testsubstanzen mit Abstand am größten ist. Auch im Fall der TiO₂-NP wurden toxische Effekte nachgewiesen, wohingegen bei den PS-NP keine Hinweise auf eine schädigende Wirkung für die Testorganismen gefunden wurden. Es wird vermutet, dass Ag-NP insbesondere aufgrund der Abgabe von Silberionen eine toxische Wirkung auf Organismen haben (TRIPATHI et al., 2017; LE OUAY & STELLACCI, 2015; NOTTER et al., 2014). Vor diesem Hintergrund ergibt es Sinn, dass die silberhaltigen Nanomaterialien weitaus toxischer wirken als PS- und TiO₂-NP, da die Silberionen aufgrund ihrer geringen Größe viel leichter durch Zellen aufgenommen werden können als ganze Nanoobjekte und somit zusätzlich im Zellinneren Schäden verursachen. Eine Aufnahme von ganzen Nanoobjekten wird hingegen je nach Größe durch die Zellwand und die Zellmembran erschwert.

Die EC₅₀-Werte für Silbernitrat liegen bezüglich Grünalgen in verschiedenen Untersuchungen in einem Bereich zwischen 1,1 und 33,8 ng Ag/mL (SØRENSEN & BAUN, 2015; RIBEIRO et al., 2014; ANGEL et al., 2013; NAVARRO et al., 2008; LEE et al., 2005). Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen sind mit EC₅₀-Werten von 14,4 bis 28,9 ng Ag/mL ebenfalls in diesem Bereich einzuordnen. Für Diatomeen schwanken die Werte in den zu Rat gezogenen Studien zwischen 129 und 400 ng Ag/mL (HUANG et al., 2016; ANGEL et al., 2013; BURCHARDT et al., 2012). Bei den eigenen Untersuchungen war für die Kieselalge keine Berechnung der EC₅₀ und keine exakte Bestimmung der LOEC möglich. Bei der niedrigsten untersuchten Konzentration von 120 ng Ag/mL tritt weiterhin eine signifikante Reduktion von Zellzahl und Chlorophyllgehalt gegenüber der NK auf. Da jedoch die Effektstärke bei dieser Konzentration um weniger als 50 % von den Werten der Kontrolle abweicht, ist eine EC₅₀ in einer ähnlichen Größenordnung wie in den zum Vergleich herangezogenen Studien zu erwarten. Insgesamt wird anhand der eigenen Untersuchungen deutlich, dass Ag für die Grünalgen toxischer als für die Kieselalge ist.

In Bezug auf die EC₅₀-Werte für Ag-NP treten je nach Studie sehr unterschiedliche Werte auf. Der Schwankungsbereich liegt für Grünalgen zwischen 3 und 310 ng Ag/mL (SØRENSEN & BAUN, 2015; RIBEIRO et al., 2014; ANGEL et al., 2013; GRIFFITT et al., 2008; NAVARRO et al., 2008), wobei die Unterschiede durch die eingesetzten Nanomaterialien und die Versuchsdauer bedingt sein können. So zeigen beispielsweise SØRENSEN & BAUN (2015), dass sogar die gleichen NP unterschiedlicher Hersteller sich in ihrer Wirkung deutlich unterscheiden können. Auch kann die Oberflächenmodifikation die Auflösungs geschwindigkeit der Partikel und damit die Freisetzung von Silberionen und die Toxizität beeinflussen (ANGEL et al., 2013). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten EC₅₀-Werte sind mit 15,7 bis 19,6 ng Ag/mL im unteren Schwankungsbereich der weiter oben zitierten Studien angesiedelt. Die Werte für verschiedene Diatomeenarten

schwanken in der Literatur zwischen 2,4 und 25,8 $\mu\text{g Ag/mL}$ (HUANG et al., 2016; ANGEL et al., 2013), wobei die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen mit 1,4 bis 3,6 $\mu\text{g Ag/mL}$ im Vergleich dazu im unteren Bereich liegen. Die vergleichsweise niedrigen Effektwerte können mitunter durch die relativ lange Versuchsdauer von 72 bzw. 120 h bedingt sein. Zudem wurden die Nanomaterialien bereits 24 h vor den Algen dem Medium hinzugefügt, was dazu führen kann, dass sich aufgrund der längeren Zeit mehr Silberionen aus den Partikeln lösen und somit stärkere Effekte auftreten. Dieses Phänomen wurde ebenfalls durch SØRENSEN & BAUN (2015) beobachtet. Erläuterungen zur Wirkung von Ag-NP bzw. Silberionen sind in Kapitel 9.4.3 zu finden.

Hinsichtlich der Toxizität von TiO_2 -NP werden in der Literatur für Grünalgen EC_{50} -Werte von 3,58 bis 44 $\mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$ angegeben (OZKALELI & ERDEM, 2018; ARUOJA et al., 2009; VELZEBOER et al., 2008; WARHEIT et al., 2007; HUND-RINKE & SIMON, 2006). In zwei Fällen konnten zudem bei Konzentrationen von 50 und 100 $\mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$ keine Effekte festgestellt werden (VELZEBOER et al., 2008; HUND-RINKE & SIMON, 2006). Für eine Diatomeenart wurde ein EC_{50} -Wert von 168 $\mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$ ermittelt (WANG et al., 2016a). Diese Werte zeigen zum einen, dass TiO_2 als Nanomaterial eine toxische Wirkung auf Algen haben kann. Zum anderen wird jedoch deutlich, dass Effekte überwiegend erst bei deutlich höheren Konzentrationen als bei den silberhaltigen Testsubstanzen nachweisbar sind, bzw. keine Toxizität bei den untersuchten Konzentrationen festgestellt werden konnte. Dieser Rückschluss aus den Literaturergebnissen deckt sich mit den Resultaten der eigenen Ergebnisse. Hierbei konnten LOEC-Werte von 11,1 bis über 300 $\mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$ ermittelt werden. Für *R. subcapitata* wurde eine EC_{50} von 288 $\mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$ und für die Diatomee von 34,5 $\mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$ berechnet. Die Toxizität scheint somit sehr unterschiedlich auszufallen, wobei Unterschiede zwischen den Partikeln sowie Mediumseigenschaften, wie z. B. die Wasserhärte, beeinflussende Faktoren sein können (OZKALELI & ERDEM, 2018; HUND-RINKE & SIMON, 2006).

Da PS bei weitem nicht so häufig verwendet wird wie Ag- oder TiO_2 -Nanomaterialien, werden weniger Toxizitätsuntersuchungen mit diesem Material durchgeführt, was zu einer geringeren Anzahl an Vergleichswerten führt. In zwei Studien wurden EC_{50} -Werte zwischen 0,58 und 12,97 $\mu\text{g PS/mL}$ für *R. subcapitata* ermittelt (BERGAMI et al., 2017; CASADO et al., 2013). Dem entgegenstehend konnten in einigen Untersuchungen bei Konzentrationen von 50, 100 und 250 $\mu\text{g PS/mL}$ keine Effekte festgestellt werden (BERGAMI et al., 2017; NOLTE et al., 2017; SJOLLEMA et al., 2016). Teilweise treten Effekte erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen von 250 $\mu\text{g PS/mL}$ auf (SJOLLEMA et al., 2016). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte bis zu einer Konzentration von 81 $\mu\text{g PS/mL}$ keine toxische Wirkung der PS-Nanomaterialien auf die Testorganismen ermittelt werden. Dies deckt sich zumindest dahingehend mit den anderen

Studien, dass auch dort teilweise gar keine oder erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen eine Toxizität festgestellt wurde.

Erwartete Umweltkonzentrationen

Die PEC für Nanosilber in Oberflächengewässern wird gemäß einer Zusammenfassung von PETERS et al. (2018) anhand von verschiedenen Modellberechnungen auf 0,04 pg Ag/mL bis 0,62 ng Ag/mL geschätzt. Ein Nachweis von Nanosilber in Fließgewässern lieferte zudem eine Konzentration von 0,8 pg/mL (PETERS et al., 2018). Diese Konzentrationen liegen deutlich unter den berechneten EC_{50} -Werten, welche minimal 14,4 ng Ag/mL betragen. Die in der Umwelt zu erwartenden Konzentrationen sind somit um einen Faktor von mindestens 22 geringer als die Konzentrationen, welche in den durchgeführten Untersuchungen deutliche negative Effekte auf Algen bewirkten. Die niedrigste LOEC im Laborversuch zeigt allerdings, dass bereits ab eine Konzentration von 1 ng Ag/mL erste Reaktionen von Algen auf NP auftreten können.

Gemäß einer Zusammenfassung mehrerer Studien liegt die PEC für TiO_2 -NP zwischen 0,2 pg TiO_2 /mL und 24,5 ng TiO_2 /mL (PETERS et al., 2018). Die in den eigenen Versuchen niedrigste bestimmte NOEC, also der niedrigste Wert aller Versuche mit TiO_2 , bei dem kein Effekt nachgewiesen werden konnte, liegt bei 11,1 μ g TiO_2 /mL und damit um einen Faktor von über 400 höher als die höchste erwartete PEC. In zwei Fällen konnten LOEC und NOEC zwar nicht genau bestimmt werden, aufgrund der geringen Ausprägung des Effekts ist jedoch auch hier nicht mit einer EC_{50} zu rechnen, welche nah an die PEC heranreicht.

Derzeit liegt noch keine PEC zu PS-NP vor (KOELMANS et al., 2015), was der Tatsache geschuldet ist, dass der Marktanteil dieser NP im Vergleich mit anderen Nanomaterialien gering ist. Zudem sind die Nachweismethoden für die Kunststoffpartikel noch nicht ausgereift und es gibt keine Nachweise von PS-NP in aquatischen Ökosystemen (KOELMANS et al., 2015). Da jedoch zu erwarten ist, dass nicht nur gezielt produzierte Kunststoff-Nanomaterialien in die Umwelt eingetragen werden, sondern NP vor allem sekundär unter Umwelteinflüssen aus Mikroplastik entstehen (EKVALL et al., 2019; BURNS & BOXALL, 2018; EFIMOVA et al., 2018; LAMBERT & WAGNER, 2016), kann die Umweltkonzentration des besser untersuchten Mikroplastiks einen ersten Hinweis auf das Vorkommen von Nanokunststoffen liefern. LENZ et al. (2016) nehmen auf Grundlage der Auswertung von Studien zu Mikroplastiknachweisen in marinen Ökosystemen Umweltkonzentrationen von ca. 1 ng/mL für Kunststoff-NP an, wobei es sich nur um einen groben Schätzwert handelt. KOELMANS et al. (2015) geben in einer zusammenfassenden Studie für die Mikroplastikkonzentration in Oberflächengewässern in den USA und Europa 0,4 bis 34 pg/mL und als höchste Konzentrationen für marine Ökosysteme 0,51 μ g/mL an. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass bis zu einer Konzentration von 81 μ g PS/mL in Bezug auf die PS-NP keine negativen Auswirkungen auf die drei Algenarten festgestellt werden konnten. Es

muss zudem berücksichtigt werden, dass die PEC sich auf alle Kunststoffe bezieht, PS jedoch nur einen Teil davon ausmacht.

Insgesamt liefern die Ergebnisse der durchgeführten Versuche keine deutlichen Hinweise darauf, dass die untersuchten Nanomaterialien derzeit ein hohes Risiko für die Algen in unseren Oberflächengewässern darstellen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die aus einem Laborversuch resultierenden Erkenntnisse nur bedingt auf die Umwelt übertragbar sind. Es ist anzunehmen, dass die Toxizität von NP in der Umwelt durch verschiedene zusätzliche Faktoren beeinflusst wird, wobei Toxizitätsverstärkende sowie abschwächende Einflüsse zu erwarten sind. Grundsätzlich sind die Wachstumsbedingungen im Freiland aufgrund von schwankenden Umweltfaktoren (Licht, Temperatur, pH etc.) nicht konstant optimal, wie es im Laborversuch der Fall ist. Zudem kommt es zu Konkurrenz durch andere Arten und es kommen Algen vor, welche ggf. empfindlicher sind als die untersuchten Testorganismen. Des Weiteren ist in der Umwelt mit einem Gemisch verschiedenster Nanomaterialien und anderer Schadstoffe zu rechnen, deren Effekte sich aufsummieren können und somit durchaus negative Folgen für Algen erwarten lassen. Es konnte bereits bei Fadenwürmern nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit mehrerer Nanomaterialien deren Toxizität verstärken kann (DONG et al., 2018). Auch ist es möglich, dass NP oder ihre Bestandteile mit anderen Substanzen reagieren und im Zuge dessen giftige Produkte entstehen. Hinzu kommt die Gefahr, dass Nanoobjekte aufgenommen werden und sich über das Nahrungsnetz anreichern (CEDERVALL et al., 2012). Hierbei sind Effekte auf Algen von besonderer Relevanz für das gesamte Ökosystem, da die Primärproduzenten die Ernährungsgrundlage für viele weitere Arten darstellen. In der Umwelt sind NP zudem anderen Einflüssen ausgesetzt als in einem Laborversuch, sodass sich die Toxizität verändern kann. Es besteht z. B. die Gefahr, dass Kunststoffpartikel hydrophobe Schadstoffe adsorbieren, von Organismen aufgenommen werden und somit Schadstoffe in deren Inneres transportieren (BHATTACHARYA et al., 2010). Einige Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass durch Umwelteinflüsse die Toxizität von Nanomaterialien in Gewässern auch reduziert werden kann. Relevante Faktoren sind hierbei z. B. die Anwesenheit von organischen Materialien, die Partikel unter anderem hinsichtlich ihres Aggregationsverhaltens beeinflussen können (DE KLEIN et al., 2016; BARTON et al., 2015; VAN HOECKE et al., 2009). Zudem können organische Verbindungen, welche mit der Partikeloberfläche interagieren, die Abgabe von Ionen und damit die Toxizität von einigen Nanomaterialien verringern (ANGEL et al., 2013). Es ist letztendlich eine gezielte Untersuchung von Toxizitätsbeeinflussenden Faktoren in Laborexperimenten sowie der kombinierten Einflüsse im Rahmen von Freilanduntersuchungen erforderlich, um Rückschlüsse auf das von den Materialien tatsächlich ausgehende Umweltrisiko zuzulassen.

9.4.3 Wirkung der Testsubstanzen

In diesem Kapitel werden anhand der durchgeführten Versuche Rückschlüsse auf die Wirkweise der Testsubstanzen gezogen und die Ergebnisse mit anderen Untersuchungen abgeglichen.

Silber-Nanopartikel und Silbernitrat

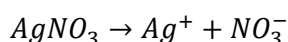
Die Ergebnisse der Versuche lassen auf eine Toxizität von AgPure für alle drei Algenarten schließen. Bei den Grünalgen sind konzentrationsabhängige und parameterübergreifende Effekte bereits im ng/mL-Bereich nachweisbar. Die Diatomee zeigt sich etwas unempfindlicher. Zudem tritt bei dieser Art bei der LK ein positives Ergebnis auf. Da das gleiche Lösemittel jedoch in späteren Versuchen in der gleichen Konzentration eingesetzt wurde und keine Effekte verursachte, wird nicht von einer allgemeinen Wirkung ausgegangen. Zudem tritt im genannten Fall durch das Lösemittel eine Wachstumssteigerung auf und damit ein tendenziell positiver Effekt, sodass keine Verstärkung der durch die NP ausgelösten Toxizität durch das Lösemittel befürchtet werden muss.

Alle drei Algen lassen eine konzentrationsabhängige Beeinträchtigung von Zellzahl und Chlorophyll-Gehalt durch Ag-COOH erkennen, wobei die Effekte bei *C. reinhardtii* relativ gering ausfallen. Im Fall von *C. meneghiniana* konnte in der Behandlungsgruppe, welche gegenüber der höchsten untersuchten Konzentration exponiert war, keine Fluoreszenz gemessen werden, was auf stark geschädigte bzw. abgestorbene Zellen hindeutet. Bei der zweithöchsten Konzentration treten zwar sehr große Abweichungen von der NK auf, diese sind jedoch nicht signifikant, da eines der Replikate kein Zellwachstum zeigte und aus der Auswertung ausgeschlossen wurde. Das Fehlen von Wachstum ist in diesem Fall mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen Pipettierfehler zurückzuführen, da die beiden übrigen Replikate mit bloßem Auge Algenwachstum erkennen ließen und somit bei dieser NP-Konzentration durchaus Zellteilung zu erwarten ist. Teilweise treten bei den F_v/F_m -Werten positive Resultate auf. Da jedoch die übrigen Endpunkte nicht auf eine positive Wirkung der NP auf die Algen hindeuten und die Abweichungen lediglich wenige Prozent von der NK betragen, ist nicht von einem tatsächlichen Zusammenhang mit der Anwesenheit der Nanomaterialien auszugehen. Bei der NPQ treten ebenfalls teilweise positive Werte auf, die einen sehr guten Zustand der Zellen vermuten lassen. Im vorliegenden Fall ist eine Entstehung dieses Effekts durch die in Kapitel 9.4.1 beschriebene irreversible Konformationsänderung des D1-Proteins jedoch unwahrscheinlich, da eine derart starke Schädigung der Zellen wahrscheinlich auch anhand der übrigen Endpunkte erkennbar wäre. Zudem weist auch die LK in dieser Messung eine erhöhte NPQ auf. Die Aussagekraft der Werte zu nanopartikelbedingten Effekten ist in diesem Fall fraglich. Elektronenmikroskopisch weisen nur die Kieselalgen Auffälligkeiten hinsichtlich ihrer Morphologie auf. Die Zellorganellen sind nach der Exposition gegenüber Ag-COOH stark beschädigt und der Protoplast ist erkennbar zusammengezogen.

R. subcapitata lässt bezüglich Zellzahl und Chlorophyllgehalt eine Beeinträchtigung durch die Ag-NH₂ erkennen. Die Stressparameter zeigen teilweise Werte an, die in keinem direkten Zusammenhang mit der Konzentration stehen bzw. nicht durch die übrigen Endpunkte wiedergegeben werden. Bei der zweiten Grünalge *C. reinhardtii* führen auch dreifach höhere NP-Konzentrationen als in dem Versuch mit *R. subcapitata* eingesetzt wurden, zu keinen Effekten. Die Auswirkungen auf die Diatomee deuten hingegen eine parameterübergreifende Beeinträchtigung der Zellen an. Es treten teils sehr hohe NPQ-Werte auf, welche durch die in Kapitel 9.4.1 beschriebene Schädigung des Photosyntheseapparats entstehen können.

AgNO₃ wirkt auf alle drei Algenarten toxisch und beeinträchtigt Wachstum, Chlorophyllgehalt und photosynthetische Kapazität konzentrationsabhängig. Im Fall von *R. subcapitata* und *C. meneghiniana* wird dieser negative Trend auch durch die NPQ-Werte bestätigt. *C. reinhardtii* weist zudem zelluläre Auffälligkeiten bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung in Form von einer verstärkten Einlagerung von Stärke auf. Die Art ist in der Lage, z. B bei Stickstoffmangel, widerstandsfähige Dauerstadien zu bilden, die auch bei ungünstigen Umweltbedingungen überleben können (GOODENOUGH et al., 2007).

Die Ergebnisse der Versuche mit Ag zeigen, dass sowohl die Nanomaterialien als auch das Silbernitrat in nahezu allen Fällen eine toxische Wirkung auf die verschiedenen Algenarten haben. Diese äußert sich vor allem durch eine Verringerung der Zellteilung und einen reduzierten Chlorophyllgehalt. In Bezug auf *C. reinhardtii* und *C. meneghiniana* sind zudem Veränderungen der Zellen mittels TEM zu beobachten. Anhand der durchgeführten Versuche konnte somit die Toxizität von Ag-NP auf Algen deutlich gezeigt werden. Es ist bekannt, dass das Element Ag über die Abgabe von toxischen Silberionen antimikrobiell wirkt (LE OUAY & STELLACCI, 2015; WIJNHOFEN et al., 2009) und die Toxizität von Nanosilber für Algen ist ebenfalls anhand verschiedener Studien belegt (DOROBANTU et al., 2015; DASH et al., 2012; NAVARRO et al., 2008). Bezüglich des Wirkmechanismus von Nanosilber wird derzeit vermutet, dass die Toxizität hauptsächlich durch Silberionen (Ag⁺) bedingt ist (TRIPATHI et al., 2017; LE OUAY & STELLACCI, 2015; NOTTER et al., 2014). Um den Einfluss von ionischem Ag in den hier durchgeführten Toxizitätstests abschätzen zu können, wurde Silbernitrat als Vergleichssubstanz zu den Nanomaterialien eingesetzt. Die toxische Wirkung des Silbersalzes beruht darauf, dass es sich leicht in Wasser löst und dabei Silberionen und Nitrat entsprechend der folgenden Gleichung freigesetzt werden:



Der Vergleich der Versuche zeigt, dass Silbernitrat weitgehend etwas stärkere Effekte verursacht als das Ag in Nanoform. Dass Silberionen eine höhere Toxizität aufweisen als Ag-NP, wird auch durch andere Untersuchungen bestätigt (HUANG et al., 2016; SØRENSEN & BAUN, 2015; NOTTER et al., 2014; BURCHARDT et al., 2012; NAVARRO et al., 2008) und untermauert die Theorie, dass die

Toxizität von Nanosilber überwiegend durch abgegebene Ionen verursacht wird, jedoch weniger stark als bei Silbernitrat ist, da die Abgabe der Silberionen verzögert stattfindet. Es wird vermutet, dass die Ionen oxidativ aus den Silberpartikeln herausgelöst werden, was zur Entstehung von ROS führen kann (LE OUAY & STELLACCI, 2015; MCSHAN et al., 2014; MARAMBIO-JONES & HOEK, 2010). Dabei gilt, je kleiner ein Partikel ist, desto größer ist seine spezifische Oberfläche und damit seine Auflösungsrate (LE OUAY & STELLACCI, 2015). Darüber hinaus wird angenommen, dass sowohl Silberionen als auch vollständige NP von Zellen aufgenommen werden können (TRIPATHI et al., 2017; GARCÍA et al., 2014; MCSHAN et al., 2014; MIAO et al., 2010). NP, die ins Zellinnere gelangt sind, geben dort weiterhin Ionen ab und tragen somit ebenfalls zur Toxizität bei. Allerdings deuten weitere Studien darauf hin, dass sich in den Zellen Silberionen zu nanoskaligen Silberpartikeln assimilieren könnten, weshalb der Nachweis der Aufnahme ganzer Partikel schwierig ist (TRIPATHI et al., 2017; LECLERC & WILKINSON, 2014; BARWAL et al., 2011). In den eigenen TEM-Untersuchungen konnten keine NP in den Zellen nachgewiesen werden, was jedoch nicht ausschließt, dass sich Partikel in den Zellen befinden (vgl. Teil I, Kapitel 5.3.3). Unabhängig davon, ob das Silber als Ion oder Partikel von der Zelle aufgenommen wurde, führen die in der Zelle befindlichen Ionen zu einer verstärkten Entstehung von ROS (HUANG et al., 2016), da diese aufgrund der Beeinträchtigung der Zelle verstärkt produziert werden und Regulationsmechanismen nicht mehr funktionsfähig sind (LE OUAY & STELLACCI, 2015). Die Ionen reagieren zudem mit Biomolekülen, wobei schwefelhaltige Makromoleküle besonders angreifbar sind, da Ag eine hohe Bindungsaffinität zu Schwefel aufweist (MCSHAN et al., 2014). Darüber hinaus können Nukleinsäuren, wie Desoxyribonucleinsäure (DNA; engl.: *Deoxyribonucleic acid*), sowie Proteine, Membranen und Cofaktoren beschädigt werden (LE OUAY & STELLACCI, 2015; MCSHAN et al., 2014; MARAMBIO-JONES & HOEK, 2010). Die Silberionen, die erhöhte ROS-Entstehung und der damit einhergehende oxidative Stress können somit negative Auswirkungen auf den gesamten Zellstoffwechsel haben und verschiedenste biochemische Prozesse in der Zelle beeinflussen.

Die Autoren einiger Studien vermuten, dass die durch Ag-NP verursachten Effekte nicht vollständig durch die Abgabe von Silberionen erklärt werden können (GRIFFITT et al., 2008; NAVARRO et al., 2008). Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen belegen letztendlich, dass zumindest ein Großteil der NP-Toxizität durch die Abgabe von Silberionen bedingt sein kann. Es wurden keine deutlichen Hinweise auf eine über die Ionentoxizität hinausgehende Wirkung der Ag-NP festgestellt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sind unter Beachtung des vorgestellten Wirkmechanismus plausibel. Die Wachstumsinhibition, welche bei vielen der mit Ag behandelten Zellen beobachtet wurde, könnte durch eine von DNA-Schäden verursachte Störung der Zellteilungsfähigkeit bedingt sein. Da auch Membranen und Proteine von den ROS beschädigt

werden, liegt es nahe, dass sich der Allgemeinzustand der Zelle verschlechtert, das Wachstum reduziert oder eingestellt wird und aus diesem Grund keine Teilung eingeleitet wird. Die Wachstumsinhibition ist eine in vielen Studien nachgewiesene Folge der Exposition von Algen gegenüber Nanosilber (TRIPATHI et al., 2017; HUANG et al., 2016; MORENO-GARRIDO et al., 2015; OUKARROUM et al., 2014). Anhand der Zellen von *C. meneghiniana* sind eine Fragmentierung von Zellmembran und Organellen sowie ein Zusammenziehen des Protoplasts erkennbar. Ähnliche Effekte wurden von DASH et al. (2012) nach einer Exposition von Algen gegenüber Ag-NP beobachtet. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen deuten damit auf eine Schädigung der Zellmembran hin, sodass weitere Ionen und ggf. Partikel in die Zelle gelangen. Hinweise auf eine Membranschädigung durch Ag werden durch viele Studien geliefert (HUANG et al., 2016; LE OUAY & STELLACCI, 2015; MCSHAN et al., 2014; MARAMBIO-JONES & HOEK, 2010).

Eine Reduktion des Chlorophyllgehalts durch die Anwesenheit von Ag-NP, wie sie die Ergebnisse nahelegen, wird ebenfalls durch andere Untersuchungen bestätigt (HUANG et al., 2016; OUKARROUM et al., 2014; DASH et al., 2012; OUKARROUM et al., 2012; SAISON et al., 2010). MIAO et al. (2009) vermuten eine Hemmung der Chlorophyllproduktion. Der reduzierte Chlorophyllgehalt kann sich negativ auf die Effizienz der Photosysteme und auf das Wachstum der Zellen auswirken, sodass sie sich letztendlich in einem schlechten Gesamtzustand befinden.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden teilweise negative Einflüsse des Ag auf die über die Chlorophyllfluoreszenz gemessenen Stressparameter ermittelt. Die Werte deuten auf eine Hemmung bzw. Schädigung von PS II hin. Auch andere Untersuchungen zeigen Einflüsse von Ag-Nanomaterialien auf die Photochemie. So wurde bei Mikroalgen eine Verringerung der photosynthetischen Ausbeute bzw. eine vollständige Inhibition der Photosynthese nachgewiesen (HUANG et al., 2016; NAVARRO et al., 2015; MIAO et al., 2009, NAVARRO et al., 2008). Zudem wurden Verringerungen des F_v/F_m -Werts von Diatomeen durch Ag beobachtet, was auf eine Hemmung des Elektronentransports schließen lässt (HUANG et al., 2016). Auch für andere Nanomaterialien, z. B. aus Kupfer, wurden entsprechende Effekte nachgewiesen (SAISON et al., 2010). Eine Beschädigung der Pigmente kann zudem zu einem niedrigen NPQ führen (HUANG et al., 2016). Des Weiteren ergeben sich Veränderungen der Genexpression, welche sich nachweislich auf das D1-Protein auswirken und somit Einflüsse auf die Elektronentransportrate haben können (HUANG et al., 2016). Auch eine allgemeine Beeinträchtigung photosynthetischer Enzyme ist zu erwarten (DASH et al., 2012).

Die mittels Elektronenmikroskop beobachtete verstärkte Einlagerung von Stärke durch *C. reinhardtii*, deutet darauf hin, dass die Umgebungsbedingungen für die Zellen ungünstig sind, sodass sie Energiespeicher anlegen, um die Phase zu überbrücken.

Titandioxid-Nanopartikel

Im Zusammenhang mit den TiO₂-NP werden die ermittelten Zellzahlen nur bedingt berücksichtigt, da sie aufgrund der Beeinflussbarkeit der Messmethode durch die NP nicht belastbar sind. Aussagen zum Wachstum beruhen daher überwiegend auf makroskopischen Beobachtungen während des Versuchs, die eine geringere Grünfärbung bestimmter Proben offenbarten. Derartige Beobachtungen können nur bei deutlichen Unterschieden zwischen der Kontrolle und einer Behandlungsgruppe gemacht werden und ermöglichen zudem keine Quantifizierung des Effekts. Sie können allerdings zeigen, dass die TiO₂-NP eine wachstumsinhibierende Wirkung haben.

Im Fall von *R. subcapitata* haben die TiO₂-n eine schädigende Wirkung auf die Zellen, welche durch alle betrachteten Endpunkte deutlich wird. Elektronenmikroskopisch ist zudem eine verstärkte Bildung von Lipidvakuolen in den Zellen zu beobachten. Zudem bilden NP-Aggregate eine mehr oder weniger vollständige Hülle um die einzelnen Algenzellen. Bei *C. reinhardtii* werden ebenfalls fast alle betrachteten Endpunkte negativ durch das Nanomaterial beeinflusst. Die elektronenmikroskopische Betrachtung der Zellen offenbart teilweise degradierte Zellorganellen und Stärkeansammlungen in den Zellen. Wie auch bei *R. subcapitata* sind die Algen teilweise von NP-Aggregaten eingeschlossen. Die Diatomee lässt ebenfalls eine Beeinträchtigung anhand der Zellzahl, dem Chlorophyllgehalt und der Stressparameter erkennen. Die Messung von F_v/F_m und NPQ führt teilweise zu positiven Ergebnissen, die nahelegen, dass die Zellen in einem besseren Zustand sind, als die NK. Da diese Werte jedoch eine sehr geringe Abweichung von der NK aufweisen und keine Konzentrationsabhängigkeit oder einen Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Endpunkte erkennen lassen, ist eine Abhängigkeit der Messergebnisse von der Anwesenheit der Nanomaterialien unwahrscheinlich.

Die TiO₂-COOH beeinflusst *R. subcapitata* negativ bezüglich des Wachstums und des Chlorophyllgehalts. *C. reinhardtii* zeigt keinerlei konzentrationsabhängige Reaktionen auf das Nanomaterial. Teilweise treten bei den beiden Grünalgen scheinbar konzentrationsunabhängige Effekte in Bezug auf die Stressparameter auf, welche allerdings nicht durch andere Endpunktmessungen unterstützt werden. In Bezug auf *C. meneghiniana* sind Beeinträchtigung von Zellzahl, Chlorophyllgehalt und Photosynthesekapazität nachweisbar.

Die Ergebnisse von *R. subcapitata* lassen auf eine toxische Wirkung der TiO₂-NH₂ schließen, die anhand von allen betrachteten Endpunkten erkennbar ist. Bei *C. reinhardtii* treten keine Effekte auf die Zellzahl, den Chlorophyllgehalt oder den F_v/F_m -Wert auf. Auffällig sind die sehr hohen und scheinbar konzentrationsabhängigen NPQ-Werte. Eventuell schirmen die NP, welche die Zellen umhüllen, diese vor den Lichtblitzen ab und reduzieren somit den Lichtstress während der Messung. Dies wiederum kann zu einem besseren Messwert im Vergleich zu den Zellen der NK führen, da diese nicht durch NP vor den Lichtblitzen geschützt werden. Bei der Diatomee wird

anhand der Beeinträchtigung aller Endpunkte eine Schädigung der Zellen durch das Nanomaterial deutlich. Eine Messung der Fluoreszenz war teilweise nicht möglich, was auf eine sehr starke Schädigung oder ein Absterben der Zellen hindeutet. In Bezug auf den Chlorophyllgehalt geht die in der höchsten Konzentration auftretende Reduktion in eine Erhöhung über. Eine Diskussion dieser teilweise positiven Wirkung des Nanomaterials wird in Kapitel 9.4.6 vorgenommen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche belegen, dass TiO₂-NP negative Effekte auf die Algenzellen haben. Die Giftigkeit von TiO₂-NP für Algen wird auch durch andere Studien belegt (OZKALELI & ERDEM, 2018; WANG et al., 2016a; DALAI et al., 2013). Die Substanz selbst wird sogar als potenziell geeignetes Biozid gegen Algenblüten eingestuft (REDDY et al., 2017).

Die Wirkweise von TiO₂ ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Ein möglicher Wirkmechanismus bezieht sich auf die Halbleitereigenschaft der Substanz. Durch die Zufuhr von Energie, z. B. Licht, können Elektronen im NP aus dem voll besetzten Valenzband in das Leitungsband überwechseln. Die dabei entstehenden Elektronen-Loch-Paare können an der Partikeloberfläche mit umgebenden Stoffen reagieren (REDDY et al., 2017; MORTIMER & MÜLLER, 2007). TiO₂ ist ein Photokatalysator, bei dem diese Anregung durch UV-Licht erfolgt. An der NP-Oberfläche können Reaktionen z. B. mit Sauerstoffmolekülen oder Wasser stattfinden, aus denen ROS hervorgehen, welche als starke Oxidationsmittel unter anderem die Zellmembran schädigen und oxidativen Stress bei Organismen auslösen können (OZKALELI & ERDEM, 2018; REDDY et al., 2017). Durch die Schädigung der Zellmembran dringen mehr ROS in die Zelle ein und reagieren mit Biomolekülen, wodurch Zellorganellen und Zellstoffwechsel beeinträchtigt werden können (OZKALELI & ERDEM, 2018; REDDY et al., 2017; WANG et al., 2016a). Bei Licht ist daher eine erhöhte Toxizität der photokatalytischen NP anzunehmen (DALEI et al., 2013). Anhand der TEM-Untersuchung konnte keine Aufnahme von TiO₂ durch die Algenzellen festgestellt werden, es gibt jedoch in einer anderen Studie Hinweise darauf, dass die Partikel in Algenzellen gelangen können (OZKALELI & ERDEM, 2018).

Die in den eigenen Untersuchungen beobachtete Wachstumsverringering ist ein häufig durch TiO₂-NP ausgelöster Effekt (OZKALELI & ERDEM, 2018; REDDY et al., 2017; WANG et al., 2016a; DALAI et al., 2013; METZLER et al., 2011; HARTMANN et al., 2010; ARUOJA et al., 2009). Die durch die TiO₂-NP gebildeten ROS können die Zellmembran schädigen und durchlässig machen, sodass die ROS und eventuell auch NP verstärkt ins Zellinnere gelangen und sich der oxidative Stress erhöht. Die Beschädigung der Membran ist in den eigenen Untersuchungen elektronenmikroskopisch erkennbar. Auch zeigen die Zellen Abwehrreaktionen wie die verstärkte Bildung von Lipidvakuolen bei *R. subcapitata*. Dies ist eine typische Stressantwort von Mikroalgen auf ungünstige Umweltbedingungen. Die Organismen legen Lipidreserven an, was häufig von einer Reduktion des Wachstums begleitet wird (ALONSO et al., 2000). Auch im Zusammenhang mit der

Exposition von Mikroalgen und anderen Einzellern gegenüber Nanomaterialien wurde eine verstärkte Bildung von Lipidvakuolen beobachtet (BABELE et al., 2018; KADAR et al., 2012). Zudem ist es denkbar, dass die Organismen versuchen die schädlichen Stoffe in abgetrennten Räumen zu isolieren und somit eine Beschädigung der Zellorganellen zu vermeiden. Vakuolen dient allgemein als Speicher- und Entgiftungsort für toxische Substanzen wie z. B. Schwermetalle (WEILER & NOVER 2008; CLEMENS, 2006). Auch für NP ist nachgewiesen, dass sie von Algen und anderen eukaryotischen Einzellern in Vakuolen gelagert werden (ZHAO et al., 2016; MORTIMER et al., 2014). Die in Teil I vorgestellten eigenen Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass aufgenommene NP in vesikelartigen Kompartimenten vom Rest der Zelle abgegrenzt werden (vgl. Teil 1, Kapitel 5.5.3). Ein weiterer Abwehrmechanismus ist die Einlagerung des Reservestoffs Stärke, um den Austausch mit dem umgebenden Medium zu reduzieren und die schlechten Bedingungen somit überdauern zu können.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen deuten zudem auf einen reduzierten Chlorophyll-Gehalt hin, wie er als Effekt von TiO₂-NP auch durch andere Studien bestätigt wird (OZKALELI & ERDEM, 2018; DALAI et al., 2013). Im Zusammenhang mit der Exposition gegenüber TiO₂-NP wird zudem häufig eine erhöhte ROS-Entstehung nachgewiesen (OZKALELI & ERDEM, 2018; DALAI et al., 2013), die in vielen Fällen in oxidativem Stress resultiert (OZKALELI & ERDEM, 2018; REDDY et al., 2017; WANG et al., 2016a). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen deutliche Veränderungen der Zellwand und -membran sowie eine fortgeschrittene Degradation der Zellorganellen, wie sie durch ROS verursacht werden können. Ähnliche Effekte, werden auch durch andere Studien belegt (DALAI et al., 2013; HARTMANN et al., 2013). So ist beispielsweise der Zellkern unregelmäßig geformt, das Pyrenoid fragmentiert und das Cytoplasma zusammengeschrumpft. Auch sind Ansammlungen von Stärke in den Zellen erkennbar (DALAI et al., 2013). Weitere Effekte sind die Lipidperoxidation (OZKALELI & ERDEM, 2018; METZLER et al., 2011) und ggf. daraus resultierende Schädigungen wie Deformationen und Permeabilitätsveränderungen der Zellmembran (OZKALELI & ERDEM, 2018; DALAI et al., 2013) sowie Beschädigungen der Zellwand (WANG et al., 2016a). Da ROS unter anderem Membranen, Proteine und DNA im Zellinneren beschädigen können, sind die Wachstumshemmung, der reduzierte Chl a-Gehalt, die erhöhten Stressparameter sowie die Deformationen auf zellulärer Ebene durch diesen Mechanismus plausibel erklärbar. Es wird vermutet, dass der physische Kontakt zwischen Zellen und Nanomaterialien maßgeblich die Toxizität erhöht (VON MOOS & SLAVEYKOVA, 2014).

Die durchgeführten TEM-Untersuchungen liefern den Hinweis auf einen weiteren möglichen Wirkmechanismus von TiO₂-NP. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die TiO₂-NP eine Art Hülle dicht um die einzelnen Zellen herum bilden. Dass diese Hülle in vielen Fällen große Teile der Zellen umschließt, obwohl diese im Rahmen der Einbettung mehrfach

gewaschen wurden und die NP-Agglomerate damit großen physikalischen Belastungen ausgesetzt waren, spricht dafür, dass die Hüllen sehr stabil an die Zellen gebunden sind. Die hohe Affinität von TiO₂ zu Algenzellen und die daraus resultierende Umhüllung dieser, werden auch durch andere Studien beschrieben (OZKALELI & ERDEM, 2018; WANG et al., 2016a; HARTMANN et al., 2013; METZLER et al., 2011; ARUOJA et al., 2009). Es wird vermutet, dass die Aggregation der NP durch von den Zellen ausgeschiedenen extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) gefördert wird (METZLER et al., 2011). Ein negativer Effekt kann durch eine Umhüllung der Zellen mit einem Gemisch aus NP und EPS entstehen, da diese zu einer Beschattung der Zellen und damit zu Lichtmangel führen kann (ARUOJA et al., 2009). Dieser wiederum kann sich z. B. in einer Reduktion des Chl a-Gehalts äußern (WANG et al., 2016a). Auch eine durch das Nanomaterial bedingte Limitierung der Nährstoffaufnahme sowie des Elektrolyt- und Metabolitentransports ist denkbar (WANG et al., 2016b; METZLER et al., 2011; ARUOJA et al., 2009). Dieser Mechanismus ist ebenso wie die Entstehung von oxidativem Stress geeignet um das reduzierte Wachstum und die Beeinträchtigung der Stressparameter zu erklären. Anhand der ermittelten Ergebnisse sind letztendlich beide beschriebenen Wirkmechanismen denkbar.

Polystyrol-Nanopartikel

Alle gegenüber PS-n exponierten Algenkulturen zeigen eine Wachstumsstimulation über die Zellzahl. Bei den beiden Grünalgen sind keine konzentrationsabhängigen Effekte auf den Chlorophyllgehalt erkennbar und auch die Stressparameter deuten nicht auf eine Beeinträchtigung der Zellen hin. Bei *C. meneghiniana* steigt der Chlorophyllgehalt durch die PS-n-Exposition an und auch die PS II scheinen effektiver zu arbeiten als bei der NK. Bei den Stressparametern treten vereinzelt Werte auf, die keine Konzentrationsabhängigkeit vermuten lassen bzw. nicht in einem sinnvollen Zusammenhang zu den übrigen Endpunkten stehen.

Die PS-COOH haben entweder keine oder positive Effekte auf Zellzahl und Chlorophyllgehalt. Bezüglich der Stressparameter lässt sich bei keiner Art ein von der NP-Konzentration abhängiger Effekt feststellen. Die Effekte, die hier vereinzelt auftreten, finden sich bei den übrigen Parametern nicht wieder oder weichen mit weniger als 2 % nur geringfügig von der NK ab.

R. subcapitata scheint durch die PS-NH₂ nur hinsichtlich der Regeneration bei Lichtstress beeinträchtigt zu sein, wobei der Effekt schon bei sehr geringen Konzentrationen auftritt. Davon abgesehen werden bei der Art durch die NP keine erkennbaren Effekte ausgelöst. Bei *C. reinhardtii* und *C. meneghiniana* ist ein Anstieg der Zellzahl erkennbar, welcher sich bei der Diatomee zudem in einem erhöhten Chlorophyllgehalt widerspiegelt. Die gegenüber PS-NH₂ exponierten Zellen von *C. reinhardtii* scheinen gut mit Lichtstress zurechtzukommen, da sie diesbezüglich höhere Werte als die Zellen der NK aufweisen. Bei der Diatomee ist hingegen teilweise eine verringerte Regenerationsfähigkeit erkennbar. Auch bei diesen Versuchen treten scheinbar konzentrationsunab-

hängige und sehr geringe Abweichungen von der NK auf, die jedoch signifikant sind. Aufgrund des Abgleichs mit den anderen Endpunkten scheinen diese jedoch keinen eindeutigen Effekt der Exposition gegenüber den Nanomaterialien zu zeigen. Die fördernden Effekte auf die Zellzahl und den Chlorophyllgehalt, welche bei der LK im Versuch mit *C. meneghiniana* auftreten, lassen nicht auf eine allgemein positive Wirkung des Lösemittels schließen, da in zwei weiteren Versuchen mit dieser Art das Lösemittel in der gleichen Konzentration wirkungslos eingesetzt wurde. Zudem kann ausgeschlossen werden, dass die positiven Effekte in den NP-Behandlungen durch das Lösemittel verursacht werden, da sie deutlich stärker als in der LK sind.

Die Exposition der Algen gegenüber PS-NP führt verglichen mit der NK entweder zu einer Zunahme der Zellzahl bzw. des Chlorophyllgehalts oder hat keinen Effekt auf das Wachstum. Eine Wachstumshemmung kann aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Morphologische Veränderungen sind elektronenmikroskopisch ebenfalls nicht erkennbar. Die Stressparameter zeigen sowohl positive als auch negative konzentrationsunabhängige Effekte an, welche die Aussagekraft der übrigen Resultate herabsetzen. Parameterübergreifende, eindeutig negative Effekte auf die Algenzellen treten bei den PS-NP nicht auf.

Der Vergleich mit anderen Studien zeigt, dass in Bezug auf aquatische Organismen und insbesondere Mikroalgen deutlich weniger Untersuchungen mit PS-NP als mit Ag- und TiO₂-NP zur Verfügung stehen. Im Zusammenhang mit der Verschmutzung von Oberflächengewässern durch Kunststoffteilchen nimmt die Relevanz und damit auch die Menge der Untersuchung von PS-NP jedoch derzeit deutlich zu (BERGAMI et al., 2017; SJOLLEMA et al., 2016).

Die Erkenntnisse aus anderen Veröffentlichungen decken sich teilweise mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen. So treten in einigen Fällen keine oder nur sehr geringe Effekte auf Mikroalgen bei recht hohen Konzentrationen von 250 µg PS/mL auf (BERGAMI et al., 2017; SJOLLEMA et al., 2016; BESSELING et al., 2014). In vielen Versuchen kommt es jedoch zu negativen Auswirkungen. Diese umfassen bei Algen unter anderem Wachstumsinhibition (BESSELING et al., 2014; CASADO et al., 2013), Reduktion des Chlorophyllgehalts (BESSELING et al., 2014), Verringerung der Photosynthese und erhöhte ROS-Produktion (BHATTACHARY et al., 2010). Ob es durch den jeweiligen Partikeltyp tatsächlich zu einer Beeinträchtigung kommt, scheint in hohem Maße von den funktionellen Gruppen abhängig zu sein, mit denen die Partikeloberfläche häufig modifiziert ist (BERGAMI et al., 2017; BESSELING et al., 2014). Auch die Adsorption von PS-NP an der Zellwand von Algen ist stark von den funktionellen Gruppen abhängig (BERGAMI et al., 2017; NOLTE et al., 2017; BHATTACHARY et al., 2010). Eine übermäßige Adsorption von NP an der Zellwand konnte elektronenmikroskopisch nicht festgestellt werden. Allerdings ist zu beachten, dass die Zellen im Rahmen der Probenvorbereitung für das TEM mehrfach gewaschen werden, wobei auch Chemikalien verwendet werden, welche PS lösen können (vgl. Teil I, Kapitel 5.1.2). Es kann daher

nicht ausgeschlossen werden, dass die Partikel durch den Waschvorgang von der Zellwand entfernt wurden und aus diesem Grund nicht mit dem TEM nachweisbar sind.

Für PS-NP werden verschiedene Wirkmechanismen in Betracht gezogen. So wird unter anderem eine Schädigung der Zellmembran durch polykationische Polymere vermutet, die zur Entstehung von Löchern und damit einer erhöhten Durchlässigkeit der Membran führen können (CASADO et al., 2013; LEROUEIL et al., 2008). Eine andere Möglichkeit besteht in der Lichtstreuung durch die Partikel, welche eine Hemmung der Photosynthese nach sich ziehen kann (NOLTE et al., 2017; BHATTACHARY et al., 2010). Die Reduktion der Photosyntheseaktivität kann wiederum die zellinterne ROS-Produktion verstärken (BHATTACHARY et al., 2010). Im Zusammenhang mit PS-NP kann es zudem zu Veränderungen der Mediumszusammensetzung kommen, da sie Mediumbestandteile an ihrer Oberfläche adsorbieren können (CASADO et al., 2013; CASEY et al., 2008). Interaktionen zwischen Medium und Partikeln können zudem zu wechselnden Mengen an mehrwertigen Ionen führen, was einen Abbau von Nährstoffen und einen erhöhten osmotischen Druck nach sich ziehen kann (NOLTE et al., 2017). Veränderungen der Mediumszusammensetzung können sich negativ auf die Vitalität der Versuchsorganismen auswirken und somit indirekt Effekte verursachen.

Die Bindungsaffinität der Partikel an die Zellwand wird durch verschiedene Faktoren, unter anderem die Härte des Mediums und die Partikelkonzentration (NOLTE et al., 2017), die Oberflächenstruktur der Zellwand sowie die Morphologie der Zelle (BHATTACHARY et al., 2010) beeinflusst. Im Fall von PS-NP ist die Interaktion mit der Zellwand in Bezug auf die Toxizität häufig sehr wichtig, da sie diese aufgrund ihrer Größe nicht passieren können und daher außerhalb der Zelle ihre toxische Wirkung entfalten (NOLTE et al., 2017). Die Aufnahme von PS-NP ist zumindest für tierische Zellen belegt (BERGAMI et al., 2017). In Bezug auf Mikroalgen wurde eine Aufnahme in die Zellen in den betrachteten und zitierten Studien nicht nachgewiesen. Die Zellwand von Algen scheint eine recht wirksame Barriere gegen das Eindringen von PS-NP darzustellen, was wahrscheinlich vor allem an der geringen Größe der Zellwandporen liegt, deren Durchmesser beispielsweise bei *R. subcapitata* auf 4,7 bis 8,8 nm geschätzt wird (NOLTE et al., 2017). Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten PS-NP mit einer durchschnittlichen Mindestgröße von über 30 nm, ist eine Passage der intakten Zellwand über die Zellwandporen nicht möglich.

In den eigenen Untersuchungen konnten die in anderen Studien beschriebenen toxischen Effekte durch PS-NP nicht beobachtet werden. Die Toxizität von PS-NP wird gemäß den erwähnten Studien vor allem durch die Oberflächenfunktionalisierung der Partikel verursacht, wobei von den Partikeln selbst keine übermäßige toxische Wirkung auszugehen scheint. Da die funktionellen Moleküle an der Partikeloberfläche sich wahrscheinlich je nach Hersteller bezüglich ihrer Konzentration pro Fläche unterscheiden und auch die Größe der Oberfläche selbst eine Rolle

spielt, können für unterschiedliche Produkte abweichende Ergebnisse entstehen. Es muss in Betracht gezogen werden, dass die Funktionalisierung der verwendeten Nanomaterialien in der vorliegenden Untersuchung nicht im vorgesehenen Maß funktioniert hat. Eventuell ist die Menge der funktionellen Gruppen an der Partikeloberfläche nicht groß genug, um einen toxischen Effekt zu verursachen. Zudem hat das verwendete Medium scheinbar einen großen Einfluss auf die Toxizität der Partikel.

EPS sind eine weitere Möglichkeit, um die Toxizität von NP zu beeinflussen. Sie werden von verschiedenen Mikroalgen, darunter Diatomeen, aber auch Grünalgen wie *C. reinhardtii* und *R. subcapitata* an die Umgebung abgegeben (XIAO & ZHENG, 2016; THOMPSON et al., 2008; KOUKAL et al., 2007) und bestehen hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen, Nucleinsäuren und Lipiden (XIAO & ZHENG, 2016). Sie dienen unter anderem der Adhäsion an Oberflächen sowie der Zellaggregation. Auch die Wasserrückhaltung und Anreicherung von Nährstoffen wird durch diese Substanzen begünstigt, welche eine Art Hülle um die Zellen bilden (XIAO & ZHENG, 2016). EPS können zudem als Antwort auf extrazellulären Stress als Abwehrmechanismus produziert werden, um das Eindringen von Substanzen in die Zelle zu verhindern (BERGAMI et al., 2017; KUMAR et al., 2007). Eine Aggregation der Zellen konnte in der höchsten Konzentration bei *C. meneghiniana* und *R. subcapitata* makroskopisch beobachtet werden und unterstützt die Annahme, dass EPS durch die Zellen ausgeschieden werden. Es ist möglich, dass EPS zu einer Aggregation bei NP führen und somit deren Oberfläche und damit die Toxizität reduzieren.

9.4.4 Einfluss der Partikelmodifikationen

Die Testung verschiedentlich modifizierter NP soll Aufschluss darüber geben, inwiefern funktionelle Gruppen wie $-COOH$ und $-NH_2$ an der Nanopartikeloberfläche einen Einfluss auf das Verhalten und die Toxizität des Nanomaterials haben. Von jedem Grundmaterial wurden jeweils ein unmodifizierter sowie zwei modifizierte Nanopartikeltypen verwendet. Die modifizierten Formen zeichnen sich durch eine positive ($-NH_2$) bzw. eine negative ($-COOH$) Oberflächenladung aus. Die Einflüsse der Modifikationen werden anhand eines Vergleichs der berechneten EC_{50} -Werte bzw. LOEC und NOEC ermittelt.

In Bezug auf die silberhaltigen Testsubstanzen kann anhand der EC_{50} -Werte festgestellt werden, dass $AgNO_3$, $Ag-COOH$ und $AgPure$ die größte toxische Wirkung auf *R. subcapitata* haben. Die LOEC-Werte zeigen zudem, dass $Ag-NH_2$ bei beiden Grünalgen erst bei höheren Konzentrationen als die übrigen silberhaltigen Testsubstanzen negative Effekte verursachen. Bei der Diatomee treten durch $AgNO_3$ Effekte bei geringeren Konzentrationen als bei den NP auf. $Ag-NH_2$ führen bei niedrigeren Konzentrationen zu Effekten als $Ag-COOH$ und $AgPure$. Die ermittelten EC_{50} -Werte zeigen allerdings, dass die unmodifizierten Partikel eine niedrigere EC_{50} aufweisen als die modifizierten Partikel und somit toxischer sind. Eine bei niedrigeren Konzentrationen

beginnende toxische Wirkung einer Substanz muss somit nicht zwangsläufig zu einer niedrigeren EC_{50} als bei einer Substanz führen, deren Toxizität erst bei einer höheren Konzentration erstmalig nachgewiesen wird. Insgesamt ist ein versuchsübergreifender Einfluss der Modifikation nicht offensichtlich. Die Toxizität scheint eher von der Algenart bzw. dem eingesetzten Medium abhängig zu sein.

In Bezug auf TiO_2 können nur die LOEC-Werte zu Rate gezogen werden, da keine vergleichbaren EC_{50} -Werte vorliegen. Diese zeigen für alle drei Algenarten eine bei höheren Konzentrationen beginnende Toxizität hinsichtlich der TiO_2-NH_2 als bei den übrigen TiO_2-NP . Ein Unterschied hinsichtlich der Toxizität von TiO_2-n und TiO_2-COOH ist anhand der erhobenen Daten nicht ersichtlich.

Da eine Toxizität der PS-NP im untersuchten Konzentrationsbereich nicht nachweisbar war, kann für diese Partikel keine Einschätzung des Einflusses der Oberflächenfunktionalisierung auf die Toxizität vorgenommen werden.

Die Oberflächenmodifikation scheint keinen die Ergebnisse durchgehend dominierenden Einfluss auf die Toxizität von Nanomaterialien bzw. die Konzentration zu haben, bei der erste Effekte nachweisbar sind. Aufgrund der Versuchsergebnisse von TiO_2-NH_2 und $Ag-NH_2$ kann vermutet werden, dass die Partikel mit positiver Oberflächenladung zumindest teilweise eine geringere Toxizität aufweisen als die übrigen Partikeltypen. Gründe hierfür können eine stärkere Zusammenlagerung und damit eine Verkleinerung der Partikeloberfläche sein, sodass weniger Ionen abgegeben werden bzw. weniger ROS entstehen. Auch in anderen Untersuchungen wurde ein Einfluss der Oberflächenmodifikation von NP auf ihre Löslichkeit festgestellt (CASADO et al., 2013; MISRA et al., 2012). Eine verstärkte Zusammenlagerung der aminierten Nanomaterialien lässt sich anhand der Messung der Absorptionswerte nicht eindeutig bestätigen. Die beiden verwendeten Medien sind mit einem pH-Wert von 7,5 – 7,8 leicht basisch. Es ist möglich, dass die positive Oberflächenladung der aminierten NP durch die Reaktion mit den negativ geladenen Hydroxidionen des umgebenden Mediums zu einer Abschwächung der Ladung der Partikeloberfläche führt. Damit geht ein Nachlassen der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Partikeln einher, was wiederum zu einer Zunahme von Zusammenlagerungen führen kann. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Nanoobjekte durch die Interaktion der positiv geladenen funktionellen Gruppen mit Mediumsbestandteilen oder EPS besser abgeschirmt sind und ihr Kontakt mit den Algenzellen somit reduziert wird.

Bemerkenswert ist, dass die Wirkung von AgPure und Ag-COOH durchaus vergleichbar mit jener von $AgNO_3$ ist. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Effekte bei den Ag-Nanomaterialien deutlich geringer ausfallen bzw. später eintreten als bei dem Silbersalz, da nur an der Partikeloberfläche Ionen freigesetzt werden und dadurch mit einer langsameren Abgabe zu

rechnen ist. Da dies jedoch laut den ermittelten Ergebnissen nicht grundsätzlich der Fall ist, kann vermutet werden, dass die NP die Ionen zwar langsamer abgeben, sich die Silberionen-Konzentration jedoch durch die große Oberfläche der Nanomaterialien und die damit verbundene erhöhte Ionenabgabe relativ schnell an die durch Silbernitrat verursachte Ionenkonzentration angleicht und die toxischen Wirkungen am Testende daher vergleichbar sind. Zudem ist es möglich, dass die Bioverfügbarkeit der durch das Silbernitrat freiwerdenden Ionen durch organische Substanzen im Medium immer weiter reduziert wird, während durch die NP kontinuierlich neue Ionen freigesetzt werden und diese somit eine durchgehend toxische Wirkung haben. Sollten zudem NP in die Zellen aufgenommen werden, erfolgt eine Abgabe der Ionen direkt im Zellinneren, sodass die Exposition deutlich erhöht ist.

In Bezug auf PS-NP wird deren toxische Wirkung häufig auf ihre Oberflächenmodifikation zurückgeführt. Dass die PS-NP in den durchgeführten Versuchen keine negative Wirkung zeigten, kann durch den Funktionalisierungsprozess bedingt sein. Die Partikel wurden gezielt für das Projekt „NanoUmwelt“ produziert, weshalb keine umfangreichen Erfahrungswerte zur Wirksamkeit der Oberflächenmodifikation vorliegen. Es wurden keine Untersuchungen durchgeführt, welche Erkenntnisse zum Erfolg der Funktionalisierung der Partikeloberfläche liefern bzw. darauf schließen lassen, wie viele funktionelle Gruppen wie fest an die NP gebunden sind. Gegebenenfalls können Unterschiede zwischen den Modifikationen nicht herausgestellt werden, da diese nicht umfangreich genug waren, um einen Effekt auszulösen. Aus anderen Veröffentlichungen kann geschlossen werden, dass eine geladene Partikeloberfläche eine leichtere Passage durch die Zellmembran ermöglicht (FRÖHLICH, 2012), da ihre Molekularstruktur proteinähnlicher ist als bei neutralen Partikeln (LIBRALATO et al., 2017; ROSSI et al., 2014), wobei positiv geladene Nanoobjekte eher aufgenommen werden als negativ geladene (NAM et al., 2013; FRÖHLICH, 2012). Für Ag und PS wurde bei positiv geladenen Partikeln zudem eine höhere Toxizität und bei PS-NP zusätzlich eine höhere ROS-Produktion nachgewiesen als bei neutralen und negativ geladenen Partikeln (FRÖHLICH, 2012; BHATTACHARY et al., 2010). Von MOOS & SLAVEYKOVA (2014) resümieren, dass Oberflächenmodifikationen bei NP sowohl zu einer Verstärkung als auch einer Verringerung der Toxizität führen können. Die Literaturrecherche zeigt insgesamt, dass besonders bei PS-NP Wirkungsunterschiede im Zusammenhang mit der Oberflächenmodifikation festgestellt werden. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die Toxizität dieser Partikel häufig deutlich geringer als bei anderen Nanomaterialien ist und daher Effekte der funktionellen Gruppen deutlicher sichtbar werden, da keine Überlagerung durch die Toxizität des Grundmaterials das Ergebnis beeinflusst.

9.4.5 Bewertung der Testorganismen

Der Vergleich der Sensitivität der in den eigenen Untersuchungen verwendeten Mikroalgen soll eine allgemeine Einschätzung ihrer Eignung zur Toxizitätsabschätzung von Nanomaterialien ermöglichen.

Algen sind im Zusammenhang mit Nanomaterialien typische Testorganismen. Laut einer Literaturstudie von Kahru & Dubourguier (2010) basieren rund 14 % der in ökotoxikologischen Untersuchungen von Nanomaterialien ermittelten Daten auf Versuchen mit Algen. Als Primärproduzenten spielen die Organismen eine wichtige Rolle, insbesondere in aquatischen Ökosystemen, und sind somit wichtige Testorganismen bei der Untersuchung der Toxizität von Nanomaterialien.

Zunächst ist festzustellen, dass alle drei Algenarten in den Versuchen problemlos und mit geringem Aufwand als Testorganismen verwendet werden konnten. Die Wachstumsraten waren unter den gewählten Testbedingungen valide und führten somit zu einem gut kalkulierbaren Arbeitsaufwand, da keine Tests aufgrund von Wachstumsproblemen in den NK wiederholt werden mussten. Auch die Haltung der Algen außerhalb der Versuche ist insgesamt unproblematisch und mit geringem Zeitaufwand zu bewältigen. Der Vergleich mit anderen Untersuchungen zeigt zudem, dass die ausgewählten Stämme ähnliche Reaktionen zeigen und somit für Toxizitätsuntersuchungen geeignet sind.

Silber-Nanopartikel und Silbernitrat

Beim Vergleich der beiden Grünalgenarten anhand der EC_{50} - und LOEC-Werte kann in Bezug auf die silberhaltigen Testsubstanzen klar festgestellt werden, dass *R. subcapitata* empfindlicher reagiert als *C. reinhardtii*. Hinsichtlich der Aufnahme von Ag kommen vergleichende Studien über die beiden Arten zu unterschiedlichen Ergebnissen. So geben LEE et al. (2005) an, dass *R. subcapitata* Ag eher langsam aufnimmt, während es bei *C. reinhardtii* zu einer deutlich schnelleren Aufnahme und zudem einer stärkeren Toxizität kommt. HIRIART-BEAR et al. (2006) zeigen hingegen eine schnellere Silberaufnahme bei *R. subcapitata* und ähnliche Ergebnisse beider Arten hinsichtlich der Toxizität. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte durchgehend eine sensiblere Reaktion von *R. subcapitata* festgestellt werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass *R. subcapitata* durch die silberhaltige Testsubstanzen stärker bzw. bei geringeren Konzentrationen beeinträchtigt wird als *C. reinhardtii*. Es ist möglich, dass die Abwehrmechanismen von *C. reinhardtii* besser geeignet sind, um mit den Silberionen umzugehen. Dies kann sich z. B. in einer effektiveren Produktion von EPS äußern. Viele Algen sind in der Lage EPS auszuschcheiden, welche die toxischen Effekte von Silberionen reduzieren. Sie könnten die Lösungsgeschwindigkeit von Ag-NP regulieren oder deren Agglomeration fördern, sodass die Bioverfügbarkeit reduziert wird (TRIPATHI et al., 2017; SOLDI et al., 2005). Auch eine

Komplexierung von Bestandteilen der Nanomaterialien durch die EPS ist denkbar. Im Zusammenhang mit Ag-NP konnte eine gesteigerte Produktion und Ausscheidung von EPS bei Mikroalgen nachgewiesen werden (MIAO et al., 2009). Algen werden aufgrund ihrer Eigenschaft NP zu binden sogar als mögliches Werkzeug betrachtet, um diese z. B. in Form von Bio-Filtern aus der Umwelt zu entfernen (DALAI et al., 2013). Ein Unterschied zwischen den beiden Arten besteht darin, dass *C. reinhardtii* in der Lage ist Dauerstadien zu bilden, um ungünstige Umweltbedingungen zu überdauern (GOODENOUGH et al., 2007). Dies schließt ein, dass die Zellen den Stoffaustausch mit der Umgebung reduzieren und so weniger Silberionen aufgenommen werden, was wiederum zu einer geringeren Schädigung der Zelle führt. Zwar findet bei Zellen, welche sich in einem Dauerstadium befinden, keine Zellteilung mehr statt, während der Übergangsphase, in der die verlangsamten Stoffwechselprozesse die Auswirkungen toxischer Substanzen reduzieren, komme es jedoch ggf. noch zur Zellteilung während bei *R. subcapitata* durch eine potenziell höhere Aufnahme an Silberionen die Teilungsaktivität bereits vollständig zum Erliegen gekommen ist. Der Übergang zu Dauerstadien konnte bei *C. reinhardtii* im Zusammenhang mit silberhaltigen Substanzen elektronenmikroskopisch beobachtet werden. Die Art ist zudem in der Lage sich heterotroph zu ernähren (Zhang et al., 1999), weshalb Schädigungen des Photosyntheseapparats ggf. weniger dramatische Auswirkungen auf den Allgemeinzustand der Zelle haben als es bei *R. subcapitata* der Fall ist.

Im Vergleich mit den beiden Grünalgenarten ist die Diatomee hinsichtlich der silberhaltigen Testsubstanzen gemäß der EC₅₀- und LOEC-Werte deutlich weniger empfindlich. Eine plausible Erklärung hierfür beruht auf den unterschiedlichen Kulturmedien, welche zur Haltung der Algen verwendet werden. Während die beiden Grünalgen limnische Organismen sind, kommt *C. meneghiniana* in Brackwasser und marinen Habitaten vor. Das Kulturmedium enthält daher einen vergleichsweise hohen Anteil an Natriumchlorid (NaCl). Wie in Kapitel 9.4.3 dargelegt wurde, ist die Toxizität der Ag-NP wahrscheinlich hauptsächlich durch abgegebene Silberionen bedingt. Diese Ionen reagieren mit dem in Lösung vorhandenen Chlorid und bilden Silberchlorid. Dieser Vorgang könnte die Bioverfügbarkeit des Ag für die Kieselalgen massiv reduzieren, sodass im Vergleich mit den Grünalgen eine deutlich geringere Toxizität auftritt. Daraus lässt sich ableiten, dass zumindest silberhaltige Nanomaterialien in marinen Ökosystemen anders wirken können als in limnischen, da der Salzgehalt einen erheblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von ansonsten sehr toxischen Silberionen haben kann. Ein Einfluss des Mediums auf die Toxizität von Nanosilber wird auch durch die Ergebnisse anderer Untersuchungen unterstützt (ANGEL et al., 2013; LEE et al., 2005). Dass eine Reduktion der Silberionen im Medium zu einer deutlich geringeren Toxizität der NP führt, untermauert zudem die Theorie, dass die negativen Effekte überwiegend durch Ionen bedingt sind. Aufgrund der vermutlich verringerten Exposition der Diatomee gegenüber den silberhaltigen Testsubstanzen kann keine belastbare Aussage

hinsichtlich der Sensitivität des Organismus gegenüber Ag im Vergleich zu den Grünalgen getroffen werden.

Titandioxid-Nanopartikel

Hinsichtlich der TiO₂-NP kann keine eindeutige Empfindlichkeitsabstufung zwischen den Arten vorgenommen werden. *R. subcapitata* und *C. meneghiniana* weisen allerdings in fast allen Fällen eine niedrigere LOEC als *C. reinhardtii* auf und reagieren somit bereits bei geringeren Konzentrationen der Testsubstanzen. Wie bereits im Zusammenhang mit den silberhaltigen Testsubstanzen beschrieben, ist es möglich, dass die von der Art ausgeschiedenen EPS besonders effektiv hinsichtlich der Agglomeration von Nanomaterialien sind. Auch im Zusammenhang mit TiO₂-NP wurde zudem elektronenmikroskopisch die Einlagerung von Stärke bei *C. reinhardtii* beobachtet, was auf die Bildung von Dauerstadien hindeutet. Ausgehend von der Theorie, dass zumindest ein Teil der von TiO₂-NP verursachten Toxizität durch das Umschließen einzelner Zellen durch eine Art Hülle aus NP und einer damit einhergehenden Reduktion von Licht- und Nährstoffzufuhr bedingt ist, könnte *C. reinhardtii* gegenüber den anderen beiden Algen einen erheblichen Vorteil haben. Die Art ist begeißelt und bewegt sich lichtgesteuert fort (WEILER & NOVER, 2008). Die aktive Bewegung hin zum Licht könnte ein Einschließen der Zellen durch die NP verlangsamen bzw. verhindern. Sollte zudem die Lichtintensität durch die Interaktion der Zelloberfläche mit NP nicht mehr ausreichend für eine optimale Photosynthese sein, ist *C. reinhardtii* in der Lage zusätzlich heterotroph Verbindungen aus dem umgebenden Medium aufzunehmen und umzusetzen.

Polystyrol-Nanopartikel

Da keine der Algenarten bezüglich Zellzahl oder Chlorophyllgehalt eine negative Reaktion auf die PS-NP zeigte, können hieraus keine Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit abgeleitet werden. Ein allgemeiner Trend lässt sich aufgrund der wenigen vorhandenen Studien auch nicht aus anderen Veröffentlichungen ermitteln. In einer Studie wurden zwar sowohl eine limnische Grünalge als auch eine Diatomeenart untersucht, es wurde jedoch auch bei der höchsten getesteten Konzentration (250 µg/mL) kein Effekt der Nanomaterialien auf die beiden Arten festgestellt (SJOLLEMA et al., 2016).

Wahl des Testorganismus

Im direkten Vergleich der beiden Grünalgen *C. reinhardtii* und *R. subcapitata*, welche beide in limnischen Gewässern vorkommen, ist letztere als Versuchsorganismus vorzuziehen, da sie durchgehend empfindlicher auf die Testsubstanzen reagiert und somit eine realistischere Einschätzung von deren Toxizität ermöglicht, da auch sehr sensitive Organismen durch die Art repräsentiert werden. Die Verwendung von *R. subcapitata* als Standardtestorganismus in

Toxizitätsuntersuchungen ist auf Basis der hier ermittelten Ergebnisse absolut gerechtfertigt, es ist allerdings festzustellen, dass die Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den beiden untersuchten Grünalgenarten mitunter recht gering sind. Daher kann eine Verwendung von *C. reinhardtii* als Testorganismus durchaus in Betracht gezogen werden, vor allem da die Art den Vorteil hat, auch in Böden vorzukommen und somit vergleichende Untersuchungen in unterschiedlichen Umweltkompartimenten zulässt.

In Bezug auf die Diatomee *C. meneghiniana* ist festzustellen, dass die Art grundsätzlich ebenfalls eine hohe Sensitivität in Bezug auf Nanomaterialien aufweist, wie sich beim Vergleich mit den Grünalgen in den Versuchen mit TiO₂-NP zeigt. Zwar beeinflusst das salzhaltige Medium die Wirkung von Nanomaterialien wie Ag, es ermöglicht jedoch auch eine Einschätzung der Toxizität von nanoskaligen Substanzen in marinen und brackigen Ökosystemen. In Anbetracht dessen und der nachgewiesenen Empfindlichkeit von *C. meneghiniana* ist die Art als Testorganismus durchaus geeignet. Es ist allerdings die im Vergleich mit den Grünalgen geringere Teilungsrate zu beachten, die eine längere Exposition erforderlich macht und den Vergleich mit Standardtestorganismen wie *R. subcapitata* erschwert.

9.4.6 Stimulationseffekt

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der Toxizität von Nanomaterialien. Vor allem im Zusammenhang mit PS-NP wurden jedoch stimulierende Effekte auf den Chlorophyllgehalt und die Zellzahl festgestellt. Diese deuten zwar nicht auf eine Toxizität hin, werden jedoch im Folgenden dennoch genauer betrachtet, da sie zum Spektrum der von NP verursachten Effekte gehören und somit zur Erweiterung der Kenntnisse über diese Materialien beitragen.

Wirkung der Testsubstanzen

Eine stimulierende Wirkung der Testsubstanzen wurde zum einen im Zusammenhang mit TiO₂-NH₂ nachgewiesen. Hierbei war bei der höchsten untersuchten Konzentration eine Verringerung des Chl a-Gehalts zu beobachten, die mit abnehmender Konzentration in eine Erhöhung überging. Zum anderen wurde für alle drei PS-NP ein positiver und weitgehend konzentrationsabhängiger Effekt auf die Zellzahl und den Chlorophyllgehalt ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass NP in Abhängigkeit von ihrer Konzentration positive Effekte auf Algen haben können. Im Fall von TiO₂-NH₂ tritt ein solcher Effekt unterhalb der toxisch wirkenden Konzentration auf. Hierbei ist davon auszugehen, dass nach dem positiven Effekt bei niedrigen Konzentrationen die Partikel mit zunehmender Konzentration toxisch wirken. In Bezug auf die PS-NP ist ebenfalls damit zu rechnen, dass die Stimulation bei geringeren Konzentrationen auftritt als die Hemmung, sofern die Partikel überhaupt eine toxische Wirkung haben, was in den

durchgeführten Versuchen innerhalb des gewählten Konzentrationsbereichs nicht gezeigt werden konnte.

Da die positiven Effekte sowohl in Bezug auf den Chlorophyllgehalt als auch auf die Zellzahl nachweisbar sind, ist es naheliegend, dass ihnen eine Wachstumsstimulation zugrunde liegt. Andere Studien zu stimulierenden Wirkungen von PS oder TiO₂-NP wurden nicht gefunden. Es existieren jedoch einige wenige Untersuchungen, welche durch NP ausgelöste stimulierende Effekte bei subletalen Konzentrationen erwähnen (XIU et al., 2012). So konnten HUANG et al. (2016) bei niedrigen Konzentrationen von Ag-NP einen Anstieg des Chl a-Gehalts bei einer Kieselalge feststellen. Für eine Wachstumsstimulation kann es mehrere Gründe geben. Zum einen wachsen Mikroalgen mitunter adhäsiv bzw. bilden Aggregate miteinander (XIAO & ZHENG, 2016; SILVA-ACIARES & RIQUELME, 2008), was durch aus NP gebildete Sekundärpartikel vereinfacht werden könnte. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist der Hormesis-Effekt, demzufolge die Anwesenheit von geringen Konzentrationen toxischer Substanzen Reparaturmechanismen aktivieren kann, wobei der Reparaturprozess ggf. überkompensiert, was eine Stimulation der Wachstums nach sich ziehen kann (XIU et al., 2012, CALABRESE, 2004). Denkbar ist zudem, dass Beeinträchtigungen durch Bakterien und Pilze besser eingedämmt werden können. Allerdings wurde im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchung kein Befall der Kulturen mit solchen Organismen festgestellt. Ein weiterer möglicher Grund für die Wachstumssteigerung kann eine durch die Anwesenheit von NP verursachte Ausscheidung von EPS sein, die zu einer besseren Nährstoffversorgung der Algen führen kann (XIAO & ZHENG, 2016).

Da durch manche NP das Wachstum der Algen gefördert wird, müssen auch dahingehend Effekte auf das Ökosystem in Betracht gezogen werden. So könnte Nanoplastik in Gewässern möglicherweise Algenblüten fördern und somit ggf. zu einer Beeinträchtigung anderer Arten führen. In zwei Fällen konnten EC₅₀-Werte für die Wachstumsförderung durch PS-n und PS-NH₂ bei *C. meneghiniana* berechnet werden. Diese betragen 39,3 und 8,87 µg PS/mL und sind somit noch immer um einen Faktor von mindestens 8 870 höher als die in Kapitel 9.4.2 geschätzte PEC von 1 ng/mL. Die niedrigste Konzentration, bei der geringe stimulierende Effekte nachgewiesen wurden, beträgt 1 µg PS/mL, wobei immer noch ein Faktor von 1000 zur PEC besteht. Auf Grundlage dieser Werte ist keine stimulierende Wirkung auf Algen in der Umwelt zu erwarten. Es muss zudem mit einbezogen werden, dass sich nicht nur wachstumsfördernde Nanomaterialien in Oberflächengewässern befinden, sondern zudem toxische Substanzen, sodass die Effekte nicht mit jenen im Laborversuch vergleichbar sind.

Sensitivität der Endpunkte

Obwohl hinsichtlich toxischer Effekte eine höhere Sensitivität des Endpunkts Chlorophyllgehalt festgestellt wurde, zeigt sich im Zusammenhang mit den positiven Effekten auf Algen, dass hierbei

die Zellzahländerung sensitiver ist. Während die Zellzahl das Wachstum der Algen bzw. ihre Teilungsrate abbildet, wird der Chlorophyllgehalt durch die Menge der vorhandenen Zellen sowie den Chlorophyllgehalt der einzelnen Zelle bestimmt. Da über die Zellzahl bereits eine Wachstumsstimulation nachgewiesen wurde, diese sich jedoch erst bei höheren Konzentrationen oder gar nicht im Chlorophyllgehalt widerspiegelt, kann vermutet werden, dass die Chlorophyllproduktion der Einzelzelle nicht maßgeblich durch die Nanomaterialien erhöht wird und positive Effekte erst bei höheren Konzentrationen sichtbar werden, da hier eine deutlichere Wachstumsstimulation und damit insgesamt mehr Chlorophyll vorhanden ist. Um positive Effekte auf Algen abzubilden, ist die Bestimmung der Zellzahl zumindest in Bezug auf die verwendeten Testorganismen und Nanomaterialien der Messung des Chlorophyllgehalts vorzuziehen.

Einfluss der Partikelmodifikation

Die EC₅₀-Werte zeigen, dass bei den aminierten PS-NP eine deutlichere Stimulation vorliegt als bei den PS-n. Da der Unterschied nur anhand von einem Datenpaar festgestellt wurde und die Werte zudem mit 8,9 und 39,3 µg PS/mL in einem ähnlichen Bereich liegen, können aus dem Ergebnis keine allgemeingültigen Aussagen abgeleitet werden.

Hinsichtlich der LOEC-Werte fällt auf, dass sie für die PS-n häufig niedriger ausfallen als für die PS-COOH und PS-NH₂. Die unmodifizierten NP führen somit häufig bei geringeren Konzentrationen zu einer Wachstumsstimulation als die modifizierten. Dies könnte daran liegen, dass die Toxizität von PS-NP vermutlich weitgehend durch funktionelle Gruppen an ihrer Oberfläche bedingt ist (FRÖHLICH, 2012). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde zwar keine Toxizität der PS-NP nachgewiesen, eine geringere Stimulation durch die modifizierten Partikel im Vergleich zu den unmodifizierten, könnte jedoch ein erster Hinweis auf eine beginnende Toxizität sein. Die negativen Wirkungen würden in diesem Fall aufgrund zu geringer untersuchter Konzentrationen noch nicht als Effekt erkennbar sein, sondern nur in Form einer verringerten Stimulation bzw. dem Ausbleiben eines positiven Effekts in Erscheinung treten.

Eignung der Testorganismen

C. meneghiniana zeigt sich insgesamt etwas sensitiver gegenüber der Stimulation durch PS-NP als die beiden Grünalgen. Eventuell ist die Affinität zur Bildung von Zellaggregaten bei dieser Art größer als bei den Grünalgen oder der Hormesis-Effekt setzt früher ein, wodurch ggf. das Wachstum verstärkt wird (vgl. Kapitel 9.4.5).

9.5 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnten verschiedene Schlussfolgerungen für die untersuchten Nanomaterialien, Testorganismen und Methoden gezogen werden. Durch die Vielzahl der Versuche wird die Wahrscheinlichkeit für die Entdeckung von übergeordneten Mustern erhöht und die Gefahr, falsche Rückschlüsse anhand von zufällig auftretenden Ergebnissen zu ziehen, wird reduziert. Durch die vielen zu vergleichenden Nanomaterialien, Testsubstanzen und –organismen sowie Endpunkte können direkte Vergleiche gezogen werden, da keine Unterschiede im Versuchsdesign berücksichtigt werden müssen, wie es beim Vergleich mit anderen Studien der Fall ist. Folgende Aussagen können auf Grundlage der durchgeführten Untersuchungen getroffen werden:

1. Die Trübung des Mediums, welche durch den Einsatz hoher NP-Konzentrationen entstehen kann, hat keinen messbaren Einfluss auf das Wachstum der Algenzellen. Es existieren jedoch Hinweise auf mögliche Beschattungseffekte durch Interaktionen zwischen agglomerierenden NP und Algenzellen.
2. NP können in Abhängigkeit ihres Materials sowie ihrer Oberflächenmodifikation und Konzentration durch Streuungseffekte die Ergebnisse von Absorptionsmessungen beeinflussen. Zusätzliche Einflussfaktoren sind das umgebende Medium und die Anwesenheit von Algenzellen.
3. Die Messung des Chl a-Gehalts ist eine sehr sensitive Methode, um Beeinträchtigungen von Mikroalgen durch Nanomaterialien nachzuweisen. Die Messung konnte für alle Algenarten und Testsubstanzen ohne erkennbare Beeinflussung durch die Nanomaterialien durchgeführt werden und weist somit das größte Potenzial als Untersuchungsmethode für NP-Toxizität auf. Die Messung der Absorption zur Bestimmung der Zellzahl ist eine ressourcenschonende und ebenfalls recht sensitive Methode, welche jedoch durch die Anwesenheit von Nanomaterialien beeinflusst werden kann. Die Messung der In-vivo-Chlorophyllfluoreszenz wird höchstwahrscheinlich erheblich durch die Anwesenheit von Nanomaterialien und weitere externe Faktoren (z. B. Vorbereitungszeit) beeinflusst, wodurch eine Ermittlung aussagekräftiger Ergebnisse nicht ohne Weiteres möglich ist. Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von Algenzellen ist eine aufwändige und vergleichsweise wenig sensitive Methode, kann jedoch ergänzend zu anderen Toxizitätsnachweisen Informationen über die Wirkung der Nanomaterialien auf den Testorganismus zeigen.
4. Der Vergleich der untersuchten Materialien zeigt, dass Ag-NP auf Algen deutlich toxischer wirken, als die übrigen untersuchten Nanomaterialien. Auch TiO₂-NP zeigt schädigende

Effekte, während für PS-NP im untersuchten Konzentrationsbereich keine toxische Wirkung, jedoch mitunter eine Stimulation des Wachstums nachgewiesen werden konnte.

5. Die Toxizität von Ag-Nanomaterialien kann durch die Abgabe von Silberionen und deren toxische Wirkung erklärt werden. In Bezug auf TiO₂ können sowohl eine Toxizität des Materials als auch eine physikalische Isolierung der Algen, durch die Bildung einer Partikelhülle um die Zellen, Gründe für die negativen Effekte sein. PS-NP führen zu einem verstärkten Wachstum der Algenkulturen, wobei mögliche Gründe hierfür gefördertes adhäsives Wachstum und der Hormesis-Effekt sein können.
6. Die Oberflächenmodifikation kann einen Einfluss auf die Toxizität von Nanomaterialien haben, dieser ist jedoch anderen Einflussfaktoren wie dem verwendeten Medium bzw. dem Testorganismus untergeordnet.
7. Die Grünalge *R. subcapitata* reagiert empfindlicher auf Nanomaterialien als *C. reinhardtii*. Die Empfindlichkeitsunterschiede zwischen Diatomeen und Grünalgen werden mitunter stark durch das verwendete Medium und das Material des NP beeinflusst.

Aus diesen Erkenntnissen wird deutlich, dass die Wirkung von Nanomaterialien sehr individuell ist und die entsprechende Toxizität von verschiedenen Faktoren abhängt, weshalb allgemeine Aussagen zur NP-Toxizität fragwürdig sind und sich nicht ohne Weiteres auf andere Partikel-Arten bzw. Materialien oder Organismen übertragen lassen. Das sehr breite Spektrum an unterschiedlichen Formen, Materialien und Größen erfordert somit eine differenzierte Beurteilung des möglichen Risikos.

10 Zusammenfassung

Aufgrund des großen Potenzials der Nanotechnologie ist in Zukunft eine Zunahme der Produktion und Verwendung von Nanomaterialien zu erwarten, wodurch mit einer steigenden Freisetzung in der Umwelt und einer Exposition von Organismen zu rechnen ist. In der vorliegenden Dissertation werden daher Methoden zur Untersuchung von Nanomaterialien betrachtet und Effekte von NP auf Algen untersucht. Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile, wobei in Teil I die Transmissionselektronenmikroskopie als Methode zur Charakterisierung und zum Nachweis von verschiedenen Nanomaterialien beurteilt wird. Teil II umfasst die Untersuchung der Toxizität verschiedener Nanopartikel für drei Mikroalgenarten.

In Teil I wurden Silber-, Titandioxid- und Polystyrol-Nanopartikel sowie Kohlenstoffnanoröhrchen untersucht. Von jedem Nanomaterial standen eine unmodifizierte Form sowie zwei modifizierte Partikeltypen mit Carboxyl- bzw. Aminogruppen an der Partikeloberfläche und zusätzlich Polystyrol-Mikropartikel zur Verfügung. Zunächst erfolgte eine Charakterisierung der Materialien mittels Transmissionselektronenmikroskopie, wobei die Größe der einzelnen Objekte gemessen und das Verhalten beschrieben wurde. Zudem wurde im Fall der Polystyrol-Nanopartikel der Einfluss verschiedenen Chemikalien getestet, welche im Zusammenhang mit der Probenvorbereitung für das Elektronenmikroskop zum Einsatz kamen. In einem nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung von Nanomaterialien in umweltrelevanten Matrices. Hierbei wurden Boden- und Wasserproben sowie humane Körperflüssigkeiten und Fischgewebe elektronenmikroskopisch auf die Anwesenheit von synthetischen Nanomaterialien untersucht und zum Teil Proben mit Nanomaterialien versetzte, um die Nachweisbarkeit mit dem Elektronenmikroskop bewerten zu können. Zusätzlich wurden verschiedene Zellkulturen und Gewebe auf morphologische Auffälligkeiten im Zusammenhang mit einer Exposition gegenüber Nanomaterialien sowie die Aufnahme von Nanopartikeln untersucht.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die Transmissionselektronenmikroskopie für viele jedoch nicht für alle Nanomaterialien ein sinnvolles Charakterisierungswerkzeug darstellt. Die Darstellung und Vermessung besonders kleiner Partikel mit einem Durchmesser im einstelligen Nanobereich gestaltet sich jedoch schwierig bis unmöglich. Für den Nachweis von Nanomaterialien in Umweltmatrices und Zellen ist die Methode nur bedingt geeignet, wobei insbesondere niedrige Partikelkonzentrationen und kleine Nanoobjekte problematisch sind. Die Methode ist somit lediglich als Ergänzung zu anderen Nachweismethoden zu betrachten, kann jedoch hilfreiche Informationen zur Lokalisation von Nanoobjekten in Zellen und zu ihrem Verhalten in Umweltproben liefern.

In Teil II wurden die beiden Grünalgen *Raphidocelis subcapitata* und *Chlamydomonas reinhardtii* sowie die Diatomee *Cyclotella meneghiniana* gegenüber unterschiedlich modifizierten Silber-, Titandioxid- und Polystyrol-Nanopartikeln exponiert. Die Beurteilung der Toxizität wurde anhand der über die Absorption gemessenen Zellzahl, des Chlorophyll a-Gehalts, der über die Chlorophyllfluoreszenz gemessenen Parameter F_v/F_m und NPQ sowie der transmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchung der Algenzellen vorgenommen. Zudem wurde der Einfluss der Beschattung von Algenzellen durch die Nanopartikel experimentell untersucht.

Die Untersuchungen zeigen, dass Nanomaterialien bei Absorptionsmessungen in Abhängigkeit von ihrem Grundmaterial, ihrer Oberflächenmodifikation und dem umgebenden Medium ein mehr oder weniger starkes Streuverhalten zeigen. Auch die Anwesenheit von Algen kann einen deutlichen Einfluss haben. Trotz der Beeinflussung der Lichtstreuung hat die Beschattung von Algen durch die Trübung des Mediums durch Nanomaterialien keinen Einfluss auf das Wachstum der Testorganismen. Die direkte Exposition der Algen gegenüber den Nanomaterialien zeigt, dass Silber-Nanopartikel die toxischste Wirkung haben. Die Abgabe von Silberionen durch die Partikel kann hierbei die auftretenden Effekte erklären. Auch Titandioxid-Nanopartikel führen zu negativen Effekten, wobei mögliche Gründe die Toxizität des Materials und die physikalische Isolierung der Zellen sind. Die Polystyrol-Nanopartikel haben eine stimulierende Wirkung auf die Algenzellen, welche auf einer Präferenz von adhäsivem Wachsen und dem Hormesis-Effekt beruhen kann. Die Oberflächenmodifikation der Nanomaterialien hat zwar einen Effekt auf die Toxizität, ihr Einfluss wird jedoch durch andere Faktoren wie das Grundmaterial der Partikel oder das verwendete Medium überlagert. In Bezug auf die unterschiedlichen Methoden zum Nachweis der Toxizität, ist die Bestimmung des Chlorophyll a-Gehalts als besonders sensitiv zu bewerten und kann zudem auf alle Partikel angewandt werden. Hinsichtlich der Absorptionsmessung besteht teilweise ein deutlicher Einfluss durch die Nanopartikelstreuung. Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz scheint einer starken Beeinflussung durch externe Faktoren und ggf. die Nanomaterialien selbst zu unterliegen. Die elektronenmikroskopische Untersuchung ist vergleichsweise wenig sensitiv, kann jedoch ergänzende Informationen bezüglich der Wirkweise von Nanomaterialien liefern. Der Vergleich der drei Testorganismen zeigt, dass *Raphidocelis subcapitata* insgesamt empfindlicher reagiert als *Chlamydomonas reinhardtii*. Eine allgemeingültige Sensitivitätsabstufung zwischen den Grünalgen und der Diatomee ist nicht möglich, da die Reaktionen in Abhängigkeit von Medium bzw. Partikelgrundmaterial unterschiedlich ausfallen.

11 Literaturverzeichnis

- AbfKlärV (Klärschlammverordnung) (2017): Verordnung über die Verwertung von Klärschlamm, Klärschlammgemisch und Klärschlammkompost; Klärschlammverordnung vom 27. September 2017 (BGBl. I S. 3465). Zuletzt geändert durch Artikel 6 der Verordnung vom 27. September 2017 (BGBl. I S. 3465).
- AENGENHEISTER, L.; KEEVEND, K.; MUOTH, C.; SCHÖNENBERGER, R.; DIENER, L.; WICK, P.; BUERKI-THURNHERR, T. (2018): An advanced human in vitro co-culture model for translocation studies across the placental barrier. In: *Scientific Reports*, 8 (1), S. 5388.
- ALBANESE, A.; TANG, P.S.; CHAN, W.C.W. (2012): The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. In: *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14, S. 1.
- ALONSO, D.L.; BELARBI, E.H.; FERNANDEZ-SEVILLA, J.M.; RODRIGUEZ-RUIZ, J.; GRIMA, E.M. (2000): Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochem*, 54, S. 461.
- ANGEL, B.M.; BATLEY, G.E.; JAROLIMEK, C.V.; ROGERS, N.J. (2013): The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. In: *Chemosphere*, 93 (2), S. 359.
- APHA (American Public Health Association) & AWWA (American Water Works Association) (1989). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association.
- ARO, E.M.; VIRGIN, I.; ANDERSSON, B. (1993): Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. In: *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1143 (2), S. 113.
- ARUOJA, V.; DUBOURGUIER, H.-C.; KASEMETS, K.; KAHRU, A. (2009): Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. In: *The Science of the Total Environment*, 407 (4), S. 1461.
- BABELE, P.K.; THAKRE, P.K.; KUMAWAT, R.; TOMAR, R.S. (2018): Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Chemosphere*, 213, S. 65.
- BACHLER, G.; LOSERT, S.; UMEHARA, Y.; VON GOETZ, N.; RODRIGUEZ-LORENZO, L.; PETRI-FINK, A.; ROTHEN-RUTISHAUSEN, B.; HUNGERBUEHLER, K. (2015): Translocation of gold nanoparticles across the lung epithelial tissue barrier: Combining in vitro and in silico methods to substitute in vivo experiments. In: *Particle and Fibre Toxicology*, 12 (1), S. 18.
- BAHADAR, H.; MAQBOOL, F.; NIAZ, K.; ABDOLLAHI, M. (2016): Toxicity of nanoparticles and an overview of our current experimental models. In: *Iranian Biomedical Journal*, 20 (1), S. 1.
- BARILLET, S.; SIMON-DECKERS, A.; HERLIN-BOIME, N.; MAYNE-L'HERMITE, M.; REYNAUD, C.; CASSIO, D.; GOUGET, B.; CARRIÈRE, M. (2010): Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study. In: *Journal of Nanoparticle Research*, 12 (1), S. 61.
- BARINOVA, S.; BOBOEV, M.; HISORIEV, H. (2015): Freshwater algal diversity of the South-Tajik Depression in a high-mountainous extreme environment, Tajikistan. In: *Turkish Journal of Botany*, 39, S. 535.

- BARTON, L.E.; AUFFAN, M.; OLIVI, L.; BOTTERO, J.-Y.; WIESNER, M.R. (2015): Heteroaggregation, transformation and fate of CeO₂ nanoparticles in wastewater treatment. In: *Environmental Pollution*, 203, S. 122.
- BARWAL, I.; RANJAN, P.; KATERIYA, S.; YADAV, S.C. (2011): Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles. In: *Journal of Nanobiotechnology*, 9, S. 56.
- BECKER, H.; DUBBERT, W.; SCHWIRN, K.; VÖLKER, D. (2009): Nanotechnik für Mensch und Umwelt Chancen fördern und Risiken minimieren. Umweltbundesamt [Hrsg.].
- BEDDOES, C.M.; CASE, C.P.; BRISCOE, W.H. (2015): Understanding nanoparticle cellular entry: a physicochemical perspective. In: *Advances in Colloid and Interface Science*, 218, S. 48.
- BENN, T.M. & WESTERHOFF, P. (2008): Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. In: *Environmental Science & Technology*, 42 (11), S. 4133.
- BERGAMI, E.; PUGNALINI, S.; VANNUCCINI, M.L.; MANFRA, L.; FALERI, C.; SAVORELLI, F.; DAWSON, K.A.; CORSI, I. (2017): Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*. In: *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 189, S. 159.
- BESSELING, E.; WANG, B.; LÜRLING, M.; KOELMANS, A.A. (2014): Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. In: *Environmental Science & Technology*, 48 (20), S. 12336.
- BHATTACHARYA, K.; DAVOREN, M.; BOERTZ, J.; SCHINS, R.P. F.; HOFFMANN, E.; DOPP, E. (2009): Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. In: *Particle and Fibre Toxicology*, 6 (1), S. 17.
- BHATTACHARYA, P.; LIN, S.; TURNER, J.P.; KE, P.C. (2010): Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. In: *The Journal of Physical Chemistry C*, 114 (39), S. 16556.
- BLASER, S.A.; SCHERINGER, M.; MACLEOD, M.; HUNGERBÜHLER, K. (2008): Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. In: *The Science of the total Environment*, 390 (2-3), S. 396.
- BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) (2014): nano.DE-Report 2013 – Status quo der Nanotechnologie in Deutschland.
- BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) (2016): Aktionsplan Nanotechnologie 2020; Eine ressortübergreifende Strategie der Bundesregierung.
- BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) (2019): Nanokarte: Forschung und Innovation (nano-map). Online verfügbar unter: <https://www.werkstofftechnologien.de/service/nano-map>; zuletzt geprüft am 11.08.2019.
- BOLD, H.C. (1949): The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, sp. nov. In: *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76 (2), S. 101.
- BOVERHOF, D.R.; BRAMANTE, C.M.; BUTALA, J.H.; CLANCY, S.F.; LAFRANCONI, M.; WEST, J.; GORDON, S.C. (2015): Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. In: *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73 (1), S. 137.

- BOXALL, A.B.A.; CHAUDHRY, Q.; SINCLAIR, C.; JONES, A.; AITKEN, R.; JEFFERSON, B.; WATTS, C. (2007): Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Central Science Laboratory, Department of the Environment and Rural Affairs, London, UK 89.
- BRAAKHUIS, H.M.; KLOET, S.K.; KEZIC, S.; KUPER, F.; PARK, M.V.D.Z.; BELLMANN, S.; VAN DER ZANDE, M.; LE GAC, S.; KRYSSTEK, P.; PETERS, R.J.B.; RIETJENS, I.M.C.M.; BOUWMEESTER, H. (2015): Progress and future of in vitro models to study translocation of nanoparticles. In: *Archives of toxicology*, 89 (9), S. 1469.
- BROADY, P.A.; FLINT, E.A.; NELSON, W.A.; CASSIE COOPE, V.; DE WINTON, M.D.; NOVIS, P.M. (2012): Phylum Chlorophyta and Charophyta. Green algae. In: *New Zealand inventory of biodiversity*, 3, S. 347.
- BRUN, J. (1880): Diatomées des Alpes et du Jura. Et de la région suisse et française des environs de Genève: H. Georg, Genève.
- BURCHARDT, A.D.; CARVALHO, R.N.; VALENTE, A.; NATIVO, P.; GILLILAND, D.; GARCIA, C.P.; CESAR P.; PASSARELLA, R.; PEDRONI, V.; ROSSI, F.; LETTIERI, T.I. (2012): Effects of silver nanoparticles in diatom *Thalassiosira pseudonana* and cyanobacterium *Synechococcus* sp. In: *Environmental Science & Technology*, 46 (20), S. 11336.
- BURNS, E.E. & BOXALL, A.B.A. (2018): Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37 (11), S. 2776.
- CALABRESE, E.J. (2004): Hormesis: from marginalization to mainstream: a case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. In: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197 (2), S. 125.
- CAO, G. (2004): Nanostructures & nanomaterials: Synthesis, properties & applications. Imperial College Press, London.
- CASADO, M.P.; MACKEN, A.; BYRNE, H.J. (2013): Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery. In: *Environment International*, 51, S. 97.
- CASEY, A.; HERZOG, E.; LYNG, F.M.; BYRNE, H.J.; CHAMBERS, G.; DAVOREN, M. (2008): Single walled carbon nanotubes induce indirect cytotoxicity by medium depletion in A549 lung cells. In: *Toxicology Letters*, 179 (2), S. 78.
- CEDERVALL, T.; HANSSON, L.-A.; LARD, M.; FROHM, B.; LINSE, S. (2012): Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. In: *PLOS ONE*, 7 (2), S. 32254.
- CHITHRANI, B.D.; GHAZANI, A.A.; CHAN, W.C.W. (2006): Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. In: *Nano Letters*, 6 (4), S. 662.
- CLEMENS, S. (2006): Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. In: *Biochimie*, 88 (11), S. 1707.
- DALAI, S.; PAKRASHI, S.; JOYCE NIRMALA, M.; CHAUDHRI, A.; CHANDRASEKARAN, N.; MANDAL, A.B.; MUKHERJEE, A. (2013): Cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles and their detoxification in a freshwater system. In: *Aquatic Toxicology*, 138-139, S. 110.

- DaNa 2.0 (Daten und Wissen zu Nanomaterialien) (2018a): NanoUmwelt; Informationen zu Nanomaterialien und Nano-Sicherheitsforschung. Online verfügbar unter <https://nanopartikel.info/projekte/laufende-projekte/nanoumwelt>; zuletzt geprüft am 23.04.2018.
- DaNa 2.0 (Daten und Wissen zu Nanomaterialien) (2018b): Silber; Materialinfo; Informationen zu Nanomaterialien und Nano-Sicherheitsforschung. Online verfügbar unter <https://nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/silber/materialinfo-silber>; zuletzt geprüft am 22.04.2018.
- DaNa 2.0 (Daten und Wissen zu Nanomaterialien) (2018c): Titandioxid; Materialinfo. Informationen zu Nanomaterialien und Nano-Sicherheitsforschung. Online verfügbar unter <https://nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/titandioxid/materialinfo-titandioxid>; zuletzt geprüft am 23.04.2018.
- DaNa 2.0 (Daten und Wissen zu Nanomaterialien) (2018d): Kohlenstoff-Nanoröhrchen; Materialinfo; Informationen zu Nanomaterialien und Nano-Sicherheitsforschung. Online verfügbar unter <https://nanopartikel.info/nanoinfo/materialien/kohlenstoff-nanoroehrchen/materialinfo-kohlenstoff-nano>; zuletzt geprüft am 23.04.2018.
- DANGEARD, P.-A. (1888): Recherches sur les algues inférieures. In: *Annales des Sciences Naturelles; Botanique*, 7, S. 105.
- DASH, A.; SINGH, A.P.; CHAUDHARY, B.R.; SINGH, S.K.; DASH, D. (2012): Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae. In: *Nano-Micro Letters*, 4 (3), S. 158.
- DE JONG, W.H.; HAGENS, W.I.; KRYSZEK, P.; BURGER, M.C.; SIPS, A.J.A.M.; GEERTSMA, R.E. (2008): Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. In: *Biomaterials*, 29 (12), S. 1912.
- DE KLEIN, J.J.M.; QUIK, J.T.K.; BÄUERLEIN, P.S.; KOELMANS, A.A. (2016): Towards validation of the NanoDUFLOW nanoparticle fate model for the river Dommel, The Netherlands. In: *Environmental Science: Nano*, 3 (2), S. 434.
- DOMERCQ, P.; PRAETORIUS, A.; BOXALL, A.B.A. (2018): Emission and fate modelling framework for engineered nanoparticles in urban aquatic systems at high spatial and temporal resolution. In: *Environmental Science: Nano*, 5 (2), S. 533.
- DONALDSON, K.; POLAND, C.A.; MURPHY, F.A.; MACFARLANE, M.; CHERNOVA, T.; SCHINWALD, A. (2013): Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - similarities and differences. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (15), S. 2078.
- DONG, S.; QU, M.; RUI, Q.; WANG, D. (2018): Combinational effect of titanium dioxide nanoparticles and nanopolystyrene particles at environmentally relevant concentrations on nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, S. 444.
- DOROBANTU, L.S.; FALLONE, C.; NOBLE, A.J.; VEINOT, J.; MA, G.; GOSS, G.G.; BURRELL, R.E. (2015): Toxicity of silver nanoparticles against bacteria, yeast, and algae. In: *Journal of Nanoparticle Research*, 17 (4), S. 255102.
- DüMV (Düngemittelverordnung) (2019): Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln vom 5. Dezember 2012 (BGBl. I S. 2482). Zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 2. Oktober 2019 (BGBl. I S. 1414).

- ECHA (European Chemicals Agency) (2018): Informationen über Chemikalien; Registrierte Stoffe. Online verfügbar unter <https://echa.europa.eu/de/information-on-chemicals/registered-substances>; zuletzt geprüft am 27.10.2018.
- EFIMOVA, I.; BAGAEVA, M.; BAGAEV, A.; KILESO, A.; CHUBARENKO, I.P. (2018): Secondary microplastics generation in the sea swash zone with coarse bottom sediments: Laboratory experiments. In: *Frontiers in Marine Science*, 5, S. 208.
- EK (Europäische Kommission) (2011): Empfehlung der Kommission vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien. In: *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 275, S. 38.
- EK (Europäische Kommission) (2018): Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). Online verfügbar unter: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging_de; zuletzt geprüft am 27.10.2018.
- EKVALL, M.T.; LUNDQVIST, M.; KELPSIENE, E.; ŠILEIKIS, E.; GUNNARSSON, S.B.; CEDERVALL, T. (2019): Nanoplastics formed during the mechanical breakdown of daily-use polystyrene products. In: *Nanoscale Advances*, 1 (3), S. 1055.
- ETHERIDGE, M.L.; CAMPBELL, S.A.; ERDMAN, A.G.; HAYNES, C.L.; WOLF, S.M.; MCCULLOUGH, J. (2013): The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. In: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9 (1), S. 1.
- EU (Europäische Union) (2006): Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. In: *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 396, S. 1.
- EU (Europäische Union) (2009): Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel. In: *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 342, S. 59.
- EU (Europäische Union) (2011): Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission. In: *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 304, S. 18.
- EU (Europäische Union) (2012): Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten. In: *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 167, S. 1.
- FANÉS TREVIÑO, I.; COMAS GONZÁLEZ, A.; SÁNCHEZ CASTILLO, P.M. (2009): Catálogo de las algas verdes cocales de las aguas continentales de Andalucía. In: *Acta botánica malacitana*, 34, S 11-32.

- FAWLEY, M.W.; DEAN, M.L.; DIMMER, S.K.; FAWLEY, K.P. (2006): Evaluating the morphospecies concept in the *selenastraceae* (*chlorophyceae*, *chlorophyta*) In: *Journal of Phycology*, 42 (1), S. 142.
- FERREIRA, M.P.A.; TALMAN, V.; TORRIERI, G.; LIU, D.; MARQUES, G.; MOSLOVA, K.; LIU, Z.; PINTO, J.F.; HIRVONEN, J.; RUSKOAHO, H.; SANTOS, H.A. (2018): Dual-drug delivery using dextran-functionalized nanoparticles targeting cardiac fibroblasts for cellular reprogramming. In: *Advanced Functional Materials*, 28 (15), S. 1705134.
- FOLDBJERG, R.; DANG, D.A.; AUTRUP, H. (2011): Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. In: *Archives of Toxicology*, 85 (7), S. 743.
- FOTT, B. (1971): Algenkunde. 2. Aufl. Stuttgart: Fischer.
- FRÖHLICH, E. (2012): The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. In: *International Journal of Nanomedicine*, 7, S. 5577.
- FRÖHLICH, E.; ROBLEGG, E. (2016): Oral uptake of nanoparticles: Human relevance and the role of in vitro systems. In: *Archives of Toxicology*, 90 (10), S. 2297.
- GARCÍA, C.P.; BURCHARDT, A.D.; CARVALHO, R.N.; GILLILAND, D.; ANTÓNIO, D.C.; ROSSI, F.; LETTIERI, T. (2014): Detection of silver nanoparticles inside marine diatom *Thalassiosira pseudonana* by electron microscopy and focused ion beam. In: *PLOS ONE*, 9 (5), S. 96078.
- GARNER, K.L.; SUH, S.; KELLER, A.A. (2017): Assessing the risk of engineered nanomaterials in the environment: Development and application of the nanoFate Model. In: *Environmental Science & Technology*, 51 (10), S. 5541.
- GAZSÓ, A., GREBLER, S., SCHIEMER, F. (Hrsg.) (2007): Nano. Chancen und Risiken aktueller Technologien. Springer-Verlag, Wien.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N.R. (1989): The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. In: *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 990 (1), S. 87.
- GERANIO, L.; HEUBERGER, M.; NOWACK, B. (2009): The behavior of silver nanotextiles during washing. In: *Environmental Science & Technology*, 43 (21), S. 8113.
- GESTIS (Gefahrenstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung) (2018): Stoffdatenbank. Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung [Hrsg.]. Online verfügbar unter [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$vid=gestisdeu:sdbdeu\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates$fn=default.htm$vid=gestisdeu:sdbdeu$3.0); zuletzt geprüft am 24.04.2018.
- GOMAA, E.Z. (2017): Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as models for gram-positive and gram-negative bacteria. In: *The Journal of General and Applied Microbiology*, 63 (1), S. 36.
- GOODENOUGH, U.; LIN, H.; LEE, J.-H. (2007): Sex determination in *Chlamydomonas*. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18 (3), S. 350.
- GOTTSCHALK, F.; SONDERER, T.; SCHOLZ, R.W.; NOWACK, B. (2009): Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. In: *Environmental Science & Technology*, 43 (24), S. 9216.

- GREßLER, S. & NENTWICH, M. (2011): Nano und Umwelt – Teil I: Entlastungspotenziale und Nachhaltigkeitseffekte. In: *Nano Trust Dossier*, (26), S. 1.
- GREULICH, C.; DIENDORF, J.; SIMON, T.; EGgeler, G.; EPPLE, M.; KÖLLER, M. (2011): Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. In: *Acta Biomaterialia*, 7 (1), S. 347.
- GRIFFITT, R.J.; LUO, J.; GAO, J.; BONZONGO, J.-C.; BARBER, D.S. (2008): Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9), S. 1972.
- GRÜN, A.-L.; STRASKRABA, S.; SCHULZ, S.; SCHLOTER, M.; EMMERLING, C. (2018): Long-term effects of environmentally relevant concentrations of silver nanoparticles on microbial biomass, enzyme activity, and functional genes involved in the nitrogen cycle of loamy soil. In: *Journal of Environmental Sciences*, 69, S. 12.
- GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. (2018): *Cyclotella meneghiniana*, Kützing. AlgaeBase World-wide electronic publication, National University of Ireland. Online verfügbar unter: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=32146&sk=0&from=results; zuletzt aktualisiert am 25.11.2018.
- HANDY, R.D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. (2008): The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. In: *Ecotoxicology*, 17 (5), S. 315.
- HARTMANN, N.B.; ENGELBREKT, C.; ZHANG, J.; ULSTRUP, J.; KUSK, K.O.; BAUN, A. (2013): The challenges of testing metal and metal oxide nanoparticles in algal bioassays: titanium dioxide and gold nanoparticles as case studies. In: *Nanotoxicology*, 7 (6), S. 1082.
- HARTMANN, N.B.; VON DER KAMMER, F.; HOFMANN, T.; BAALOUSHA, M.; OTTOFUELLING, S.; BAUN, A. (2010): Algal testing of titanium dioxide nanoparticles-testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. In: *Toxicology*, 269 (2-3), S. 190.
- HE, G. & PAN, Q. (2004): Synthesis of polystyrene and polystyrene/poly(methyl methacrylate) nanoparticles. In: *Macromolecular rapid Communications*, 25 (17), S. 1545.
- HESLER, M. (2017): Untersuchung des Transports von Nanomaterialien über die Darmbarriere in vitro und ex vivo. Masterarbeit. Hochschule Kaiserslautern.
- HIRIART-BAER, V.P.; FORTIN, C.; LEE, D.-Y.; CAMPBELL, P.G.C. (2006): Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: influence of thiosulphate. In: *Aquatic Toxicology*, 78 (2), S. 136.
- HMWVL (Hessisches Ministerium für Wirtschaft, Verkehr und Landesentwicklung) (2009): Nanotechnologie in Kunststoff; Innovationsmotor für Kunststoffe, ihre Verarbeitung und Anwendung.
- HOOPS, H.J. & FLOYD, G.L. (1979): Ultrastructure of the centric diatom, *Cyclotella meneghiniana*: vegetative cell and auxospore development. In: *Phycologia*, 18 (4), S. 424.
- HOSOKAWA, M.; NOGI, K.; NAITO, M.; YOKOYAMA, T. (2012): Nanoparticle Technology Handbook. Elsevier Science, Burlington, 2. Edition.

- HUANG, J.; CHENG, J.; YI, J. (2016): Impact of silver nanoparticles on marine diatom *Skeletonema costatum*. In: *Journal of Applied Toxicology*, 36 (10), S. 1343.
- HUND-RINKE, K. & SIMON, M. (2006): Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids (8 pp). In: *Environmental Science and Pollution Research*, 13 (4), S. 225.
- HUND-RINKE, K.; BAUN, A.; CUPI, D.; FERNANDES, T. F.; HANDY, R.; KINROSS, J.H. NAVAS, J.M.; PEIJNENBURG, W.; SCHLICH, K.; SHAW, B.J.; SCOTT-FORDSMAND, J.J. (2016): Regulatory ecotoxicity testing of nanomaterials - proposed modifications of OECD test guidelines based on laboratory experience with silver and titanium dioxide nanoparticles. In: *Nanotoxicology*, 10 (10), S. 1442.
- ISO (International Organization for Standardization) (2008): ISO/TS 27687: 2008. Nanotechnologies -- Terminology and Definitions for Nano-Objects -- Nanoparticle, Nanofibre and Nanoplate.
- ISO (International Organization for Standardization) (2015a): ISO/TS 80004-1: 2015. Nanotechnologies - Vocabulary - Part 1: Core Terms.
- ISO (International Organization for Standardization) (2015b): ISO/TS 80004-2: 2015. Nanotechnologies - Vocabulary - Part 2: Nano-Objects.
- JANI, P.; HALBERT, G.W.; LANGRIDGE, J.; FLORENCE, A.T. (1990): Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: Quantitation and particle size dependency. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42 (12), S. 821.
- JEFFREY, S.W. & HUMPHREY, G.F. (1975): New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. In: *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 167 (2), S. 191.
- JIANG, H.-S.; LI, M.; CHANG, F.-Y.; LI, W.; YIN, L.-Y. (2012): Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (8), S. 1880.
- JIANG, L.; GAO, L.; SUN, J. (2003): Production of aqueous colloidal dispersions of carbon nanotubes. In: *Journal of Colloid and Interface Science*, 260 (1), S. 89.
- JOHN, D.M.; WHITTON, B.A.; BROOK, A.J. (2002): The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae: Cambridge University Press, Cambridge.
- JOHNSTON, H.J.; SEMMLER-BEHNKE, M.; BROWN, D.M.; KREYLING, W.; TRAN, L.; STONE, V. (2010): Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro. In: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242 (1), S. 66.
- JONES, K.; MORTON, J.; SMITH, I.; JURKSCHAT, K.; HARDING, A.-H.; EVANS, G. (2015): Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. In: *Toxicology Letters*, 233 (2), S. 95.
- JORDAN, A.; MAIER-HAUFF, K.; WUST, P.; RAU, B.; JOHANNSEN, M. (2007): Thermo-therapie mit magnetischen Nanopartikeln. In: *Der Onkologe*, 13 (10), S. 894.
- JU-NAM, Y. & LEAD, J.R. (2008): Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. In: *The Science of the total Environment*, 400 (1-3), S. 396.

- KADAR, E.; ROOKS, P.; LAKEY, C.; WHITE, D.A. (2012): The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures. In: *Science of the Total Environment*, 439, S. 8.
- KAEGI, R.; ULRICH, A.; SINNET, B.; VONBANK, R.; WICHSER, A.; ZULEEG, S.; SIMMLER, H.; BRUNNER, S.; VONMONT, H.; BURKHARDT, M.; BOLLER, M. (2008): Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. In: *Environmental Pollution*, 156 (2), S. 233.
- KAHRU, A. & DUBOURGUIER, H.-C. (2010): From ecotoxicology to nanoecotoxicology. In: *Toxicology*, 269 (2-3), S. 105.
- KELLER, A.A.; MCFERRAN, S.; LAZAREVA, A.; SUH, S. (2013): Global life cycle releases of engineered nanomaterials. In: *Journal of Nanoparticle Research*, 15 (6), S. 230.
- KHODASHENAS, B. & GHORBANI, H.R. (2015): Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. In: *Arabian Journal of Chemistry*. Online verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214003645>; zuletzt geprüft am 30.12.2018.
- KIM, B.; PARK, C.-S.; MURAYAMA, M.; HOHELLA, M.F. (2010): Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products. In: *Environmental Science & Technology*, 44 (19), S. 7509.
- KLAINE, S.J.; ALVAREZ, P.J.J.; BATLEY, G.E.; FERNANDES, T.F.; HANDY, R.D.; LYON, D.Y.; MAHENDRA, J.; MCLAUGHLIN, M.J.; LEAD, J.R. (2008): Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability and effects. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9), S. 1825.
- KNOLL, M. & RUSKA, E. (1932): Das Elektronenmikroskop. In: *Zeitschrift für Physik*, 79 (9-10), S. 699.
- KOELMANS, A.A.; BESSELING, E.; SHIM, W.J. (2015): Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical review. (S. 325) In: Bergmann, M.; Gutow, L.; Klages, M. (Hrsg.): *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing, Cham.
- KOMO, P. (2017): Effekt von Nanopartikeln auf die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen im 2D und 3D In-vitro-Modell. Masterarbeit. Hochschule Kaiserslautern.
- KOUKAL, B.; ROSSÉ, P.; REINHARDT, A.; FERRARI, B.; WILKINSON, K.J.; LOIZEAU, J.-L.; DOMINIK, J. (2007): Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) exudates on metal toxicity and colloid aggregation. In: *Water Research*, 41 (1), S. 63.
- KRAUSE, B.; MENDE, M.; PÖTSCHKE, P.; PETZOLD, G. (2010): Dispersability and particle size distribution of CNTs in an aqueous surfactant dispersion as a function of ultrasonic treatment time. In: *Carbon*, 48 (10), S. 2746.
- KRITZBERG, E.S. & EKSTRÖM, S.M. (2012): Increasing iron concentrations in surface waters – a factor behind brownification? In: *Biogeosciences*, 9 (4), S. 1465.
- KROLL, A.; PILLUKAT, M.H.; HAHN, D.; SCHNEKENBURGER, J. (2009): Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72 (2), S. 370.
- KRUSKOPF, M. & FLYNN, K.J. (2006): Chlorophyll content and fluorescence responses cannot be used to gauge reliably phytoplankton biomass, nutrient status or growth rate. In: *The New Phytologist*, 169 (3), S. 525.

- KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B. (2007): Bacterial exopolysaccharides - a perception. In: *Journal of Basic Microbiology*, 47 (2), S. 103.
- LABORDA, F.; BOLEA, E.; CEPRIÁ, G.; GÓMEZ, M.T.; JIMÉNEZ, M.S.; PÉREZ-ARANTEGUI, J.; CASTILLO, J.R. (2016): Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. In: *Analytica Chimica Acta*, 904, S. 10.
- LAMBERT, S. & WAGNER, M. (2016): Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. In: *Chemosphere*, 145, S. 265.
- LAMBERT, S.; SINCLAIR, C.J.; BRADLEY, E.L.; BOXALL, A.B.A. (2013): Effects of environmental conditions on latex degradation in aquatic systems. In: *The Science of the total Environment*, 447, S. 225.
- LE OUAY, B. & STELLACCI, F. (2015): Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. In: *Nano Today* 10 (3), S. 339.
- LECLERC, S. & WILKINSON, K.J. (2014): Bioaccumulation of nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii*- Nanoparticle or the free ion? In: *Environmental Science & Technology*, 48 (1), S. 358.
- LEE, D.-Y.; FORTIN, C.; CAMPBELL, P.G.C. (2005): Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Aquatic Toxicology*, 75 (2), S. 127.
- LENZ, R.; ENDERS, K.; NIELSEN, T.G. (2016): Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (29), S. 4121.
- LEROUEIL, P.R.; BERRY, S.A.; DUTHIE, K.; HAN, G.; ROTELLO, V.M.; MCNERNY, D.Q.; BAKER, J.R.; ORR, B.G.; HOLL, M.M.B. (2008): Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. In: *Nano Letters*, 8 (2), S. 420.
- LEWIS, M.A. (1990): Chronic toxicities of surfactants and detergent builders to algae. A review and risk assessment. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20 (2), S. 123.
- LEWIS, P.A.; KLEMM, D.J.; LAZORCHAK, J.M.; NORBERG-KING, T.J.; PELTIER, W.H.; HEBER, M.A. (1994): Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms: US Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Systems Laboratory; Cincinnati.
- LI, W.; LIANG, C.; ZHOU, W.; QIU, J.; ZHOU, Z.; SUN, G.; XIN, Q. (2003): Preparation and characterization of multiwalled carbon nanotube - Supported platinum for cathode catalysts of direct methanol fuel cells. In: *Journal of Physical Chemistry*, B 107 (26), S. 6292.
- LI, Z.; HOU, B.; XU, Y.; WU, D.; SUN, Y. (2005): Hydrothermal synthesis, characterization, and photocatalytic performance of silica-modified titanium dioxide nanoparticles. In: *Journal of Colloid and Interface Science*; 288 (1), S. 149.
- LIBRALATO, G.; GALDIERO, E.; FALANGA, A.; CAROTENUTO, R.; DE ALTERIIS, E.; GUIDA, M. (2017): Toxicity effects of functionalized quantum dots, gold and polystyrene nanoparticles on target aquatic biological models: A Review. In: *Molecules*; 22 (9). S. 1439.
- LINNE VON BERG, K.-H. (2012): *Der Kosmos-Algenführer: Süßwasseralgen unter dem Mikroskop; ein Bestimmungsbuch* (2. Aufl.). Kosmos Verlag, Stuttgart.

- LOMBI, E.; DONNER, E.; TAVAKKOLI, E.; TURNEY, T.W.; NAIDU, R.; MILLER, B.W.; SCHECKEL, K.G. (2012): Fate of zinc oxide nanoparticles during anaerobic digestion of wastewater and post-treatment processing of sewage sludge. In: *Environmental Science & Technology*, 46 (16), S. 9089.
- LÖVESTAM, G.; RAUSCHER, H.; ROEBBEN, G.; KLÜTTGEN, B.S.; GIBSON, N.; PUTAUD, J.-P.; STAMM, H. (2010): Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. In: JRC Reference Reports, European Commission.
- LUBW (Landesanstalt für Umwelt, Messung und Naturschutz Baden-Württemberg) (2011): Nanomaterialien: Anwendungen im Umweltbereich. (Online-Publikation).
- LUTHER, W. (2007): Nanotechnologie als wirtschaftlicher Wachstumsmarkt (S. 39). In: Gázsó, A., Greßler, S., Schiemer, F. (Hrsg.) (2007): Nano. Chancen und Risiken aktueller Technologien. Springer-Verlag, Wien.
- MACKEVICA, A.; OLSSON, M.E.; HANSEN, S.F. (2016): Silver nanoparticle release from commercially available plastic food containers into food simulants. In: *Journal of Nanoparticle Research*, 18 (1), S. 5.
- MAHDI, K.N.M.; COMMELIN, M.; PETERS, R.J.B.; BAARTMAN, J.E.M.; RITSEMA, C.; GEISSEN, V. (2017): Transport of silver nanoparticles by runoff and erosion - a flume experiment. In: *Science of the Total Environment*, 601-602, S. 1418.
- MARAMBIO-JONES, C. & HOEK, E.M.V. (2010): A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. In: *Journal of Nanoparticle Research*, 12 (5), S. 1531.
- MAXWELL, K. & JOHNSON, G.N. (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide. In: *Journal of Experimental Botany*, 51 (345), S. 659.
- MAYHEW, T.M.; MÜHLFELD, C.; VANHECKE, D.; OCHS, M. (2009): A review of recent methods for efficiently quantifying immunogold and other nanoparticles using TEM sections through cells, tissues and organs. In: *Annals of Anatomy*, 191 (2), S. 153.
- MCGILLICUDDY, E.; MURRAY, I.; KAVANAGH, S.; MORRISON, L.; FOGARTY, A.; CORMICAN, M.; DOCKERY, P.; PRENDERGAST, M.; ROWAN, N.; MORRIS, D. (2017): Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. In: *The Science of the Total Environment*, 575, S. 231.
- MC SHAN, D.; RAY, P.C.; YU, H. (2014): Molecular toxicity mechanism of nanosilver. In: *Journal of Food and Drug Analysis*, 22 (1), S. 116.
- MENON, S.; RAJESHKUMAR, S.; KUMAR, S.V. (2017): A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. In: *Resource-Efficient Technologies*, 3 (4), S. 516.
- METZLER, D.M.; LI, M.; ERDEM, A.; HUANG, C.P. (2011): Responses of algae to photocatalytic nano-TiO₂ particles with an emphasis on the effect of particle size. In: *Chemical Engineering Journal*, 170 (2-3), S. 538.
- MIAO, A.-J.; LUO, Z.; CHEN, C.-S.; CHIN, W.-C.; SANTSCHI, P.H.; QUIGG, A. (2010): Intracellular uptake: A possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. In: *PLOS ONE*, 5 (12), S. 15196.

- MIAO, A.-J.; SCHWEHR, K.A.; XU, C.; ZHANG, S.-J.; LUO, Z.; QUIGG, A.; SANTSCHI, P.H. (2009): The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. In: *Environmental Pollution*, 157 (11), S. 3034.
- MISRA, S.K.; DYBOWSKA, A.; BERHANU, D.; LUOMA, S.N.; VALSAMI-JONES, E. (2012): The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. In: *The Science of the Total Environment*, 438, S. 225.
- MÖLLER, M.; DIESNER, M.-O.; MANHART, A.; KÜPPERS, P.; SPIETH-ACHTNICH, A.; PISTNER, C. (2014): Untersuchung der Auswirkungen nanotechnischer Produkte auf den Rohstoff- und Energiebedarf. In: Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit, Text 21/2014.
- MÖLLER, M.; HERMANN, A.; GROß, R.; DIESNER, M.-O.; KÜPPERS, P.; LUTHER, W.; MALANOWSKI, N.; HAUS, D.; ZWECK, A. (2013): Nanomaterialien: Auswirkungen auf Umwelt und Gesundheit. Hrsg.: vdf Hochschulverlag AG. Zentrum für Technologiefolgen-Abschätzung. Zürich.
- MORENO-GARRIDO, I.; PÉREZ, S.; BLASCO, J. (2015): Toxicity of silver and gold nanoparticles on marine microalgae. In: *Marine Environmental Research*, 111, S. 60.
- MORTIMER, C.E. & MÜLLER, U. (2007): Chemie. Das Basiswissen der Chemie. 9., überarbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart.
- MORTIMER, M.; GOGOS, A.; BARTOLOMÉ, N.; KAHRU, A.; BUCHELI, T.D.; SLAVEYKOVA, V.I. (2014): Potential of hyperspectral imaging microscopy for semi-quantitative analysis of nanoparticle uptake by protozoa. In: *Environmental Science & Technology*, 48 (15), S. 8760.
- NAM, J.; WON, N.; BANG, J.; JIN, H.; PARK, J.; JUNG, S.; JUNG, S.; PARK, Y.; KIM, S. (2013): Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (5), S. 622.
- NAVARRO, E.; PICCAPIETRA, F.; WAGNER, B.; MARCONI, F.; KAEGI, R.; ODZAK, N.; SIGG, L.; BEHRA, R. (2008): Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Environmental Science & Technology*, 42 (23), S. 8959.
- NAVARRO, E.; WAGNER, B.; ODZAK, N.; SIGG, L.; BEHRA, R. (2015): Effects of differently coated silver nanoparticles on the photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Environmental Science & Technology*, 49 (13), S. 8041.
- NEALE, P.A.; JÄMTING, Å.K.; ESCHER, B.I.; HERRMANN, J. (2013): A review of the detection, fate and effects of engineered nanomaterials in wastewater treatment plants. In: *Water Science and Technology*, 68 (7), S. 1440.
- NOLTE, T.M.; HARTMANN, N.B.; KLEIJN, J.M.; GARNÆS, J.; VAN DE MEENT, D.; HENDRIKS, J.A.; BAUN, A. (2017): The toxicity of plastic nanoparticles to green algae as influenced by surface modification, medium hardness and cellular adsorption. In: *Aquatic Toxicology*, 183, S. 11.
- NOTTER, D.A.; MITRANO, D.M.; NOWACK, B. (2014): Are nanosized or dissolved metals more toxic in the environment? A meta-analysis. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33 (12), S. 2733.
- NOVAKOVSKAYA, I. & PATOVA, E. (2008): Green algae in spruce forests in the north-east of European Russia. In: *Biologia*, 63 (6), S. 22.

- NOWACK, B. & BUCHELI, T.D. (2007): Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. In: *Environmental Pollution*, 150 (1), S. 5.
- NYGAARD, G.; KRISTIANSEN, J.; SKULBERG, O.M. (1986): Taxonomic designations of the bioassay alga NIVA-CHL 1 ("*Selenastrum capricornutum*") and some related strain. In: *Opera Botanica*, 90, S. 1.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2002): OECD Guidelines for the testing of chemicals; Proposal for updating guideline 201 - Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Publishing.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2011): OECD Guidelines for the testing of chemicals; Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Publishing.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2012a): Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials. OECD Publishing.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2012b): Six years of OECD work on the safety of nanomaterials: Achievements and Future Opportunities. Online verfügbar unter: [https://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/Nano%20Brochure%20Sept%202012%20for%20Website%20%20\(2\).pdf](https://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/Nano%20Brochure%20Sept%202012%20for%20Website%20%20(2).pdf); zuletzt geprüft am 30.12.2018.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2018): Chemical safety and biosafety; Safety of manufactured nanomaterials, Testing Programme of Manufactured Nanomaterials. Online verfügbar unter: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/testing-programme-manufactured-nanomaterials.htm>; zuletzt geprüft am 30.12.2018.
- ÖNER, D.; GHOSH, M.; PUTZEYS, E.; GODDERIS, L.; HOET, P. (2015): The assessment of asbestos and carbon nanotubes induced genotoxic effects. In: *Frontiers in Genetics Conference Abstract: ICAW*.
- ORTHEN B. (2007): Nanotechnologie: Gesundheits- und Umweltrisiken von Nanomaterialien - Forschungsstrategie. Hrsg. v. BAuA (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin), BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), UBA (Umweltbundesamt).
- OUKARROUM, A.; BRAS, S.; PERREAULT, F.; POPOVIC, R. (2012): Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, S. 80.
- OUKARROUM, A.; SAMADANI, M.; DEWEZ, D. (2014): Influence of pH on the Toxicity of Silver Nanoparticles in the Green Alga *Chlamydomonas acidophila*. In: *Water Air Soil Pollut*, 225 (8), S. 79.
- OZKALELI, M. & ERDEM, A. (2018): Biototoxicity of TiO₂ nanoparticles on *Raphidocelis subcapitata* microalgae exemplified by membrane deformation. In: *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15 (3), S. 416.
- PANYAM, J.; SAHOO, S.K.; PRABHA, S.; BARGAR, T.; LABHASETWAR, V. (2003): Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. In: *International Journal of Pharmaceutics*, 26216 (1-2), S. 1.

- PEN (The Project on Emerging Nanotechnologies) (2019): Consumer Products Inventory. An inventory of nanotechnology-based consumer products introduced on the market. Online verfügbar unter <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/>; zuletzt geprüft am 11.08.2019.
- PERREAULT, F.; OUKARROUM, A.; MELEGARI, S.P.; MATIAS, W.G.; POPOVIC, R. (2012): Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Chemosphere*, 87 (11), S. 1388.
- PETERS, R.J. B.; VAN BEMMEL, G.; MILANI, N.B.L.; DEN HERTOOG, G.C.T.; UNDAS, A.K.; VAN DER LEE, M.; BOUWMEESTER, H. (2018): Detection of nanoparticles in Dutch surface waters. In: *The Science of the Total Environment*, 621, S. 210.
- PHILIPPE, A.; KOŠÍK, J.; WELLE, A.; GUIGNER, J.-M.; CLEMENS, O.; SCHAUMANN, G.E. (2018): Extraction and characterization methods for titanium dioxide nanoparticles from commercialized sunscreens. In: *Environmental Science: Nano*, 5 (1), S. 191.
- PICCHIETTI, S.; BERNINI, C.; STOCCHI, V.; TADDEI, A.R.; MESCHINI, R.; FAUSTO, A.M.; ROCCO, L.; BUONOCORE, F.; CERVIA, G.; SCAPIGLIAT, G. (2017): Engineered nanoparticles of titanium dioxide (TiO₂): Uptake and biological effects in a sea bass cell line. In: *Fish & shellfish immunology*, 63, S. 53.
- PICCINNO, F.; GOTTSCHALK, F.; SEEGER, S.; NOWACK, B. (2012): Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. In: *Journal of Nanoparticle Research*, 14 (9), S. 300.
- POLAND, C.; READ, S.A.K.; VARET, J.; CARSE, G.; CHRISTENSEN, F.M.; HANKIN, S.M. (2013): Dermal absorption of nanomaterials. Hrsg.: The Danish Environmental Protection Agency.
- Postnova Analytics (2018): Untersuchung von Umweltproben auf Nanomaterialien für NanoUmwelt. Schriftliche Mitteilung von Dr. F. Meier vom 11.06.2018.
- PRAETORIUS, A.; TUFENKJI, N.; GOSS, K.-U.; SCHERINGER, M.; VON DER KAMMER, F.; ELIMELECH, M. (2014): The road to nowhere: Equilibrium partition coefficients for nanoparticles. In: *Environmental Science: Nano*, 1 (4), S. 317.
- PROVASOLI, L.; MCLAUGHLIN, J.J.A.; DROOP, M.R. (1957): The development of artificial media for marine algae. In: *Archives Mikrobiology.*, 25 (4), S. 392.
- RAAB, C.; SIMKÓ, M.; FIEDELER, U.; NENTWICH, M.; GAZSÓ, A. (2008): Herstellungsverfahren von Nanopartikeln und Nanomaterialien. In: *ITA Nanotruster Dossiers*, Nr. 6, S. 1. Hrsg. v. ITA (Institut für Technikfolgen-Abschätzung).
- RADIX, P.; LÉONARD, M.; PAPANTONIOU, C.; ROMAN, G.; SAOUTER, E.; GALLOTTI-SCHMITT, S.; THIÉBAUD, H.; VASSEUR, P. (2000). Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(2), S. 186.
- REDDY, P.V.L.; KAVITHA, B.; KUMAR REDDY, P.A.; KIM, K.-H. (2017): TiO₂-based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: A review. In: *Environmental Research*, 154, S. 296.
- REINHOLD, T. (1937): La flore fossile í diatomées de Moliro (Lac Tanganyika Katanga). In: *Annales de la Société. Géologique. Belgique*, 61 (1), S. 39.
- REYNOLDS, E.S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. In: *The Journal of Cell Biology*, 17 (1), S. 208.

- RIBEIRO, F.; GALLEGU-URREA, J.A.; JURKSCHAT, K.; CROSSLEY, A.; HASSELLÖV, M.; TAYLOR, C.; SOARES, A.M.; LOUREIRO, S. (2014): Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. In: *The Science of the Total Environment*, 466-467, S. 232.
- RODRIGUES, L.H.R.; ARENZON, A.; RAYA-RODRIGUEZ, M.T.; FONTOURA, N.F. (2011): Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. In: *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(8), S. 225.
- ROSSI, G.; BARNOUD, J.; MONTICELLI, L. (2014): Polystyrene nanoparticles perturb lipid membranes. In: *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 5 (1), S. 241.
- ROUND, F.E. (1975): *Biologie der Algen. Eine Einführung*. 2. überarb. und erw. Aufl. Thieme, Stuttgart.
- RUBAN, A.V. (2016): Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. In: *Plant Physiology*, 170 (4), S. 1903.
- SADIK, O.A.; DU, N.; YAZGAN, I.; OKELLO, V. (2014): Nanostructured membranes for water purification. In: *Nanotechnology Applications for Clean Water: Elsevier Science (Micro & Nano Technologies Series)*, S. 95.
- SAISON, C.; PERREAULT, F.; DAIGLE, J.-C.; FORTIN, C.; CLAVERIE, J.; MORIN, M.; POPOVIC, R. (2010): Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Aquatic Toxicology*, 96 (2), S. 109.
- SARAVANAN, M.; BARIK, S.K.; MUBARAKALI, D.; PRAKASH, P.; PUGAZHENDHI, A. (2018): Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. In: *Microbial Pathogenesis*, 116, S. 221.
- SAWADA, H.; SHIMURA, N.; HOSOKAWA, F.; SHIBATA, N.; IKUHARA, Y. (2015): Resolving 45-pm-separated Si-Si atomic columns with an aberration-corrected STEM. In: *Microscopy*, 64 (3), S. 213.
- SCHNEIDER, M. (2012). *Nano Anwendungen*. Online verfügbar unter: <http://www.nanotechnologien.com/anwendungen>; zuletzt geprüft am 30.12.2018.
- SCHULTZ, M.E. & TRAINOR, F.R. (1968): Production of male gametes and auxospores in the centric diatoms *Cyclotella meneghiniana* and *C. cryptica*. In: *Journal of Phycology*, 4 (2), S. 85.
- SCHWOTZER, D.; ERNST, H.; SCHAUDIEN, D.; KOCK, H.; POHLMANN, G.; DASENBROCK, C.; CREUTZENBERG, O. (2017): Effects from a 90-day inhalation toxicity study with cerium oxide and barium sulfate nanoparticles in rats. In: *Particle and Fibre Toxicology*, 14 (1), S. 23.
- SHETE, S.; SHENDE, S.; BHAGWAT, K.; DAGADE, S.; DESHPANDE, N.; WAGHMODE, S. (2014): Green synthesis of silver chloride nanoparticles by using *Rosa macdub* petal extract. In: *International Journal of Biosciences and Nanosciences*, 1, S. 96.
- SILVA-ACIARES, F.R. & RIQUELME, C.E. (2008): Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. In: *Aquacultural Engineering*, 38 (1), S. 26.
- SJOLLEMA, S.B.; REDONDO-HASSELERHARM, P.; LESLIE, H.A.; KRAAK, M.H.S.; VETHAAK, A.D. (2016): Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? In: *Aquatic Toxicology*, 170, S. 259.

- SKJOLDING, L.M.; SØRENSEN, S.N.; HARTMANN, N.B.; HJORTH, R.; HANSEN, S.F.; BAUN, A. (2016): Aquatische Ökotoxizität von Nanopartikeln - Versuche zur Aufklärung von Nanopartikeleffekten. In: *Angewandte Chemie*, 128 (49), S. 15448.
- SOLDO, D.; HARI, R.; SIGG, L.; BEHRA, R. (2005): Tolerance of oocystis nephrocytioides to copper: intracellular distribution and extracellular complexation of copper. In: *Aquatic Toxicology*, 71 (4), S. 307.
- SØRENSEN, S.N. & BAUN, A. (2015): Controlling silver nanoparticle exposure in algal toxicity testing- a matter of timing. In: *Nanotoxicology*, 9 (2), S. 201.
- SRU (Sachverständigenrat für Umweltfragen) (2011): Vorsorgestrategien für Nanomaterialien; Sondergutachten, Juni 2011.
- STIRK, W.A.; ÖRDÖG, V.; NOVÁK, O.; ROLČÍK, J.; STRNAD, M.; BÁLINT, P.; VAN STADEN, J. (2013): Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains(1). In: *Journal of Phycology*, 49 (3), S. 459.
- TAK, Y.K.; PAL, S.; NAOGHARE, P.K.; RANGASAMY, S.; SONG, J.M. (2015): Shape-dependent skin penetration of silver nanoparticles: does it really matter? In: *Scientific Reports*, 5, S. 1.
- TAKENAKA, S.; KARG, E.; ROTH, C.; SCHULZ, H.; ZIESENIS, A.; HEINZMANN, U.; SCHRAMEL, P.; HEYDER, J. (2001): Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. In: *Environmental Health Perspectives*, 109 (4), S. 547.
- TAUROZZI, J.S.; HACKLEY, V.A.; WIESNER, M.R. (2011): Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment-issues and recommendations. In: *Nanotoxicology*, 5 (4), S. 711.
- THAKUR, S.; TAHKUR, S.; KUMAR, R. (2018): Bio-Nanotechnology and its Role in Agriculture and Food Industry. In: *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 12 (324).
- THOMAS, J. & GEMMING, T. (2013): Analytische Transmissionselektronenmikroskopie. Springer Vienna.
- THOMPSON, S.E.M.; TAYLOR, A.R.; BROWNLEE, C.; CALLOW, M.E.; CALLOW, J.A. (2008): The role of nitric oxide in diatom adhesion in relation to substratum properties (1). In: *Journal of Phycology*, 44 (4), S. 967.
- THORLEY, A.J.; RUENRAROENGSAK, P.; POTTER, T.E.; TETLEY, T.D. (2014): Critical determinants of uptake and translocation of nanoparticles by the human pulmonary alveolar epithelium. In: *ACS Nano*, 8 (11), S. 11778–11789.
- TRIPATHI, D.K.; TRIPATHI, A.; SHWETA; SINGH, S.; SINGH, Y.; VISHWAKARMA, K.; YADAV, G.; SHARMA, S. (2017): Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: A Concentric Review. In: *Frontiers in Microbiology*, 8, S. 7.
- VAN HOECKE, K.; QUIK, J.T.K.; MANKIEWICZ-BOCZEK, J.; DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; ELSAESSER, A.; VAN DER MEEREN, P.; BARNES, C.; MCKERR, G.; HOWARD, C.V.; VAN DE MEENT, D.; RYDZYŃSKI, K.; DAWSON, K.A.; SALVATI, A.; LESNIAK, A.; LYNCH, I.; SILVERSMIT, G.; DE SAMBER, B.; VINCZE, L.; JANSSEN, C.R. (2009): Fate and effects of CeO₂ nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests. In: *Environmental Science & Technology*, 43 (12), S. 4537.
- VANCE, M.E.; KUIKEN, T.; VEJERANO, E.P.; MCGINNIS, S.P.; HOHELLA, M.F.; REJESKI, D.; HULL, M.S. (2015): Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. In: *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, S. 1769.

- VELZEBOER, I.; HENDRIKS, A.J.; RAGAS, A.M.J.; VAN DE MEENT, D. (2008): Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9), S. 1942.
- VÖLKER, C. (2013): Ecotoxicological analysis of silver nanoparticles: A contribution to the risk assessment of nanomaterials. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- VON BORRIES, B. & RUSKA, E. (1939): Ein Übermikroskop für Forschungsinstitute. In: *Naturwissenschaften*, 27 (34), S. 577.
- VON BORRIES, B.; RUSKA, E.; RUSKA, H. (1938): Bakterien und Virus in Übermikroskopischer Aufnahme. In: *Klinische Wochenschrift* 17 (27), S. 921.
- VON GLEICH, A.; PETSCHOW, U.; STEINFELDT, M. (2007): Nachhaltigkeitspotenziale und Risiken von Nanotechnologien – Erkenntnisse aus der Prospektiven Technikbewertung und Ansätze zur Gestaltung. In: *Nano*, S. 61, Springer-Verlag Wien.
- VON MOOS, N. & SLAVEYKOVA, V.I. (2014): Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae--state of the art and knowledge gaps. In: *Nanotoxicology*, 8 (6), S. 605.
- WALCZAK, A.P.; KRAMER, E.; HENDRIKSEN, P.J.M.; TROMP, P.; HELSPER, J.P.F.G.; VAN DER ZANDE, M.; RIETJENS, I.M.C.M.; BOUWMEESTER, H. (2015): Translocation of differently sized and charged polystyrene nanoparticles in in vitro intestinal cell models of increasing complexity. In: *Nanotoxicology*, 9 (4), S. 453.
- WALZ, A.; VÖLKER, C.; KLÖPPEL, L. (2014): Nanotechnologie: Eine Übersicht; Vorarbeiten zu einer sozial-ökologischen Risikoforschung. Hrsg.: ISOE (Institut für sozial-ökologische Forschung).
- WANG, W.; ZHU, L.; SHAN, B.; XIE, C.; LIU, C.; CUI, F.; LI, G. (2018): Preparation and characterization of SLS-CNT/PES ultrafiltration membrane with antifouling and antibacterial properties. In: *Journal of Membrane Science*, 548, S. 459.
- WANG, Y.; ZHU, X.; LAO, Y.; LV, X.; TAO, Y.; HUANG, B.; WANG, J.; ZHOU, J.; CAI, Z. (2016a): TiO₂ nanoparticles in the marine environment: Physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricoratum*. In: *The Science of the Total Environment*, 565, S. 818.
- WANG, Z.; ZHANG, L.; ZHAO, J.; XING, B. (2016b): Environmental processes and toxicity of metallic nanoparticles in aquatic systems as affected by natural organic matter. In: *Environmental Science: Nano*, 3 (2), S. 240.
- WARHEIT, D.B.; HOKE, R.A.; FINLAY, C.; DONNER, E.M.; REED, K.L.; SAYES, C.M. (2007): Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. In: *Toxicology Letters*, 171 (3), S. 99.
- WEILER, E.W. & NOVER, L. (2008): Allgemeine und molekulare Botanik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- WEN, C. & MA, Y.J. (2018): Determination of atomic-scale chemical composition at semiconductor heteroepitaxial interfaces by high-resolution transmission electron microscopy. In: *Micron*, 106, S. 48.
- WEPASNICK, K.A.; SMITH, B.A.; BITTER, J. L.; FAIRBROTHER, H.D. (2010): Chemical and structural characterization of carbon nanotube surfaces. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (3), S. 1003.

- WIJNHOFEN, S.W.P.; PEIJNENBURG, W.J.G.M.; HERBERTS, C.A.; HAGENS, W.I.; OOMEN, A.G.; HEUGENS, E.H.W.; ROSZEK, B.; BISSCHOPS, J.; GOSENS, I.; VAN DE MEENT, D.; DEKKERS, S.; DE JONG, W.H.; VAN ZIJVERDEN, M.; SIPS, A.J.A.M.; GEERTSMA, R.E. (2009): Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. In: *Nanotoxicology*, 3 (2), S. 109.
- WIN, K.Y & FENG, S.-S. (2005): Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. In: *Biomaterials*, 26 (15), S. 2713.
- XIAO, R. & ZHENG, Y. (2016): Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. In: *Biotechnology Advances*, 34 (7), S. 1225.
- XIU, Z.-M.; ZHANG, Q.-B.; PUPPALA, H.L.; COLVIN, V.L.; ALVAREZ, P.J.J. (2012): Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. In: *Nano Letters*, 12 (8), S. 4271.
- YAMAGISHI, T.; YAMAGUCHI, H.; SUZUKI, S.; HORIE, Y.; TATARAZAKO, N. (2017): Cell reproductive patterns in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (= *Selenastrum capricornutum*) and their variations under exposure to the typical toxicants potassium dichromate and 3,5-DCP. In: *PLoS ONE*, 12 (2), S. 171259.
- ZHANG, X.-W.; CHEN, F.; JOHNS, M.R. (1999): Kinetic models for heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in batch and fed-batch cultures. In: *Process Biochemistry*, 35 (3-4), S. 385.
- ZHAO, J.; CAO, X.; LIU, X.; WANG, Z.; ZHANG, C.; WHITE, J.C.; XING, B. (2016): Interactions of CuO nanoparticles with the algae *Chlorella pyrenoidosa*: adhesion, uptake, and toxicity. In: *Nanotoxicology*, 10 (9), S. 1297.

Anhang

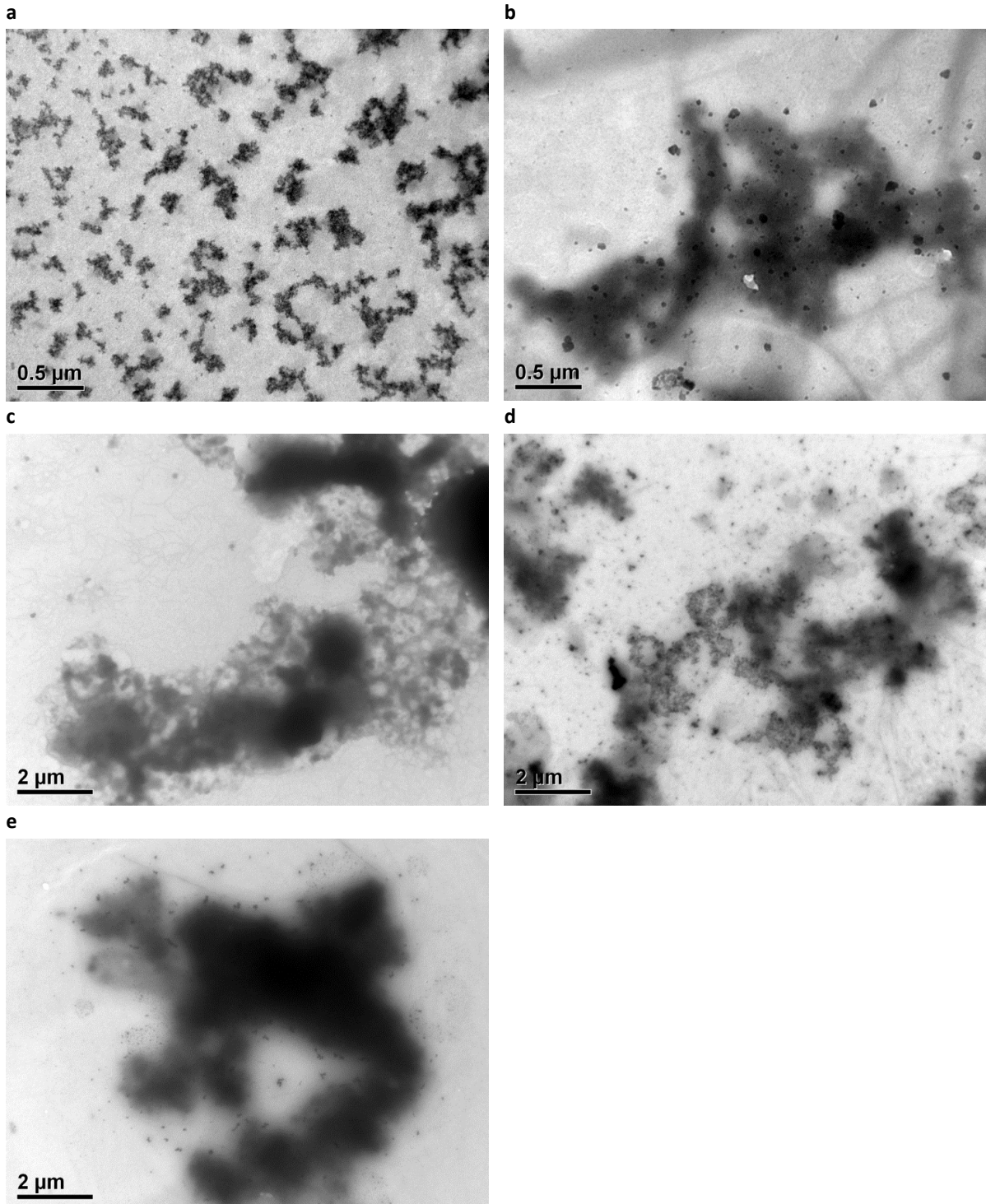
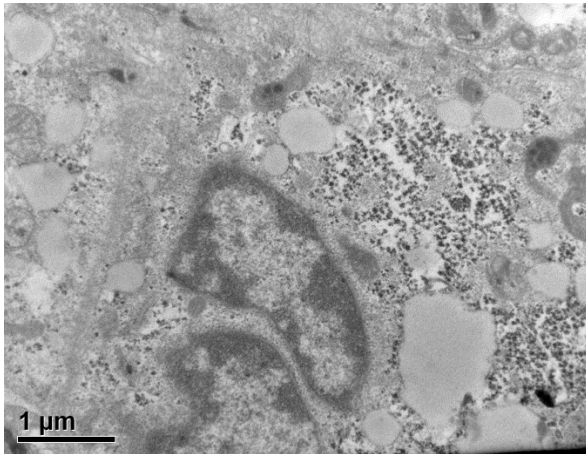


Abb. 76) TEM-Aufnahmen von homogenisiertem Fischblut und -gewebe. (a) Blut. (b) Darm. (c) Leber. (d) Milz. (e) Muskulatur.

a



b

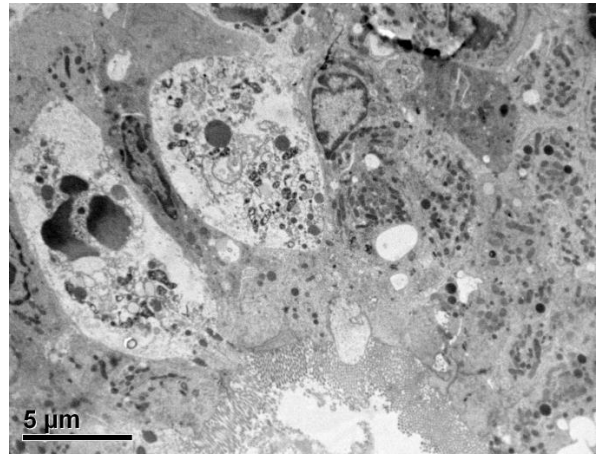


Abb. 77) TEM-Aufnahmen von Darmzellen der Negativkontrolle. (a) Humane Zellen des In-vitro-Modells. (b) Zellen des Schweinedünndarms.

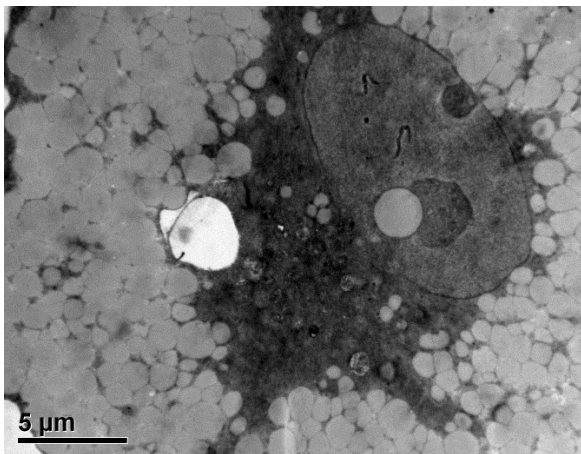


Abb. 78) TEM-Aufnahme von einer humanen Stammzelle der Negativkontrolle.

Zusammensetzung Kulturmedien

Bristol-Medium

Das Medium wurde für die Arten *R. subcapitata* und *C. reinhardtii* verwendet. Zur Herstellung werden die in Tab. 8 aufgezählten Substanzen vermischt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Flüssigkeit wird dem Medium unter der Sterilbank jeweils 1 mL von zuvor angesetzten und sterilfiltrierten Lösungen mit Spurenelementen, Vitaminen und Eisen hinzugefügt. Die Zusammensetzung der Spurenelementlösung ist in Tab. 9 aufgeführt. Sie wird mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt. Die Inhaltsstoffe der Vitaminlösung können

Tab. 10 entnommen werden. Die Lösung wird mit Salzsäure auf eine pH-Wert von 7,5 bis 7,8 eingestellt. Die zur Herstellung der Eisen-III-Lösung notwendigen Chemikalien werden in Tab. 11 genannt.

Tab. 8) Chemikalien zur Herstellung von 1 L Bristol-Medium.

Substanz		Menge
Bidestilliertes Wasser	H ₂ O	940 mL
Natriumnitrat	NaNO ₃	250 mg
Calciumchlorid	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	25 mg
Magnesiumsulfat	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	75 mg
Dikaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	75 mg
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	175 mg
Natriumchlorid	NaCl	25 mg

Tab. 9) Zusammensetzung von 1 L Spurenelementlösung.

Substanz		Menge
Bidestilliertes Wasser	H ₂ O	950 mL
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	30 g
Magnesiumchlorid	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	4,05 g
Zinkchlorid	ZnCl ₂	300 g
Cobaltdichlorid	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	12 mg
Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	6 mg
Kupferchlorid	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	3 mg

Tab. 10) Zusammensetzung von 1 L Vitaminlösung.

Substanz		Menge
Bidestilliertes Wasser	H ₂ O	1 L
Thiamin	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	200 mg
Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	1 mg
Cobalamin	C ₇₂ H ₁₀₀ CoN ₁₈ O ₁₇ P	1 mL

Tab. 11) Zusammensetzung von 1 L Eisen-III-Lösung.

Substanz		Menge
Bidestilliertes Wasser	H ₂ O	1 L
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	4,65 g
Eisenchlorid	FeCl ₃	1,98 g

ASP-Medium

Das Medium wurde für die Art *C. meneghiniana* verwendet. Zur Herstellung werden die in Tab. 12 aufgezählten Substanzen vermischt, der pH-Wert wird mit Schwefelsäure auf 7,7 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Nach dem Abkühlen werden unter der Sterilbank Calciumchlorid, Spurenelemente und Eisen hinzugefügt. Die Zusammensetzung der Calciumchlorid-Lösung, von der 10 mL ins ASP-Medium pipettiert werden, kann

Tab. 13 entnommen werden. Zudem werden dem Medium jeweils 1 mL Spurenelement- und Eisenlösung hinzugegeben, wobei die Zusammensetzung und Herstellung den für das Bristol-Medium verwendeten Lösungen entsprechen.

Tab. 12) Chemikalien zur Herstellung von 1 L ASP-Medium.

Substanz		Menge
Bidestilliertes Wasser	H ₂ O	940 mL
Natriumchlorid	NaCl	5 g
Tromethamin	C ₄ H ₁₁ NO ₃	0,5 g
Kaliumchlorid	KCl	1,6 g
Magnesiumsulfat	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g
Natriumnitrat	NaNO ₃	1 g
Dikaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	0,1 g

Substanz		Menge
Borsäure	H_3BO_3	0,1 g
Kieselsol (15 % in H_2O von Roth®)		740 μL

Tab. 13) Chemikalien zur Herstellung von 1 L Calciumchloridlösung.

Substanz		Menge
Bidestilliertes Wasser	H_2O	1000 mL
Calciumchlorid	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	40 g

Absorptionsspektren der Mikroalgen

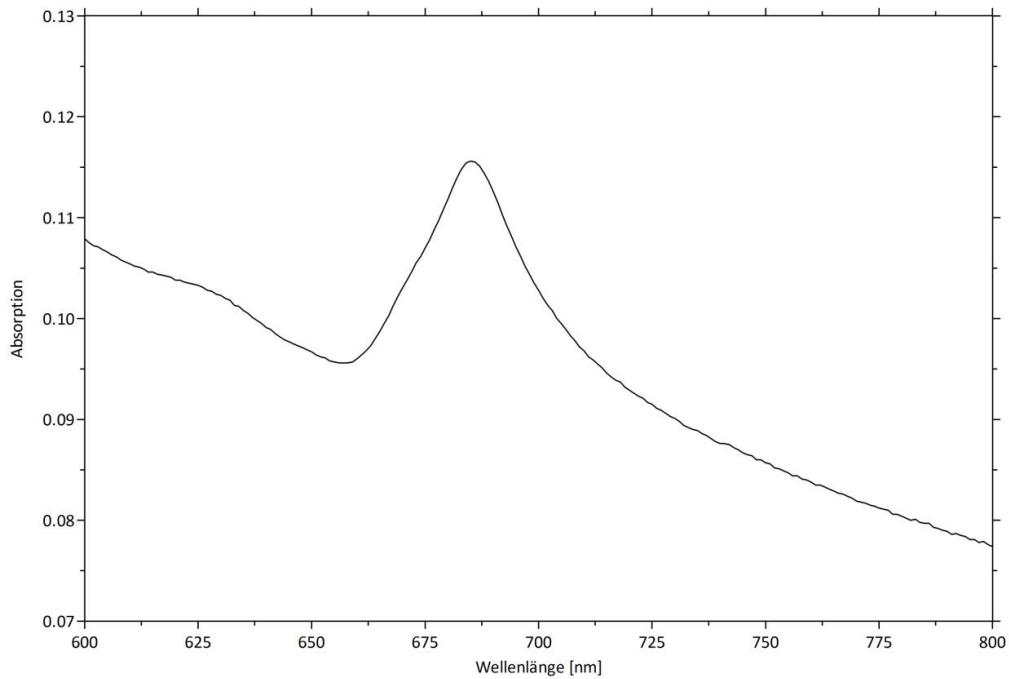


Abb. 79) Absorptionsspektrum von *R. subcapitata* in Bristol-Medium bei Wellenlängen zwischen 600 und 800 nm.

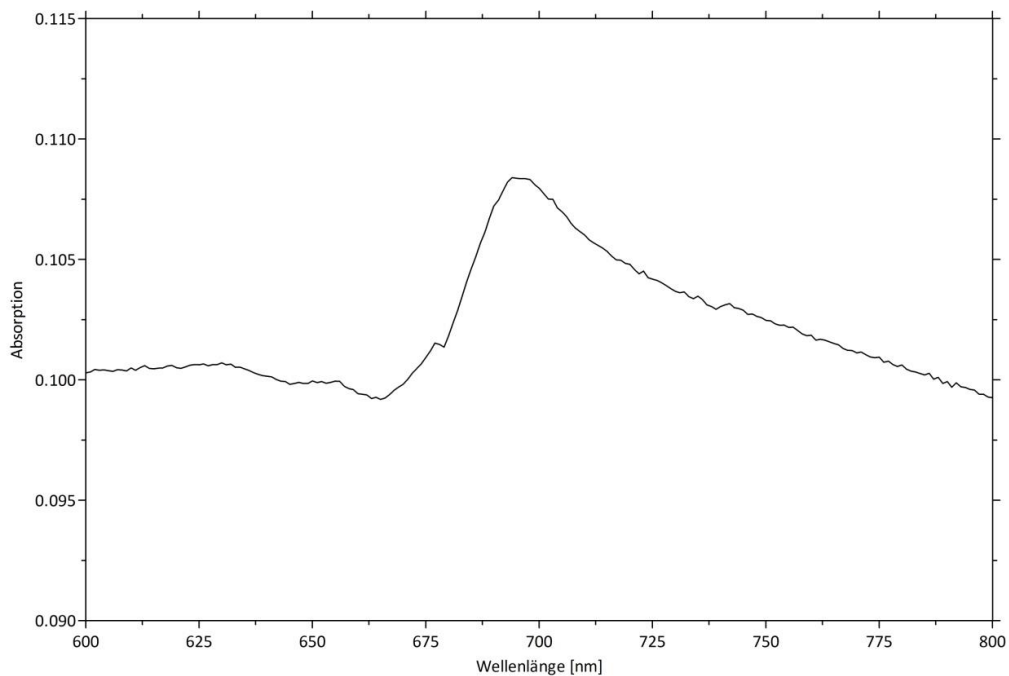


Abb. 80) Absorptionsspektrum von *C. reinhardtii* in Bristol-Medium bei Wellenlängen zwischen 600 und 800 nm.

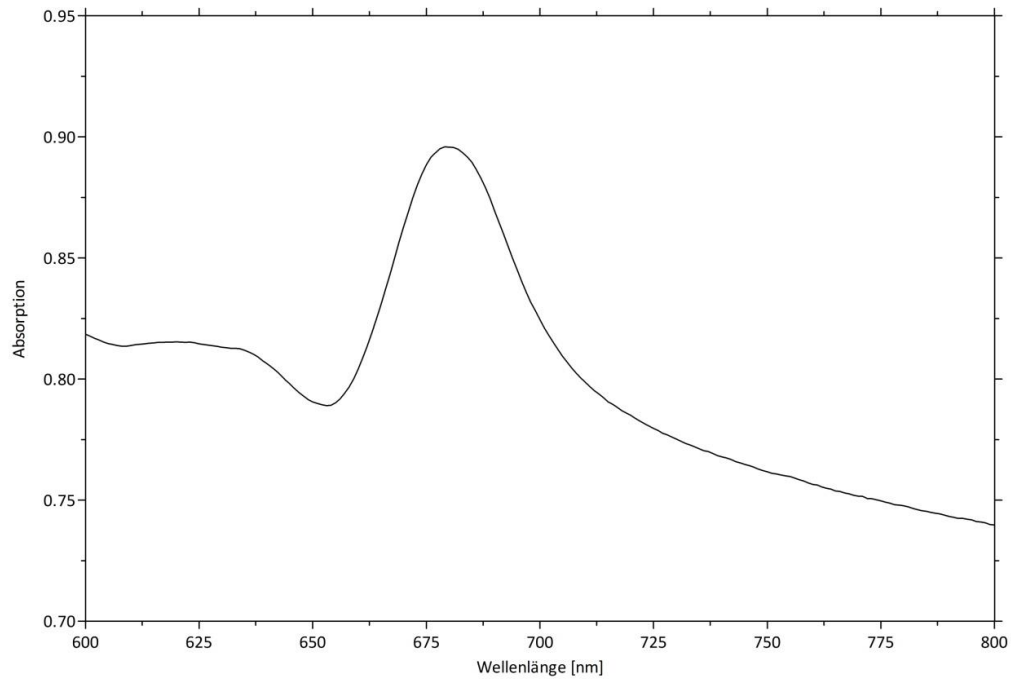


Abb. 81) Absorptionsspektrum von *C. meneghiniana* in ASP-Medium bei Wellenlängen zwischen 600 und 800 nm.

Konfidenzintervall und Anpassungsgüte der EC₅₀-Werte

Tab. 14) 95 %-Konfidenzintervall, Freiheitsgrade, Bestimmtheitsmaß, Abweichungsquadratsumme und Standardabweichung der Residuen für die EC₅₀-Werte der Zellzahlmessung.

Testsubstanz	Testorganismus	Einheit	EC ₅₀	95 %- Konfidenzintervall	Freiheitsgrade	r ²	Abweichungsquadratsumme	Sy.x
Ag Pure	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	19,59	15.20 to 25.23	11	0,9664	0,009101	0,02876
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	~ 37.16	(Very wide)	11	0,8819	0,003647	0,01821
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	1,592	1.257 to 2.018	11	0,9804	0,003811	0,01861
Ag- COOH	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	17,15	12.06 to 24.41	11	0,9600	0,005566	0,02250
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	94,00	-	11	0,2727	0,008150	0,02722
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 734.1	(Very wide)	8	0,9052	0,009770	0,03495
Ag- NH ₂	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	~ 19738	(Very wide)	11	0,9312	0,002988	0,01648
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	~ 246.3	(Very wide)	11	0,2698	0,008802	0,02829
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	3,644	2.913 to 4.559	11	0,9830	0,002308	0,01448
AgNO ₃	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	16,25	14.57 to 18.13	11	0,9953	0,001782	0,01273
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	28,89	23.02 to 36.25	11	0,9840	0,003111	0,01682
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 0.2864	(Very wide)	8	0,9797	0,001591	0,01410
TiO ₂ -n	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	~ 30.22	(Very wide)	8	0,2587	0,006604	0,02873
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	~ 102.0	(Very wide)	11	0,9190	0,01891	0,04146
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 11.50	(Very wide)	5	0,4842	0,007150	0,03782
TiO ₂ - COOH	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	~ 96.21	(Very wide)	11	0,4733	0,006128	0,02360
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	~ 12.40	(Very wide)	11	0,2401	0,01304	0,03443
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 42.02	(Very wide)	11	0,8759	0,01394	0,03560
TiO ₂ - NH ₂	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	~ 377.4	(Very wide)	11	0,6564	0,002608	0,01540
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	66,79	9.078 to 491.4	11	0,3540	0,009921	0,03003
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 110.4	(Very wide)	11	0,7599	0,03063	0,05277
PS-n	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	~ 578571	(Very wide)	11	0,6464	0,02101	0,04371
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	~ 8.001	(Very wide)	11	0,5673	0,008740	0,02819
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 8.709	(Very wide)	11	0,8559	0,008641	0,02803

Testsubstanz	Testorganismus	Einheit	EC ₅₀	95 %- Konfidenzintervall	Freiheitsgrade	R ²	Abweichungsquadratsumme	Sy.x
PS-COOH	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	10,66	5.326 to 21.33	11	0,7945	0,01628	0,03847
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	~ 87.34	(Very wide)	11	0,5781	0,003985	0,01903
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 26.46	(Very wide)	11	0,5831	0,007065	0,02534
PS-NH ₂	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	-	-	-	-	-	-
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	21,35	3.344 to 136.3	11	0,6873	0,007031	0,02528
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 1.791e+007	(Very wide)	11	0,8924	0,009503	0,02939

Tab. 15) 95 %-Konfidenzintervall, Freiheitsgrade, Bestimmtheitsmaß, Abweichungsquadratsumme und Standardabweichung der Residuen für die EC₅₀-Werte der Chl a-Messung.

Testsubstanz	Testorganismus	Einheit	EC ₅₀	95 %- Konfidenzintervall	Freiheitsgrade	R ²	Abweichungsquadratsumme	Sy.x
AgPure	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	16,02	12.26 to 20.93	11	0,9697	5,255	0,6911
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	~ 33.90	(Very wide)	11	0,8842	13,26	1,098
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	1,437	1.157 to 1.786	11	0,9937	1,317	0,3460
Ag-COOH	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	15,72	10.52 to 23.49	11	0,9732	2,519	0,4785
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	3761					
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	2,670	1.673 to 4.260	11	0,9642	8,213	0,8641
Ag-NH ₂	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	~ 8886	(Very wide)	11	0,9532	1,969	0,4231
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	~ 96.26	(Very wide)	11	0,2891	21,40	1,395
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 3.390	(Very wide)	11	0,9117	12,96	1,085
AgNO ₃	<i>R. subcapitata</i>	ng/mL	14,36	12.52 to 16.47	11	0,9939	1,205	0,3309
	<i>C. reinhardtii</i>	ng/mL	22,67	19.49 to 26.38	11	0,9850	7,418	0,8212
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 0.2299	(Very wide)	11	0,9574	3,447	0,5598
TiO ₂ -n	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	~ 9518	(Very wide)	11	0,9936	0,5493	0,2235

Testsubstanz	Testorganismus	Einheit	EC ₅₀	95 %- Konfidenzintervall	Freiheitsgrade	R ²	Abweichungs- quadratsumme	Sy.x
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	~ 677.7	(Very wide)	11	0,9694	15,59	1,190
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	34,53	14.60 to 81.67	11	0,8615	18,35	1,292
TiO ₂ - COOH	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	~ 130.5	(Very wide)	11	0,8872	3,207	0,5400
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL						
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 36.99	(Very wide)	11	0,8539	22,90	1,443
TiO ₂ - NH ₂	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	288,0	0.0005837 to 1.422e+008	11	0,8380	2,465	0,4734
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	~ 2.139	(Very wide)	11	0,1391	11,95	1,042
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 100.9	(Very wide)	11	0,8274	44,05	2,001
PS-n	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL						
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	~ 2.923	(Very wide)	11	0,2763	5,717	0,7209
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	39,25	6.907e-005 to 2.230e+007	11	0,9149	11,95	1,042
PS- COOH	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	~ 26.48	(Very wide)	11	0,2002	2,747	0,4997
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	10,15	1.724 to 59.77	11	0,3198	15,71	1,195
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	~ 146272	(Very wide)	11	0,7256	15,09	1,171
PS-NH ₂	<i>R. subcapitata</i>	µg/mL	~ 0.4962	(Very wide)	11	0,1226	2,448	0,4718
	<i>C. reinhardtii</i>	µg/mL	~ 8.871	(Very wide)	11	0,1882	21,27	1,391
	<i>C. meneghiniana</i>	µg/mL	8,872	4.955 to 15.89	11	0,9216	5,397	0,7005

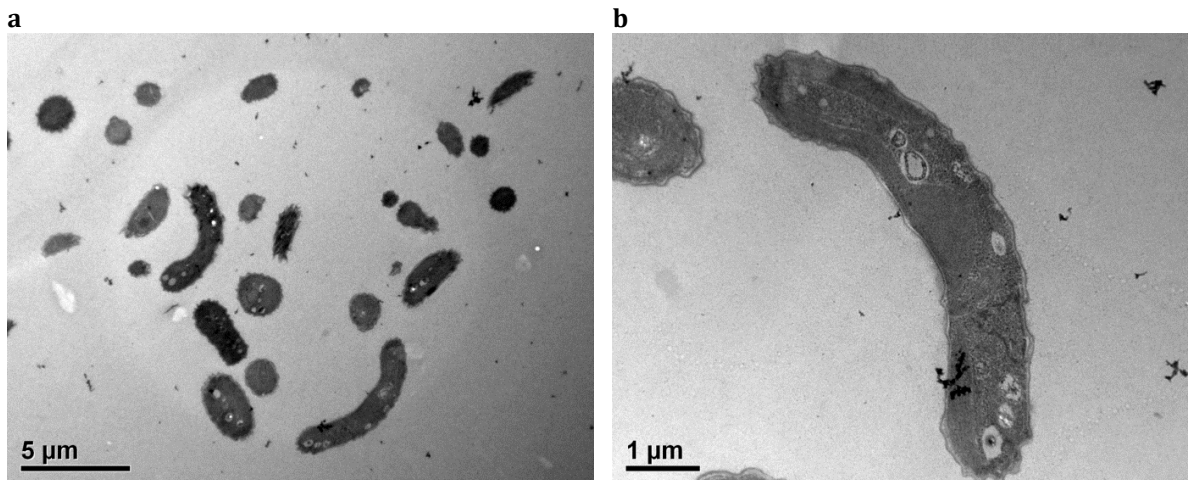
TEM-Bilder Algenzellen**AgPure**

Abb. 82) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *R. subcapitata* nach 72-stündiger Exposition gegenüber AgPure in einer Konzentration von 27 ng Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

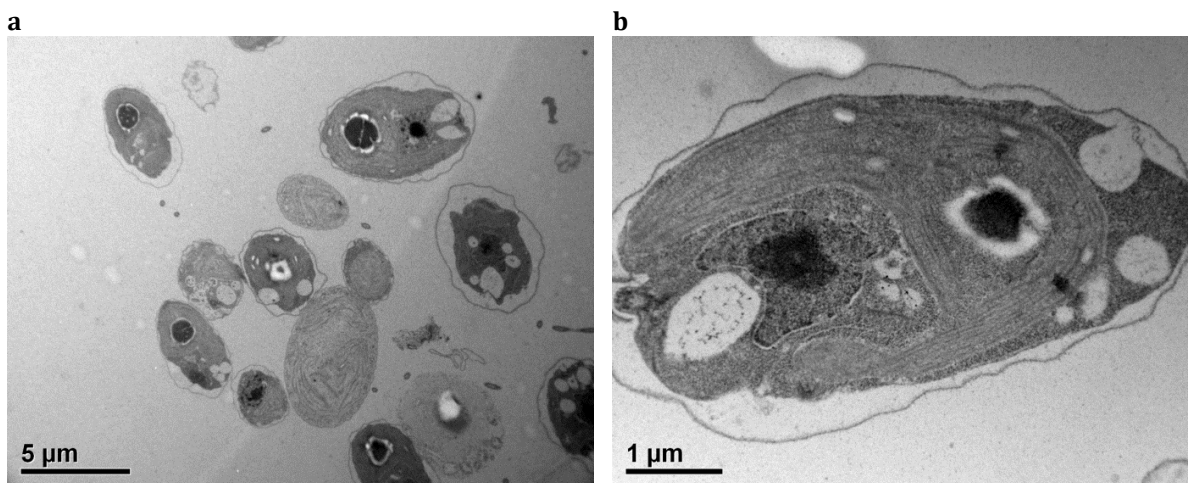


Abb. 83) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. reinhardtii* nach 72-stündiger Exposition gegenüber AgPure in einer Konzentration von 81 ng Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

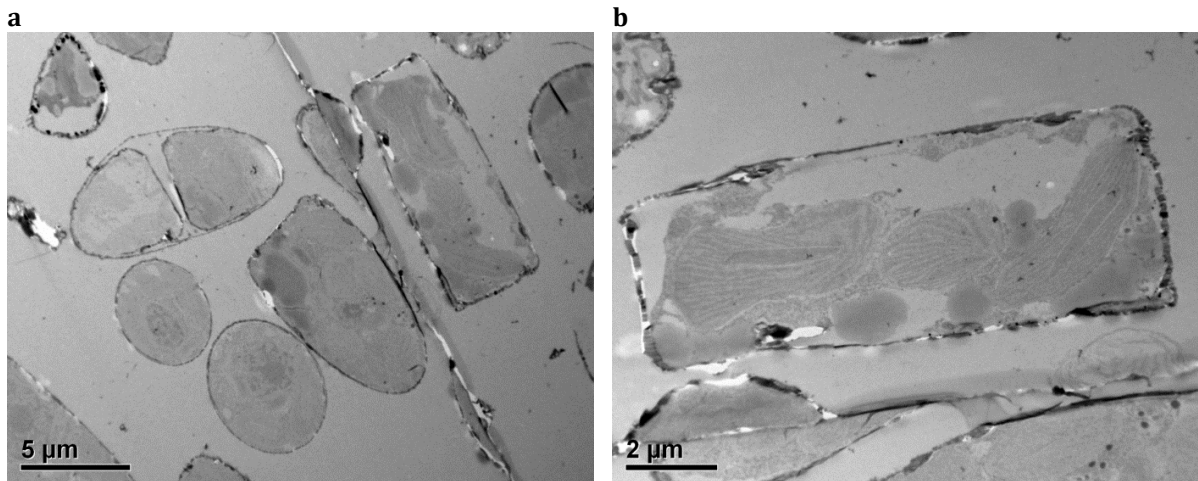


Abb. 84) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. meneghiniana* nach 120-stündiger Exposition gegenüber AgPure in einer Konzentration von 1,11 µg Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

Ag-COOH

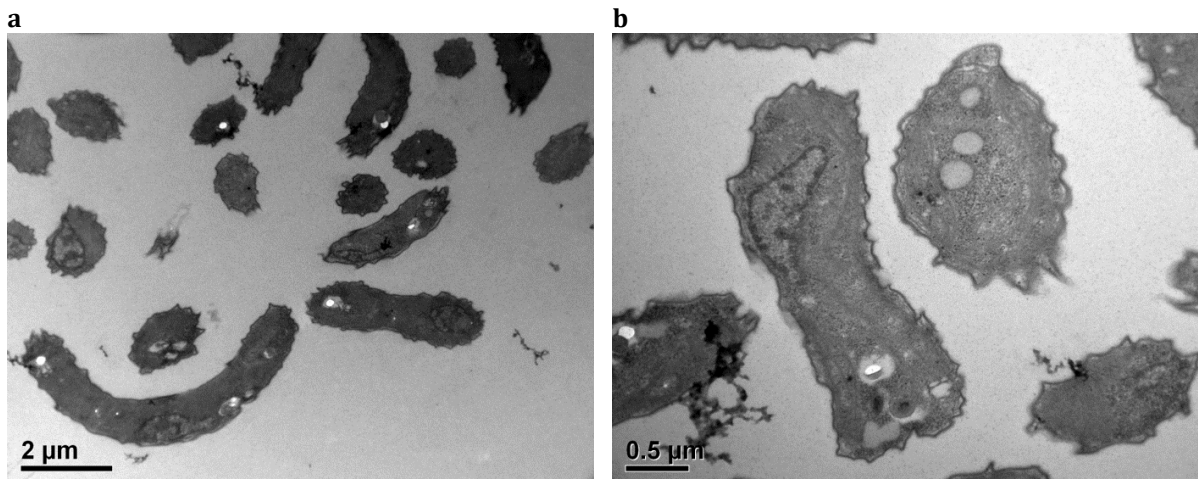


Abb. 85) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *R. subcapitata* nach 72-stündiger Exposition gegenüber Ag-COOH in einer Konzentration von 27 ng Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

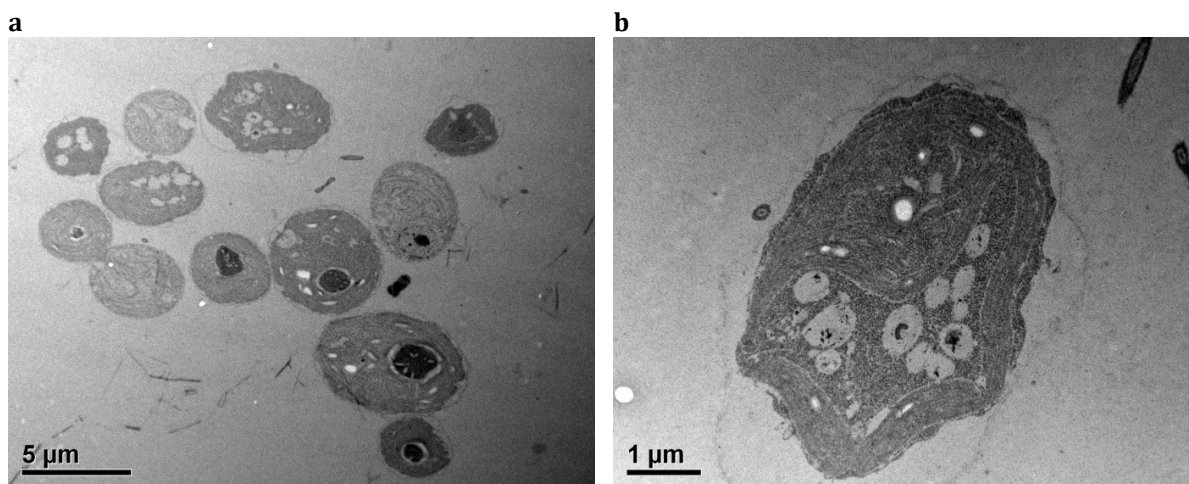


Abb. 86) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. reinhardtii* nach 72-stündiger Exposition gegenüber Ag-COOH in einer Konzentration von 243 ng Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

Ag-NH₂

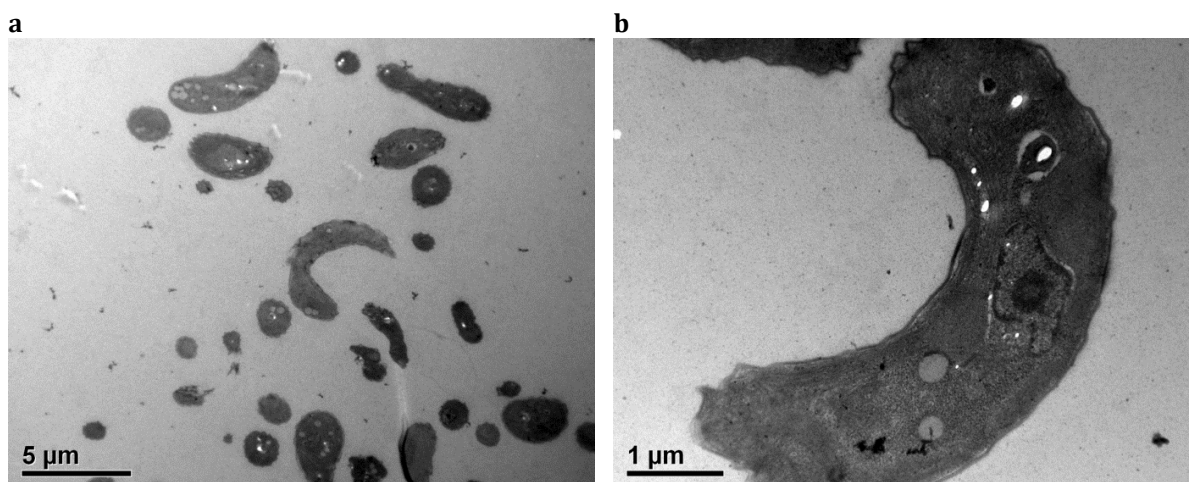


Abb. 87) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *R. subcapitata* nach 72-stündiger Exposition gegenüber Ag-NH₂ in einer Konzentration von 27 ng Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

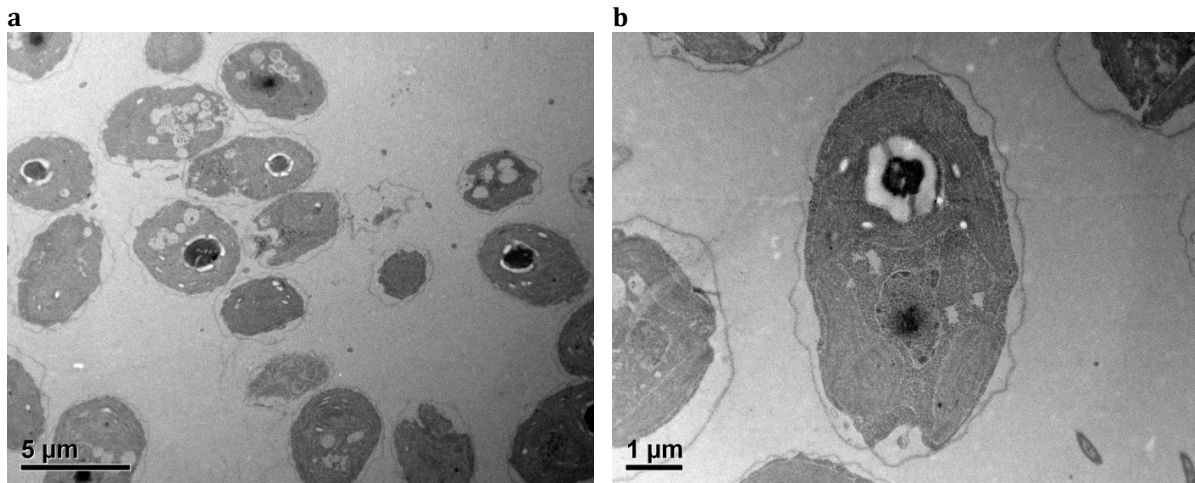


Abb. 88) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. reinhardtii* nach 72-stündiger Exposition gegenüber Ag-NH₂ in einer Konzentration von 243 ng Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

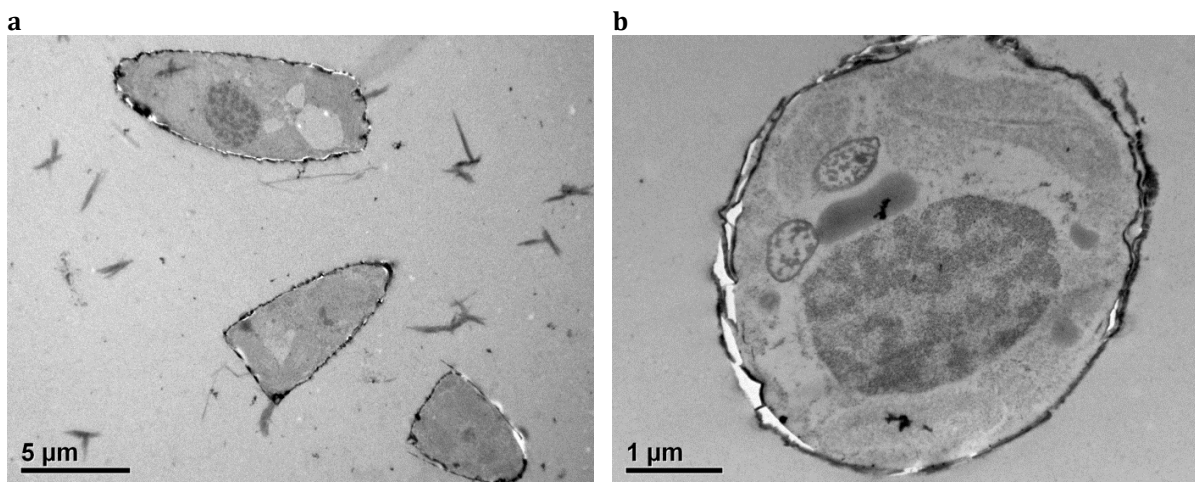


Abb. 89) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. meneghiniana* nach 120-stündiger Exposition gegenüber Ag-NH₂ in einer Konzentration von 3,33 μg Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

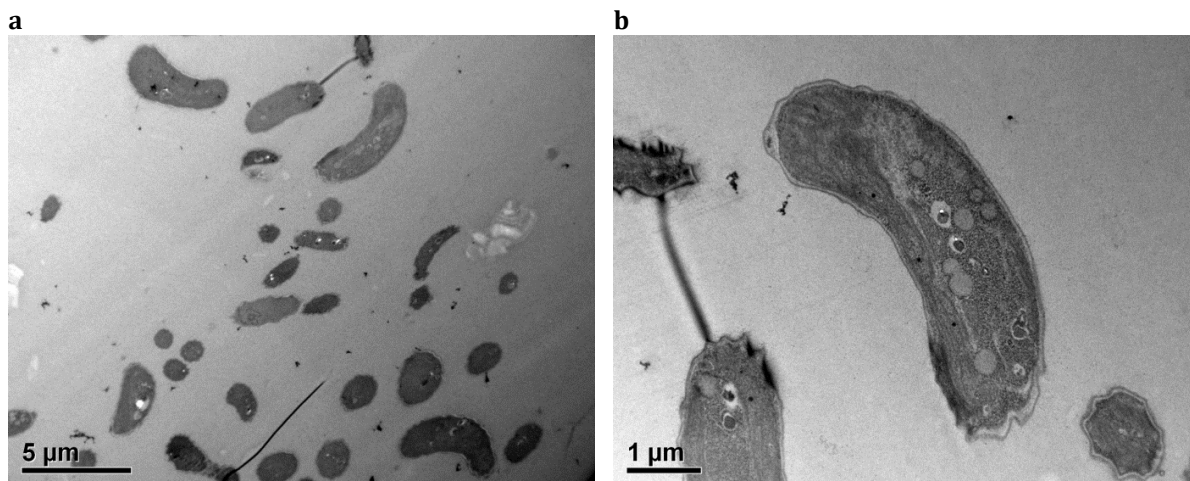
AgNO₃

Abb. 90) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *R. subcapitata* nach 72-stündiger Exposition gegenüber AgNO₃ in einer Konzentration von 27 ng Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

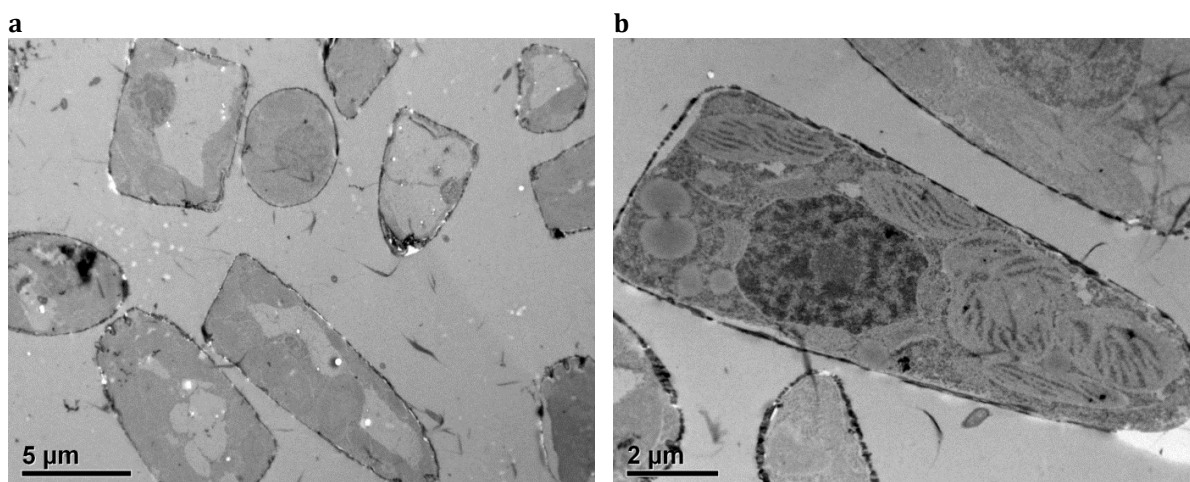


Abb. 91) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. meneghiniana* nach 120-stündiger Exposition gegenüber AgNO₃ in einer Konzentration von 0,12 μg Ag/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

TiO₂-n

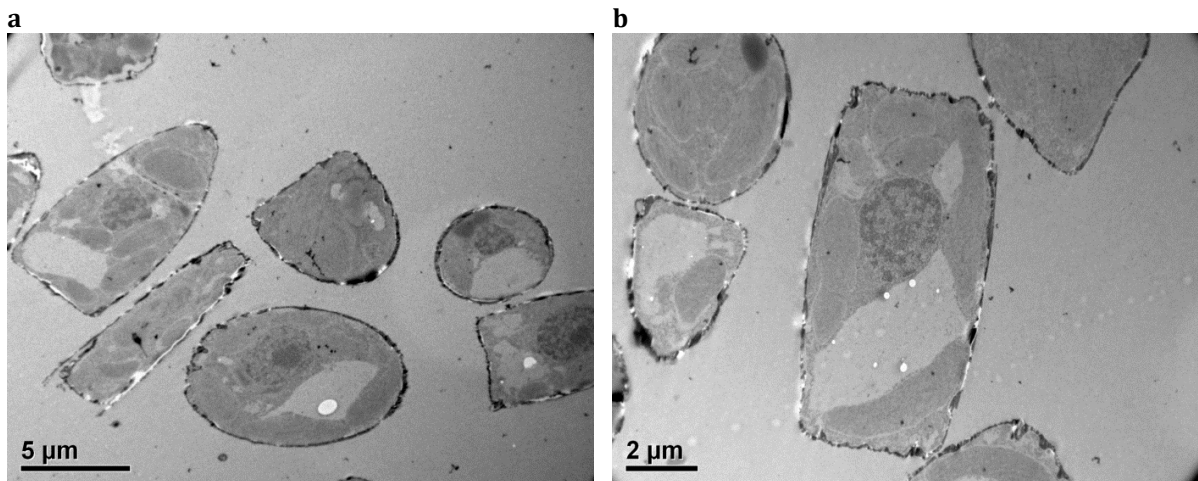


Abb. 92) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. meneghiniana* nach 120-stündiger Exposition gegenüber TiO₂-n in einer Konzentration von 100 µg TiO₂/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

TiO₂-COOH

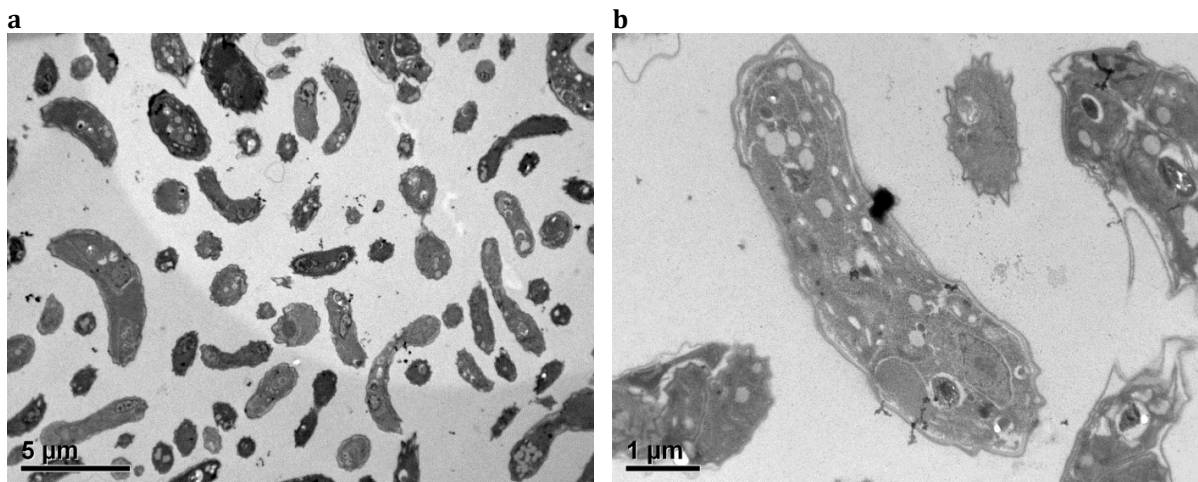


Abb. 93) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *R. subcapitata* nach 72-stündiger Exposition gegenüber TiO₂-COOH in einer Konzentration von 300 µg TiO₂/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

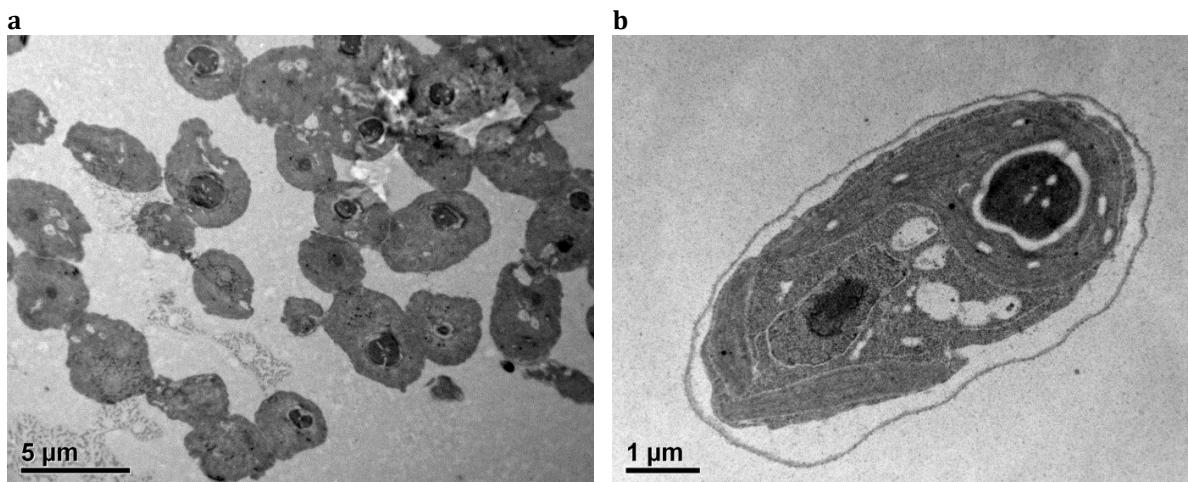


Abb. 94) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. reinhardtii* nach 72-stündiger Exposition gegenüber $\text{TiO}_2\text{-COOH}$ in einer Konzentration von $300 \mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

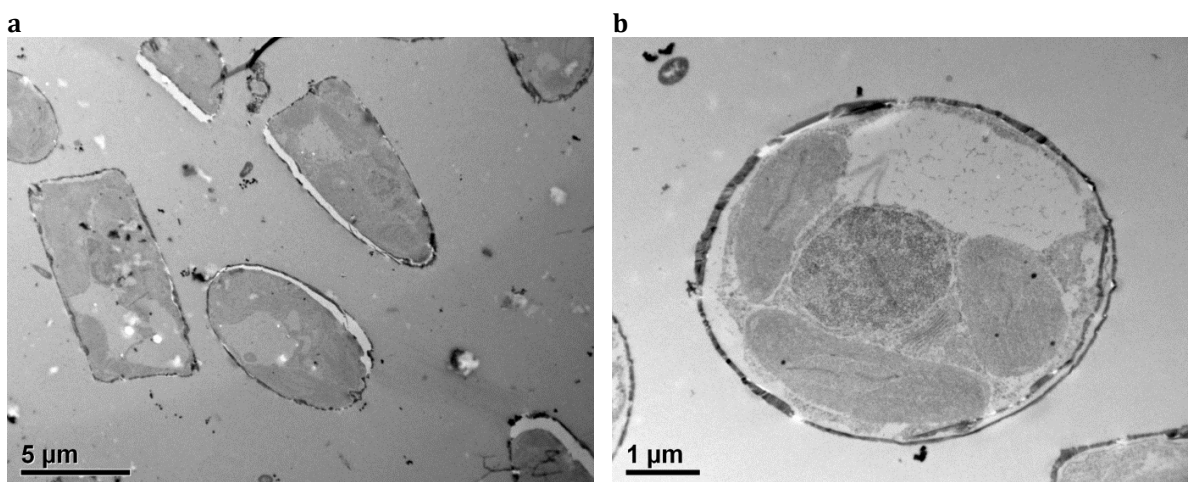


Abb. 95) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. meneghiniana* nach 120-stündiger Exposition gegenüber $\text{TiO}_2\text{-COOH}$ in einer Konzentration von $100 \mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

$\text{TiO}_2\text{-NH}_2$

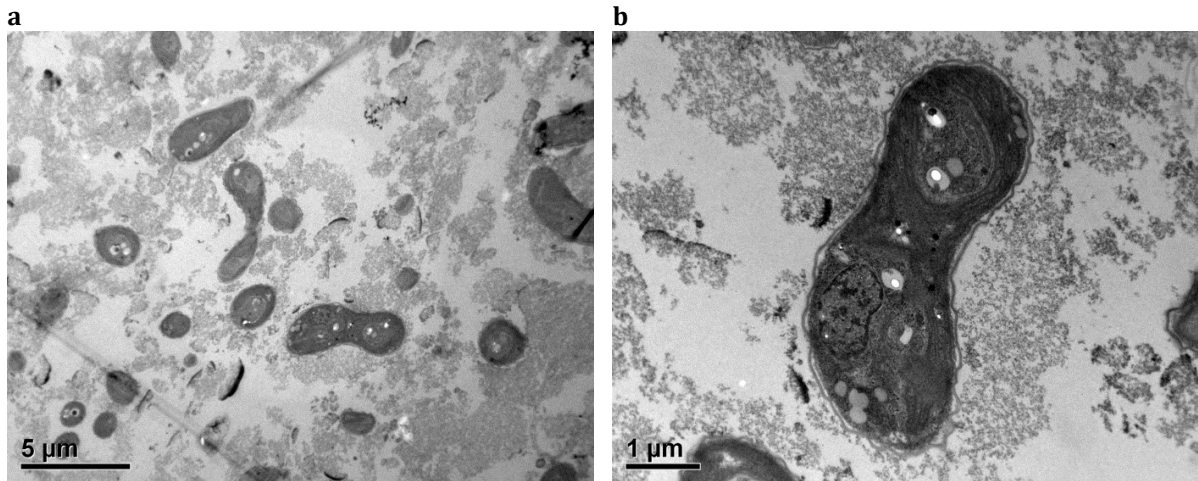


Abb. 96) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *R. subcapitata* nach 72-stündiger Exposition gegenüber $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$ in einer Konzentration von $300 \mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

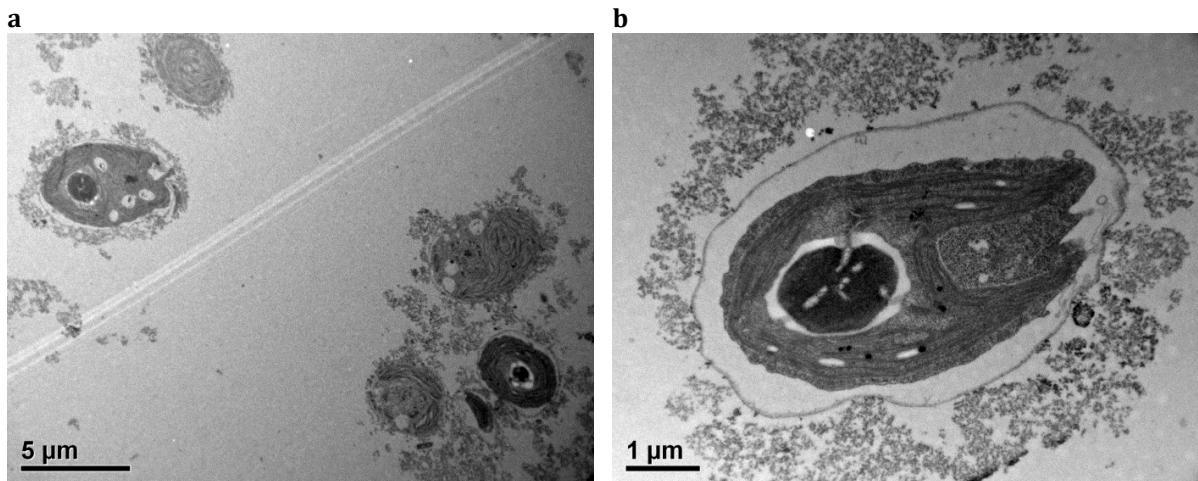


Abb. 97) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. reinhardtii* nach 72-stündiger Exposition gegenüber $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$ in einer Konzentration von $300 \mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

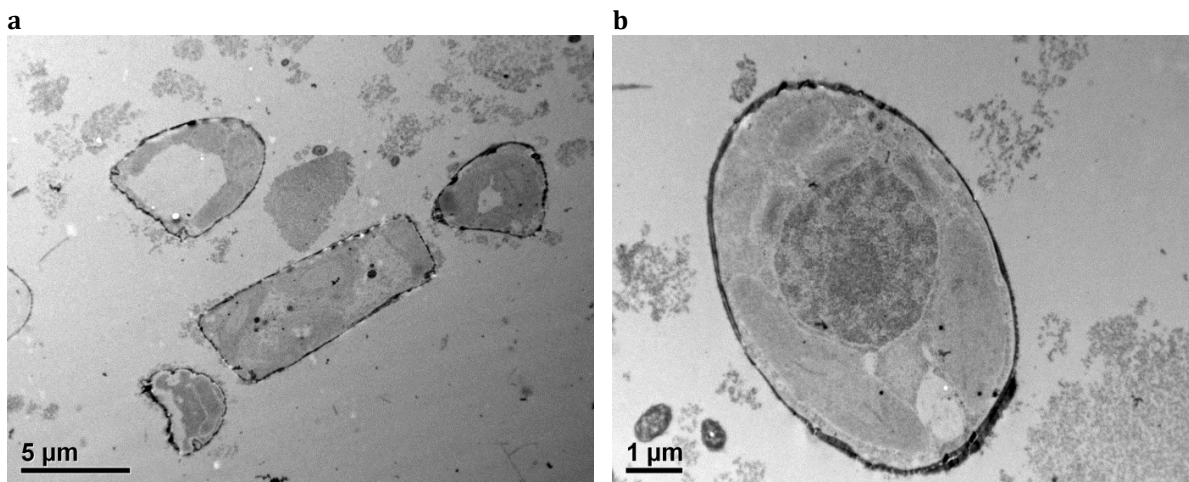


Abb. 98) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. meneghiniana* nach 120-stündiger Exposition gegenüber $\text{TiO}_2\text{-NH}_2$ in einer Konzentration von $100 \mu\text{g TiO}_2/\text{mL}$. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

PS-n

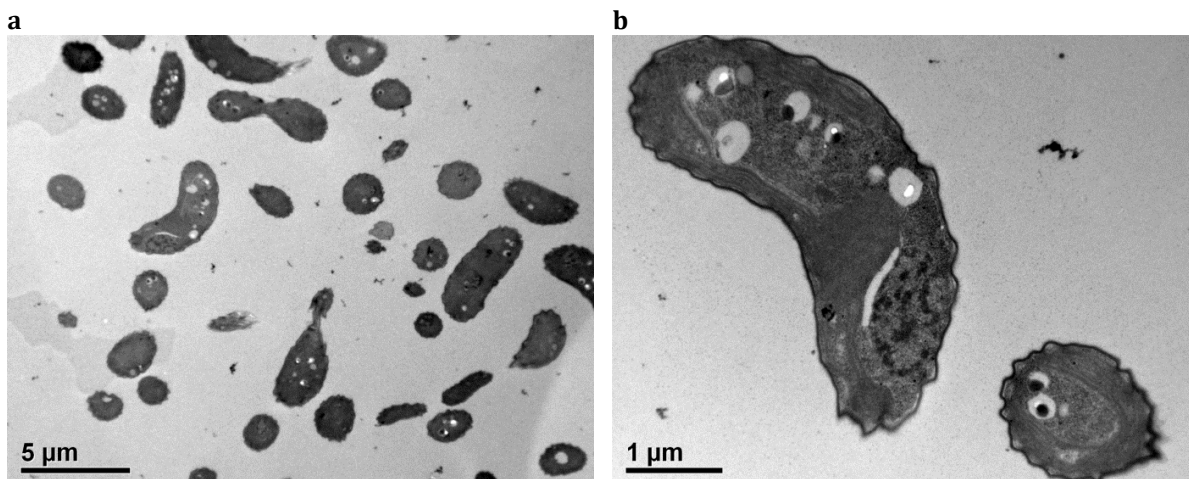


Abb. 99) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *R. subcapitata* nach 72-stündiger Exposition gegenüber PS-n in einer Konzentration von $81 \mu\text{g PS}/\text{mL}$. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

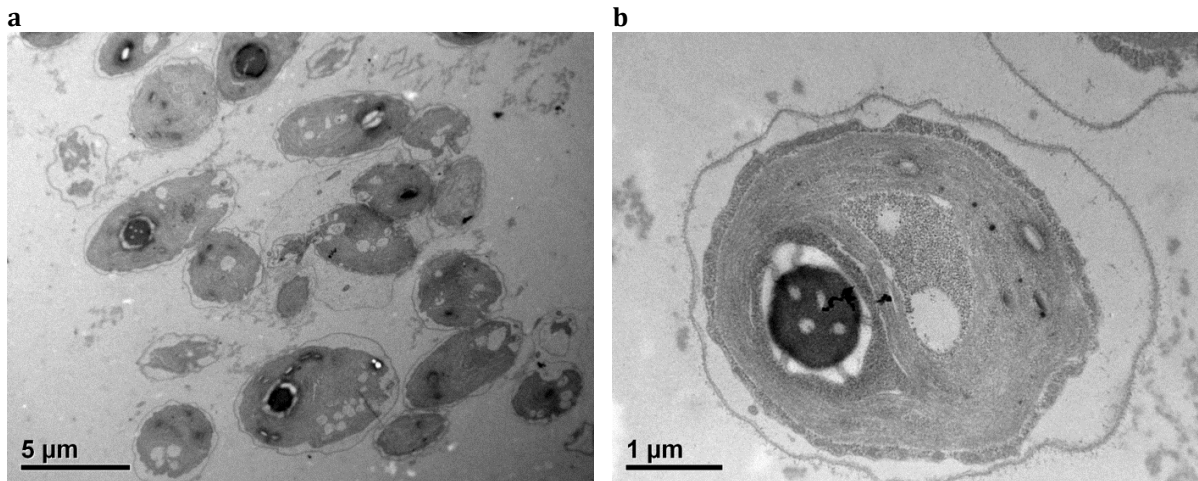


Abb. 100) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. reinhardtii* nach 72-stündiger Exposition gegenüber PS-n in einer Konzentration von 81 μg PS/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

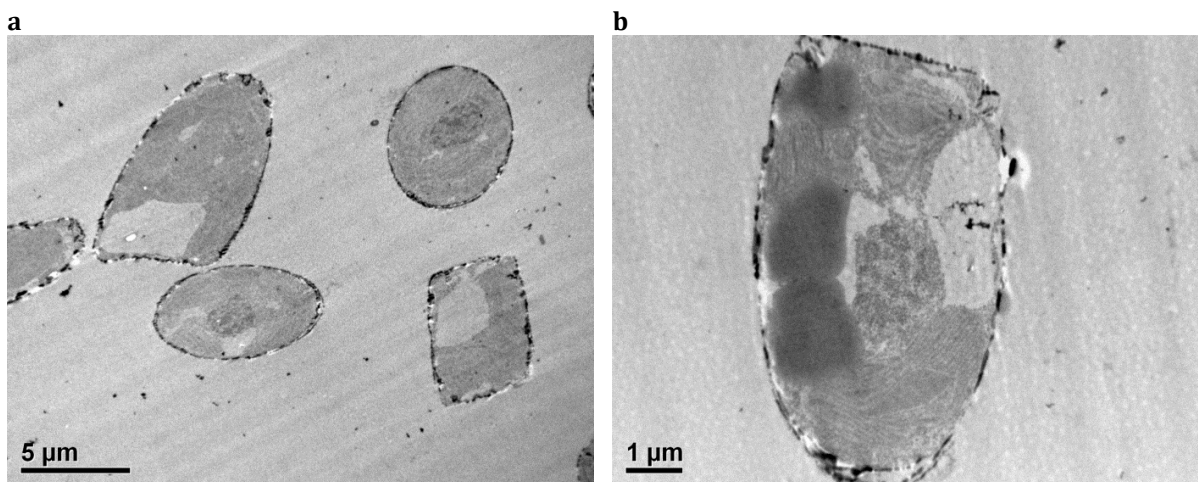


Abb. 101) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. meneghiniana* nach 120-stündiger Exposition gegenüber PS-n in einer Konzentration von 81 μg PS/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

PS-COOH

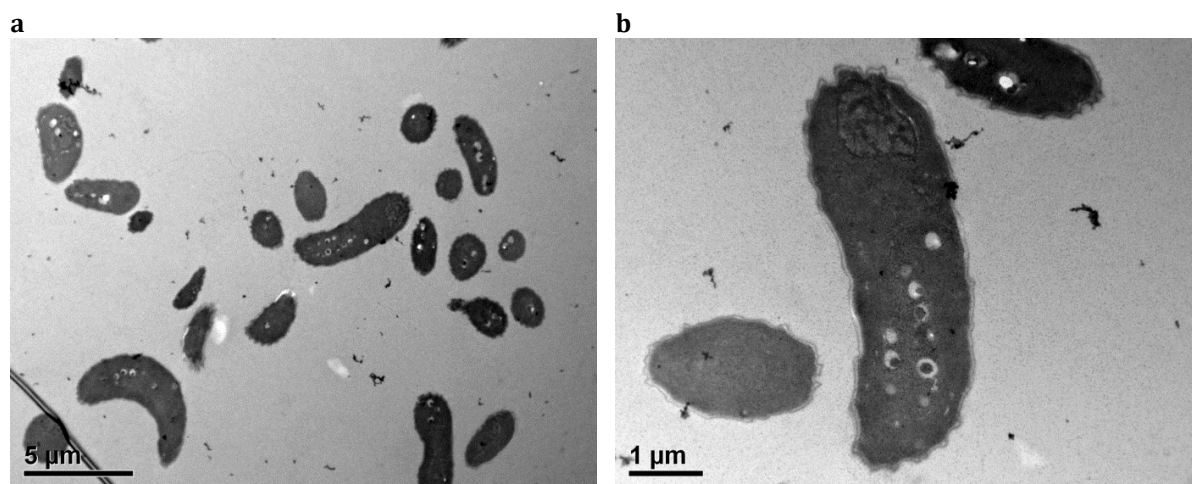


Abb. 102) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *R. subcapitata* nach 72-stündiger Exposition gegenüber PS-COOH in einer Konzentration von 81 μg PS/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

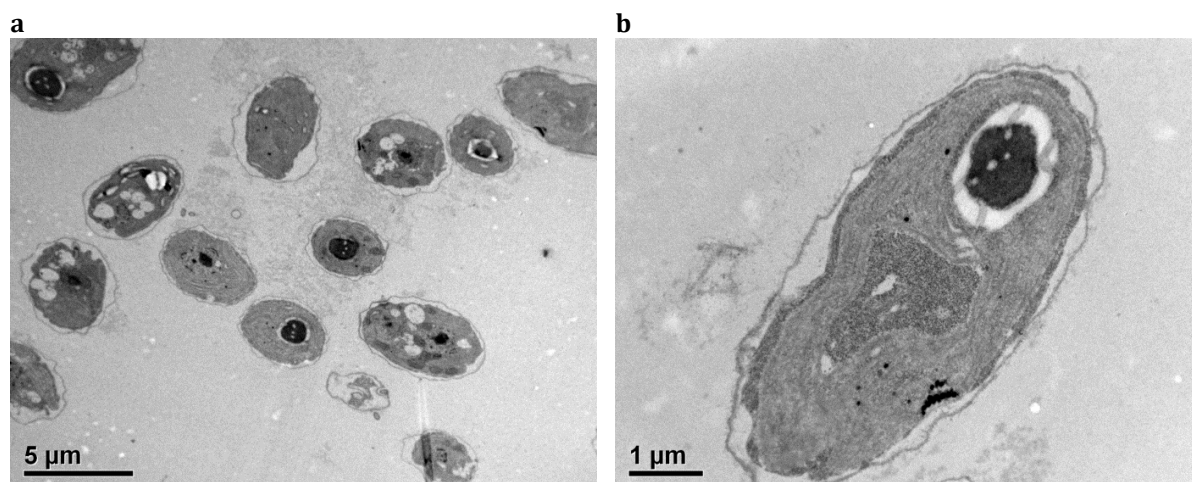


Abb. 103) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. reinhardtii* nach 72-stündiger Exposition gegenüber PS-COOH in einer Konzentration von 81 μg PS/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

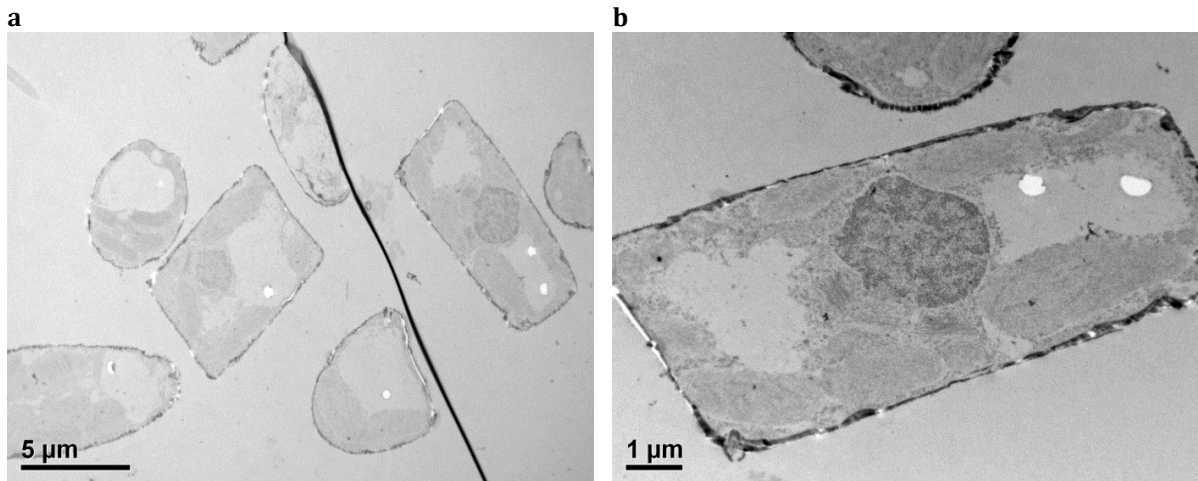


Abb. 104) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. meneghiniana* nach 120-stündiger Exposition gegenüber PS-COOH in einer Konzentration von 81 µg PS/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

PS-NH₂

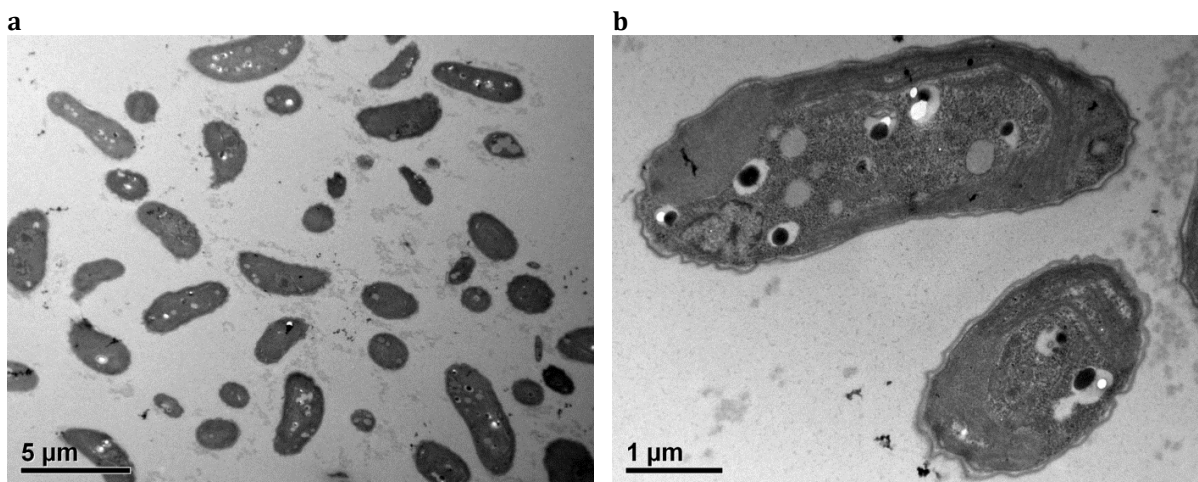


Abb. 105) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *R. subcapitata* nach 72-stündiger Exposition gegenüber PS-NH₂ in einer Konzentration von 81 µg PS/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

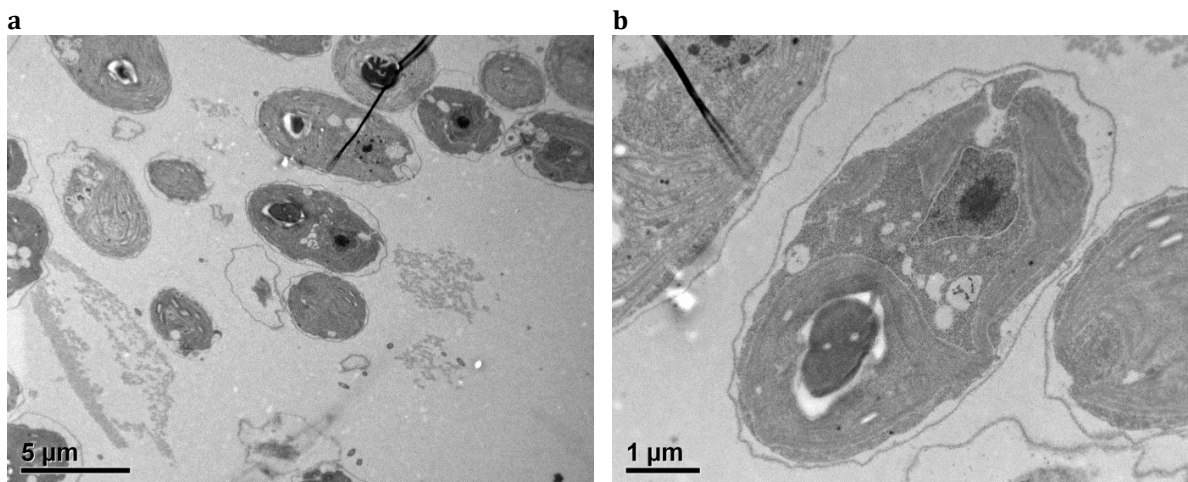


Abb. 106) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. reinhardtii* nach 72-stündiger Exposition gegenüber PS-NH₂ in einer Konzentration von 81 μg PS/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

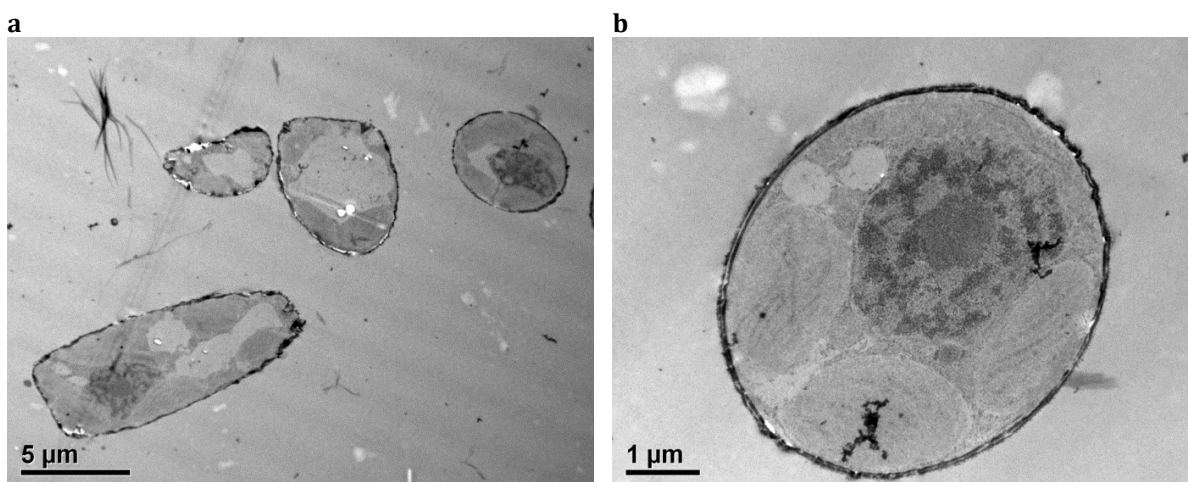


Abb. 107) TEM-Aufnahmen von Schnitten durch Zellen von *C. meneghiniana* nach 120-stündiger Exposition gegenüber PS-NH₂ in einer Konzentration von 81 μg PS/mL. (a) Übersichtsaufnahme mehrerer Zellen, (b) Detailaufnahme einer Einzelzelle.

Absorptionsspektren von PlasmaChem

Ag-NP

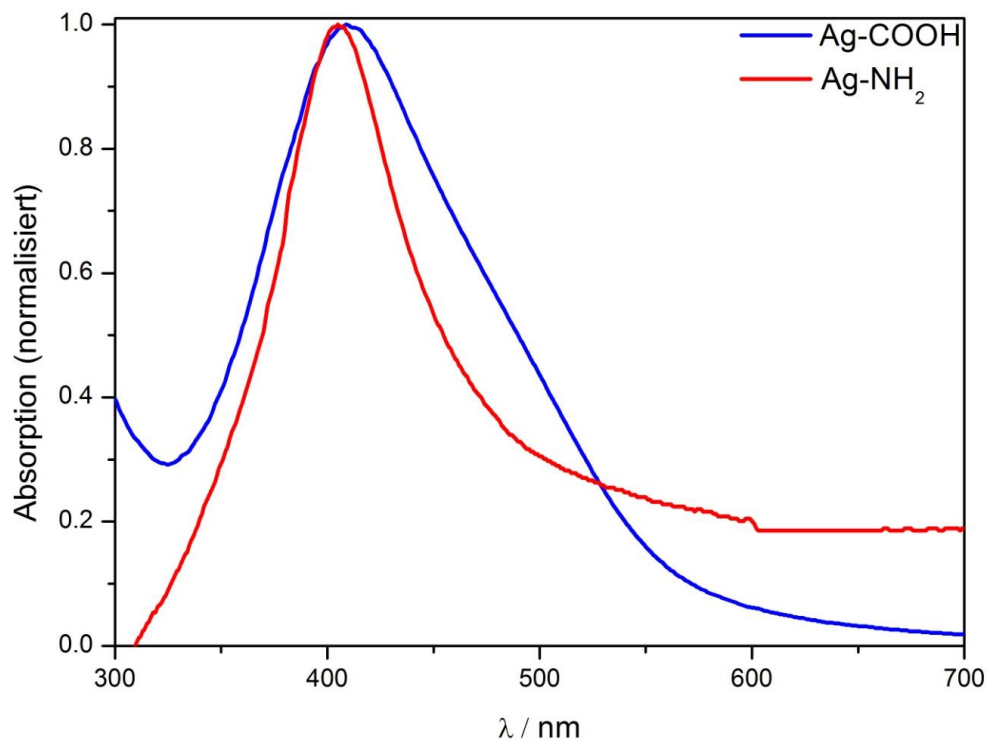


Abb. 108) Absorptionsspektren für Ag-COOH und Ag-NH₂, gemessen durch PlasmaChem.

TiO₂-NP

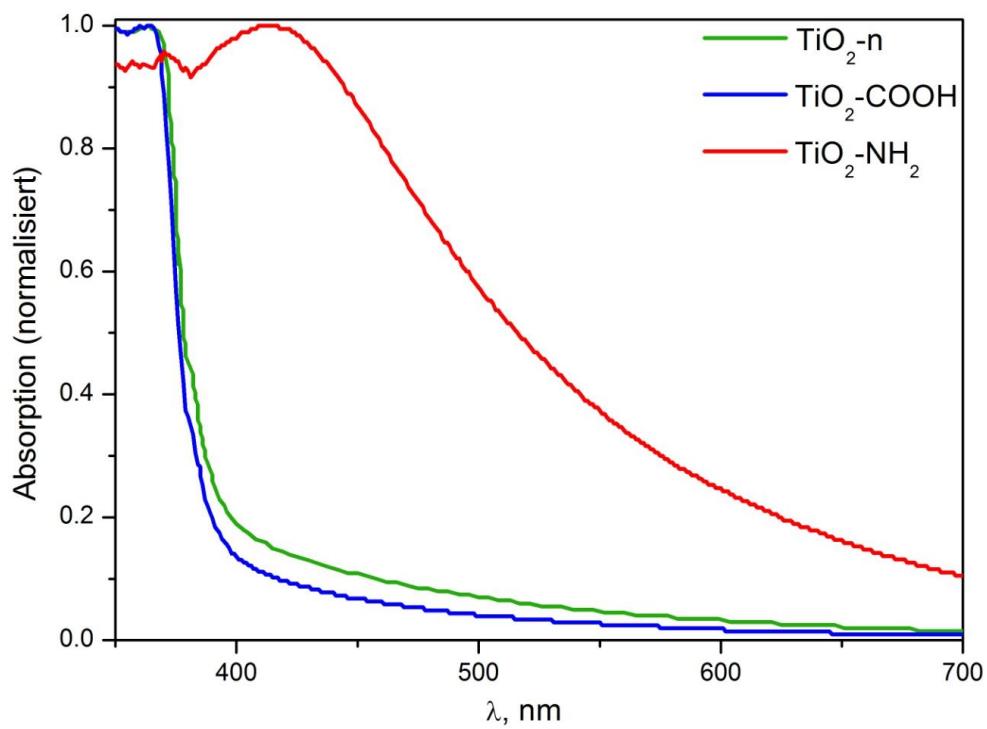


Abb. 109) Absorptionsspektren für TiO₂-n, TiO₂-COOH und TiO₂-NH₂, gemessen durch PlasmaChem.