

**Auswirkungen von  
Silber-Nanopartikeln  
auf die Süßwassermollusken  
*Dreissena polymorpha* und  
*Marisa cornuarietis***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von Henrike Hamer aus Preetz (Holstein)

Datum der Abgabe: Dezember 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Aquatische Ökologie an der Biologischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Sures

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Oehlmann

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Angela Sandmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.4.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>II</b>	<b>Methoden</b>	<b>12</b>
<b>1</b>	<b>Silber-Analytik</b>	<b>14</b>
1.1	Mikrowellenaufschluss . . . . .	14
1.2	Detektion . . . . .	14
1.3	Validierung . . . . .	15
<b>2</b>	<b>Untersuchungen zur Stabilität der Silber-Nanopartikel</b>	<b>16</b>
2.1	Einfluss von Luft . . . . .	16
2.2	Verhalten im Expositionsmedium . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Expositionsversuche mit <i>Dreissena polymorpha</i></b>	<b>18</b>
3.1	Testorganismus . . . . .	18
3.2	Exposition der Muscheln . . . . .	19
3.2.1	Herkunft der Versuchstiere . . . . .	19
3.2.2	Durchführung des Expositionsversuchs . . . . .	20
3.2.3	Sektion und Probenvorbereitung . . . . .	22
3.2.4	Zellfraktionierung . . . . .	25
3.2.5	Analyse verschiedener Biomarker . . . . .	27
3.2.5.1	Fitness-Index . . . . .	27
3.2.5.2	Proteingehalt-Bestimmung . . . . .	27
3.2.5.3	Hitzeschockprotein-Konzentration . . . . .	27
3.2.5.4	Glutathion-S-Transferasen-Aktivität . . . . .	29
3.2.5.5	Katalase-Aktivität . . . . .	30
<b>4</b>	<b>Expositionsversuche mit <i>Marisa cornuarietis</i></b>	<b>31</b>
4.1	Testorganismus . . . . .	31
4.2	<i>Marisa</i> Embryo Toxicity Test . . . . .	32
4.2.1	Hälterung der Versuchstiere . . . . .	32
4.2.2	Durchführung . . . . .	32
4.2.2.1	Expositionsmedium . . . . .	32
4.2.3	Toxikologische Endpunkte . . . . .	33
4.2.3.1	Silber-Akkumulation . . . . .	34
4.2.3.2	Mortalität . . . . .	35
4.2.3.3	Entwicklungsdauer . . . . .	35
4.2.3.4	Körpermasse . . . . .	35
4.2.3.5	Herzfrequenz . . . . .	36

<b>5</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>37</b>
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>1</b>	<b>Stabilität des nanopartikulären Silbers</b>	<b>40</b>
1.1	Einfluss von Luft . . . . .	40
1.2	Verhalten im Expositionsmedium . . . . .	44
<b>2</b>	<b><i>Dreissena polymorpha</i></b>	<b>46</b>
2.1	Expositionsmedium . . . . .	46
2.2	Silberaufnahme in <i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	48
2.2.1	Organspezifische Aufnahmekinetik . . . . .	48
2.2.2	Subzelluläre Verteilung . . . . .	50
2.2.3	Biomarkerantworten . . . . .	54
2.2.3.1	Fitness-Index . . . . .	54
2.2.3.2	Hitzeschockproteine . . . . .	55
2.2.3.3	Glutathion-S-Transferasen . . . . .	56
2.2.3.4	Katalase . . . . .	57
<b>3</b>	<b><i>Marisa cornuarietis</i></b>	<b>58</b>
3.1	Expositionsmedium . . . . .	58
3.2	Silberaufnahme in <i>Marisa cornuarietis</i> . . . . .	59
3.3	Embryotoxizität . . . . .	61
3.3.1	Mortalität . . . . .	61
3.3.2	Entwicklungsdauer . . . . .	63
3.3.3	Körpermasse . . . . .	65
3.3.4	Herzfrequenz . . . . .	66
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
<b>1</b>	<b>Stabilität der Silber-Nanopartikel</b>	<b>68</b>
1.1	Einfluss von Luft . . . . .	69
1.2	Verhalten im Medium . . . . .	71
<b>2</b>	<b>Silberaufnahme in den Testorganismen</b>	<b>73</b>
2.1	<i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	73
2.1.1	Anreicherungsvermögen . . . . .	73
2.1.2	Organspezifische Aufnahmekinetik . . . . .	74
2.1.3	Subzelluläre Verteilung . . . . .	77
2.2	<i>Marisa cornuarietis</i> . . . . .	83
<b>3</b>	<b>Auswirkungen in den Testorganismen</b>	<b>86</b>
3.1	<i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	87
3.1.1	Fitness-Index . . . . .	87
3.1.2	Proteotoxizität . . . . .	88
3.1.3	Oxidativer Stress . . . . .	89

3.2	<i>Marisa cornuarietis</i> . . . . .	91
3.2.1	Embryotoxizität . . . . .	91
3.2.2	Abschirmungsfunktion der Eihülle . . . . .	92
4	Ausblick	94
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
	<b>Summary</b>	<b>98</b>
<b>V</b>	<b>Verzeichnisse</b>	<b>100</b>
1	Literatur	100
2	Abbildungen	117
3	Tabellen	119
4	Formeln	120
5	Abkürzungen	121
<b>VI</b>	<b>Anhang</b>	<b>122</b>
1	Chemikalien	122
2	Materialien	129
3	Geräte	131
4	Software	133
5	Zusätzliche Daten	134
	<b>Danksagung</b>	<b>140</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>141</b>
	<b>Erklärungen</b>	<b>142</b>

# I

## Einleitung

### **Werkstoff der Moderne: Silber-Nanopartikel**

Seit mehreren Jahrtausenden ist bekannt, dass Silber (Ag) entkeimend wirkt und sich zur Reinhaltung von Trinkwasser nutzen lässt. In der Neuzeit übertrug man diese Fähigkeit auf chirurgische Werkzeuge (Alexander 2009) und auf die Wundbehandlung in Form von festem Höllenstein bzw. als gelöstes Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ , Cason *et al.* 1966, Klasen 2000). In atomarem Zustand (Ag) ist Silber relativ inert. Erst die Entstehung von  $\text{Ag}^+$ -Ionen in wässrigem Milieu ruft den antibakteriellen Effekt hervor (Edwards-Jones 2009), der auf verschiedenen Mechanismen beruht:  $\text{Ag}^+$  greift die Atmungskette der Zelle an (Bragg & Rainnie 1974), stört Membrantransportprozesse (Schreurs & Rosenberg 1982) und führt durch Interaktion mit Thiolgruppen zur Deaktivierung von Proteinen (Feng *et al.* 2000) – kurz, Silber ist in ionischer Form eines der toxischsten Metalle (Doudoroff & Katz 1953).

Der Begriff „Nano“ (lateinisch: nanus = Zwerg) wurde im materialwissenschaftlichen Bereich erstmals von Taniguchi (1974) verwendet. Definitionsgemäß bezeichnet man Stoffe, die in mindestens einer Dimension  $< 100$  nm sind, als Nanomaterialien (International Organization for Standardization 2008). Nanomaterialien kommen natürlicherweise in der Umwelt vor (Wigginton *et al.* 2007). Inzwischen ist es jedoch technisch möglich, nano-skalige Substanzen für die menschliche Nutzung gezielt in Reinform zu synthetisieren. Im Übergangsbereich zwischen Einzelatom und Kolloid weisen viele Elemente grundlegend neue physiko-chemische Eigenschaften auf (Henglein 1993, Schmid 1992, Varner

*et al.* 2010), die für die Entwicklung neuer Produkte von Interesse sind (Rai *et al.* 2014, Shenashen *et al.* 2014). Künstlich hergestellte Silber-Nanopartikel (npAg, in allen drei Dimensionen  $<100$  nm) zeichnen sich beispielsweise durch ihre hervorragende elektrische Leitfähigkeit aus, die sie für druckbare Elektronik attraktiv machen (Bai *et al.* 2007, Yang *et al.* 2013).

Auch in Form von npAg zeigt Silber bakterizide Wirkung (Marambio-Jones & Hoek, Eric M. V. 2010, Markowska *et al.* 2013) und wird verbreitet für die antibakterielle Ausrüstung von Produkten eingesetzt (Chen & Schluesener 2008, Edwards-Jones 2009, Rai *et al.* 2014). Mehr als 80 % des jährlichen weltweiten npAg-Produktionsvolumens von 500 t npAg sind für antibakterielle Zwecke bestimmt und werden in Farben, Imprägnierungen, Kosmetika, Textilien, Reinigungsmitteln und medizinischen Verbrauchsmaterialien verwendet (Mueller & Nowack 2008, Piccinno *et al.* 2012). Inzwischen sind mehrere Hundert npAg-funktionalisierte Produkte frei auf dem Markt erhältlich (PEN 2014). Die Vorteile von npAg gegenüber  $\text{AgNO}_3$  oder größerskaligem Silber sind, dass es in der Produktmatrix verankerbar ist und über längere Zeit konstante bakterizide Wirkung zeigt (Smetana *et al.* 2008). Weiterhin lässt sich wegen des günstigen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses Material einsparen: Ein Gramm Silber-Nanopartikel (10 nm) weist eine Oberfläche von ca.  $10 \text{ m}^2$  auf (Navarro *et al.* 2008) – 10000-mal mehr als ein kompakter Silberwürfel derselben Masse.

## Ökotoxikologie von Silber-Nanopartikeln

Nicht nur beim Herstellungsprozess, sondern auch während der Benutzung des funktionalisierten Produkts und spätestens bei dessen Entsorgung wird npAg in die Umwelt freigesetzt (Benn & Westerhoff 2008, Mueller & Nowack 2008). Obgleich in Kläranlagen ein Großteil des eingetragenen npAg aus dem Schmutzwasser beseitigt wird (Benn & Westerhoff 2008, Levard *et al.* 2012), kann es in Oberflächengewässern und insbesondere im Kläranlagen-Ausflussbereich ökotoxikologisch relevante Konzentrationen erreichen (Gottschalk *et al.* 2009, O'Brien & Cummins 2010). Darüber hinaus wird vermutet, dass Kläranlagen sogar als Quelle von npAg fungieren (in Form von Silbersulfid =  $\text{Ag}_2\text{S}$ , Kim *et al.* 2010, Nowack 2010). Aquatische Ökosysteme sind somit für den Eintrag von npAg besonders gefährdet.

npAg wird als „extrem toxisch“ eingestuft (Kahru & Dubourguier 2010). Aquatische Organismen reagieren sogar noch empfindlicher auf npAg als die eigentlichen Zielorganismen, die Bakterien (Bondarenko *et al.* 2013). Während der Nanotechnologie-Markt kontinuierlich wächst (Walters *et al.* 2014), hält die Anzahl ökotoxikologisch ausgerichteter Forschungsaktivitäten mit den anwendungsbezogenen Publikationen nicht Schritt (Forster *et al.* 2012, Kahru & Dubourguier 2010, Paschen *et al.* 2004), sodass weiterhin Forschungsbedarf zu potenziellen Gefahren von npAg besteht (Hansen *et al.* 2008, Reidy *et al.* 2013, Walters *et al.* 2014). Der genaue Wirkungsmechanismus von npAg ist noch nicht verstanden (Kim *et al.* 2007, McShan *et al.* 2014, Morones *et al.* 2005), allerdings wurde die Einwirkung molekularen Sauerstoffs (O<sub>2</sub>) als Ursache der Lösung in Ag<sup>+</sup>-Ionen und der daraus resultierenden Toxizität von npAg identifiziert (Choi & Hu 2008, Lok *et al.* 2007, Loza *et al.* 2014, Xiu *et al.* 2012).

### **Silber-Nanopartikel in aquatischen Mollusken**

Muscheln sind aufgrund ihrer filtrierenden Lebensweise dafür prädestiniert, in Kontakt mit suspendierten Nanopartikeln zu geraten (Baker *et al.* 2014, Baun *et al.* 2008, Griffitt *et al.* 2008, Moore 2006, Tedesco *et al.* 2010) und sollten in nano-ökotoxikologischen Untersuchungen besonders berücksichtigt werden. Die komplexe Rolle von Muscheln im aquatischen Nahrungsnetz reicht neben der Verknüpfung des Pelagials und Benthals (Gergs *et al.* 2009) sogar über die Grenzen des Gewässers hinaus, indem sie Wasservögeln als Nahrung dienen können (Custer & Custer 1996, van Nes *et al.* 2008). Mesokosmos-Experimente haben gezeigt, dass Muscheln eine wichtige biologische Senke für applizierte Nanomaterialien darstellen (Ferry *et al.* 2009). Ein Verständnis der Reaktion von Muscheln auf npAg wäre somit von übergeordneter Bedeutung, doch bislang liegen lediglich zu vier Muschelspezies, darunter drei marine, Ergebnisse zu Auswirkungen von npAg vor. Die Miesmuschel (*Mytilus edulis*) reagiert auf npAg mit Abnormalitäten der Schalenbildung (Zuykov *et al.* 2011). In der Großen Pfeffermuschel (*Scrobicularia plana*) wirkt sich npAg negativ auf die Filtrationsleistung aus und moduliert die Aktivität der anti-oxidativ wirkenden Enzyme Glutathion-S-Transferase und Katalase (Buffet *et al.* 2013, 2014). In der Amerikanischen Auster (*Crassostrea virginica*) werden durch npAg anti-oxidative Abwehrmechanismen induziert und eine Erhöhung der gesamten Proteinmenge hervorgerufen (McCarthy *et al.* 2013). Auch in der Süßwassermuschel *Elliptio*



*complanata* wurden durch oxidative Prozesse hervorgerufene Schäden und davor schützende Enzymaktivitäten nachgewiesen (Gagné *et al.* 2013). Zur Dreikantmuschel *Dreissena polymorpha*, die sich als Biomonitoring-Organismus etabliert hat (Blackwell *et al.* 2013, Palos Ladeiro *et al.* 2014, Sluyts *et al.* 1996, Yeager-Armstead & Yeager 2007), gibt es im Zusammenhang mit npAg noch keine Studien. Allerdings ist von  $\text{Ag}^+$  bekannt, in *D. polymorpha* zu akkumulieren, zu histologischen Veränderungen und letztlich zum Tod zu führen (Berthet *et al.* 1992, Roditi *et al.* 2000, Zimmermann *et al.* 2002).

Neben Muscheln sind für Expositionstests mit Metallen auch aquatische Schnecken wegen ihrer großen Empfindlichkeit gut geeignet (Ali *et al.* 2014, Schirling *et al.* 2006).  $\text{Ag}^+$  ist im Vergleich zu anderen Metallen besonders schädlich für Süßwasserschnecken (Khangarot & Ray 1988). npAg vermindert in limnischen Schnecken die Reproduktionstätigkeit (Völker *et al.* 2014), führt zu Verhaltensänderungen (Bernot & Brandenburg 2013, Justice & Bernot 2014), zu oxidativem Stress, DNA-Schädigungen und zu erhöhter Sterblichkeit (Ali *et al.* 2014, Bernot & Brandenburg 2013).

Von ökologischer Tragweite sind zudem die Akkumulationsfähigkeit von npAg über die Nahrung (Croteau *et al.* 2011, 2014, Oliver *et al.* 2014) und Überlegungen, npAg im Freiland als Molluskizid gegen Süßwasserschnecken einzusetzen (Guang *et al.* 2013). Die aufgeführten Untersuchungen berücksichtigen keine Embryonalstadien, obwohl diese in der Regel empfindlicher auf Metalle reagieren als adulte Schnecken oder als Embryonen anderer Arten (Gomot 1998, Liu *et al.* 2013, Osterauer *et al.* 2009, Sawasdee & Köhler 2009). Die Eignung von Embryonen der im Süßwasser lebenden Paradiesschnecke *Marisa cornuarietis* als Testorganismus wurde mehrfach gezeigt (Oehlmann *et al.* 2000, Osterauer *et al.* 2009, Sawasdee & Köhler 2009, 2010, Schulte-Oehlmann *et al.* 2000) und ein entsprechendes Testprotokoll etabliert (Schirling *et al.* 2006). Von acht Metallen ist bekannt, die Embryonalentwicklung von *M. cornuarietis* zu beeinflussen (Osterauer *et al.* 2009, Sawasdee & Köhler 2009, 2010, Schirling *et al.* 2006). npAg- oder  $\text{Ag}^+$ -Expositionen wurden an *M. cornuarietis* allerdings noch nicht durchgeführt.

## Untersuchungen dieser Arbeit

Sauerstoff (O<sub>2</sub>) bewirkt die Lösung von npAg in Ag<sup>+</sup>, wodurch die Toxizität des npAg wesentlich erhöht wird (Choi & Hu 2008, Kittler *et al.* 2010, Loza *et al.* 2014). Daher wird in einem mehrmonatigen Alterungsversuch das Auslösungsverhalten des npAg in der Stammsuspension durch Lufteinwirkung betrachtet. Zum Verständnis der physiko-chemischen Eigenschaften des verwendeten npAg und seiner Veränderlichkeit unter den Bedingungen der Expositionsversuche wird mittels Mikrofiltration das Auflösungs- und Aggregationsverhalten von npAg im Expositionsmedium untersucht und mit demjenigen von Ag<sup>+</sup> verglichen.

Durch Expositionsversuche mit der Muschel *Dreissena polymorpha* soll die zeitabhängige Aufnahme von npAg mit derjenigen von Ag<sup>+</sup> verglichen werden. Die Sektion des Weichgebewes kann die Nachverfolgung der organspezifischen Anreicherung ermöglichen. Mit Hilfe der Zellfraktionierung nach Wallace *et al.* (2003) wird die subzelluläre Silberverteilung, die Aufschluss über Aufnahme- und Detoxifizierungsmechanismen gibt, in den separierten Organbereichen von *D. polymorpha* untersucht.

Weil der Nachweis akkumulierten Metalls im Gewebe noch keine direkte Aussage zur Toxikodynamik erlaubt (Berthet *et al.* 1992, McGeer *et al.* 2003, Vijver *et al.* 2004), wird die Fitness von *D. polymorpha* mit Hilfe von Biomarkern abgeschätzt. Biomarker zeigen, dass zwischen Organismus und Fremdstoff Interaktionen stattgefunden haben und messen subletale Auswirkungen (Sarkar *et al.* 2006). Die Morphologie des Muschelgewebes verändert sich bei Schadstoffbelastung (Borcherding 1991, Schäfer 2012, Voets *et al.* 2009). Mit einem morphometrischen Fitness-Index (FI) sollen durch npAg- und Ag<sup>+</sup>-Exposition hervorgerufene Veränderungen des Weichgewebes sichtbar gemacht werden. Auf molekularer Ebene wird die Konzentrationsänderung von Hitzeschockproteinen der Molekülmasse 70 kDa (HSP 70) analysiert, weil HSP 70 artübergreifend als unspezifische Anzeiger von Proteotoxizität bekannt sind (Sanders 1993). Exposition gegenüber npAg führt zu oxidativem Stress (Hayes & McLellan 1999). In *D. polymorpha* werden daraufhin Schutzmechanismen in Gang gesetzt, die sich in erhöhter Aktivität bestimmter Enzyme äußern (Buffet *et al.* 2013, 2014, Gagné *et al.* 2013, McCarthy *et al.* 2013, Navarro *et al.* 2011). Glutation-S-Transferase und Katalase sind zwei dieser Enzyme (Burmester *et al.* 2012, Navarro *et al.* 2011, Parolini & Binelli 2014), deren Aktivität in vorliegender Arbeit analysiert wird.

Die npAg- und Ag<sup>+</sup>-Aufnahme der Schnecke *Marisa cornuarietis* während der Embryonalphase wird durch die Bestimmung der Silberkonzentration im Gewebe frisch geschlüpfter Embryonen untersucht. Auf Metall-Exposition können *M. cornuarietis*-Embryonen mit Störungen in ihrer Entwicklung reagieren (Osterauer *et al.* 2009, Sawasdee & Köhler 2010, Schirling *et al.* 2006). Zur Abschätzung der durch npAg- und Ag<sup>+</sup>-Exposition hervorgerufenen toxischen Effekte in den Embryonen wird nach dem Protokoll des *Marisa* Embryo Toxicity Tests (Schirling *et al.* 2006) der Einfluss der beiden Silberspezies auf die Mortalität, die Entwicklungsdauer, die Körpermasse zum Zeitpunkt des Schlupfes und die Herzfrequenz untersucht.

### **Ziel der Arbeit**

Ein Augenmerk dieser Dissertation soll auf den Charakteristika der verwendeten Nanopartikel liegen, von deren Stabilität die Toxizität wesentlich abhängt. Zum Einen wird der Einfluss von Luft auf die Freisetzung von Ag<sup>+</sup> aus npAg in der Stammsuspension überprüft. Zum Anderen wird unter möglichst versuchsnahen Bedingungen die Auflösung und Aggregation von npAg im Expositionsmedium charakterisiert.

Des Weiteren wird untersucht, in welchem Ausmaß npAg im Vergleich zu Ag<sup>+</sup> von der Süßwassermuschel *Dreissena polymorpha* und Embryonen der Süßwasserschnecke *Marisa cornuarietis* aufgenommen wird. In *D. polymorpha* sollen durch die Betrachtung der organspezifischen Akkumulationskinetik Hinweise auf Eintrittswege in die Muschel gewonnen und Organbereiche identifiziert werden, die bei toxischer Belastung besonders gefährdet sein könnten. Die Untersuchung der subzellulären Silberverteilung in *D. polymorpha* soll weitere Erkenntnisse zu Aufnahmewegen und Detoxifizierungsprozessen liefern.

Mit der Bestimmung morphometrischer und molekularer Biomarker wird gleichzeitig eine quantitative und qualitative Abschätzung des durch die npAg-Aufnahme hervorgerufenen Stresses vorgenommen. An der Schnecke *Marisa cornuarietis* wird untersucht, in wieweit npAg imstande ist, während der Embryonalphase Schädigungen hervorzurufen.

# II

## Methoden

Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und elektronische Programme sind im Anhang (s. VI ab S. 122) in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gliedern sich in Experimente zum Verhalten des nanopartikulären Silbers (npAg) nach Luftkontakt und im Expositionsmedium (II.2, S. 16) und in Silber-Expositionsversuche mit den Testorganismen *Dreissena polymorpha* (II.3, S. 18) und *Marisa cornuarietis* (II.4, S. 31). In diesen beiden Mollusken wurde jeweils die Aufnahme von npAg mit der Aufnahme von gelöstem Silber ( $\text{Ag}^+$ ) verglichen. Darüber hinaus wurden in den Tieren die durch die Silber-Exposition hervorgerufenen Biomarker-Antworten analysiert. Eine Übersicht der durchgeführten Untersuchungen gibt Abb. II.1.1 auf S. 13.

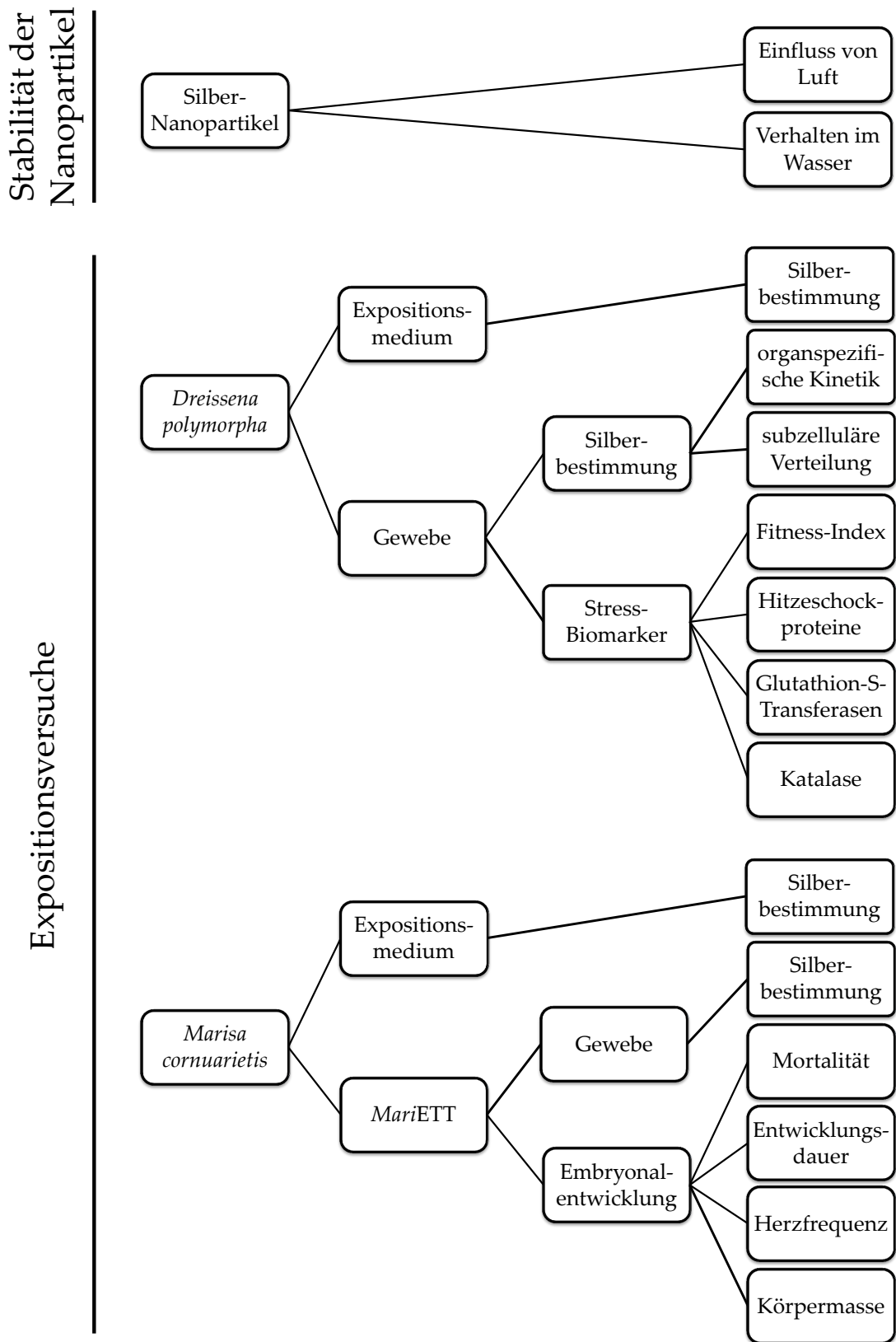


Abbildung II.1.1: Übersicht der Untersuchungen dieser Arbeit.

# 1 Silber-Analytik

Voraussetzung für die Untersuchung der Silberanreicherung war eine valide Silber-Analytik. Die Probenaufbereitung erfolgte durch Mikrowellenaufschluss, die Silber-Detektion mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (AAS).

## 1.1 Mikrowellenaufschluss

Die Gewebe-Einwaagen betragen max. 50 mg (Frisch- oder Trockenmasse) bzw. 1 mL Flüssigkeit. Der Gewebeaufschluss erfolgte nach Zugabe von 1,3 mL 65 %-iger HNO<sub>3</sub>-Lösung und 2,5 mL 30 %-iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gemäß Zimmermann *et al.* (2001) in einer Mikrowelle. Verwendet wurden Teflon<sup>®</sup>-Gefäße. Die Mikrowelle wurde nach dem in Tab. II.1.1 beschriebenen Programm druckgesteuert. Die Aufschlüsse wurden anschließend mit Reinstwasser auf 5 mL aufgefüllt und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle II.1.1: Mikrowellenaufschluss-Programm.

Stufe	1	2	3	4	5
Druck (Bar)	2,48	4,96	5,99	6,95	0,96
Anstiegszeit (min)	10	10	15	25	30
Haltezeit (min)	5	5	7	20	0
Maximale Leistung (W)	300	300	300	300	300

## 1.2 Detektion

Standardreihen einer Konzentrationsspanne von 5-35 µg Ag/L wurden mit wässriger AgNO<sub>3</sub> in 1 %-iger HNO<sub>3</sub>-Lösung angesetzt, sowohl für die Analyse von Gewebeaufschlüssen als auch von Wasserproben. Ein Vergleich mit

matrix-angepassten Kalibrierreihen zeigte keine Unterschiede in der Steigung der Kalibriergeraden.

Die Proben wurden entweder direkt analysiert oder, bei erwarteten Konzentrationen außerhalb des Kalibrierbereichs, zunächst ggf. mit 1 %-iger HNO<sub>3</sub>-Lösung verdünnt. Die Dreifach-Silber-Detektion (3 \* 20 µL) erfolgte bei einer Wellenlänge von 328,1 nm mit einem Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometer mit Zeeman-Untergrundkorrektur. Das Spektrometer wurde nach dem in Tab. II.1.2 beschriebenen Programm betrieben.

**Tabelle II.1.2:** Atomabsorptionsspektrometer-Programm.

Stufe	Trocknung		Pyrolyse	Atomisierung	Reinigung
Temperatur (°C)	110	130	600	1700	2400
Anstiegszeit (s)	1	5	10	0	1
Haltezeit (s)	20	30	20	4	2
Argon-Gasstrom (mL/min)	250	250	250	0	250

### 1.3 Validierung

Die Richtigkeit der AAS-Messungen wurde an Aufschlüssen von ca. 50 mg Referenzmaterial (1566b oyster tissue) überprüft, welche mit einer Analysenwaage eingewogen wurden. Der zertifizierte Silbergehalt betrug  $0,666 \pm 0,009$  mg/kg TM. Nachgewiesen wurde eine Ag-Konzentration von  $0,66 \pm 0,1$  mg/kg TM (n = 52).

Die Blindproben wurden durch Mikrowellenaufschlüsse ohne Zugabe von Probenmaterial gewonnen. Die Nachweisgrenze, d. h. die dreifache SD des arithmetischen Mittelwerts dieser Blindwerte, lag bei  $0,005$  µg/L, die Bestimmungsgrenze (neunfache SD) bei  $0,016$  µg/L (n = 161).

## 2 Untersuchungen zur Stabilität der Silber-Nanopartikel

### 2.1 Einfluss von Luft

Das Auflösungsverhalten der npAg-Stammsuspension wurde an zwei frischen npAg-Stammsuspensionen und drei gealterten npAg-Stammsuspensionen betrachtet. Die „alten“ Suspensionen waren 6 Tage, 3,5 Monate bzw. 8 Monate zuvor synthetisiert worden und seitdem durch mehrfache, jeweils ca. einminütige Öffnung des Gefäßes mit Luft in Kontakt gekommen. Die Häufigkeit und die Gesamtdauer des Luftkontakts war jedoch von keiner der „alten“ Stammsuspensionen bekannt. Mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS, durchgeführt von der AG Prof. Dr. Epple, Universität Duisburg-Essen) wurde die Größenverteilung des npAg untersucht.

Da bei der DLS zwar Informationen zur Größe des partikulär vorliegenden Silbers gewonnen werden können, keine Hinweise jedoch darauf, ob ein Teil des Silbers gelöst vorliegt, wurde durch Mikrofiltration (0,2 µm) die gelöste von der partikulären Fraktion getrennt. Die „neuen“ und zwei der gealterten Stammsuspensionen wurden dazu in einem Glaskolben mit rekonstituiertem Wasser, einer auf deionisiertem Wasser basierenden Salzlösung, wie es in den Expositionsversuchen (II.3, S. 18 und II.4, S. 31) verwendet wurde, auf eine Nominalkonzentration von 100 µg Ag/L verdünnt. Ein Teil dieser Verdünnung wurde filtriert, der andere Teil blieb unfiltriert, sodass sich der Anteil des gelösten Silbers an der Gesamt-Silbermenge berechnen ließ. Die Stabilisierung der Probe durch Ansäuerung (S. 20) erfolgte erst nach der Filtration. Anschließend erfolgte die Silberbestimmung mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS, II.1, S. 14).

Da das Ausmaß des Lufteintrags in die in beschriebener Weise gealterten npAg-Stammsuspensionen nicht genau bekannt war und sie unterschiedlichen Herstel-



lungschargen entstammten, wurde die Untersuchung mit npAg-Stammsuspension-Aliquoten eines einzigen Synthetisierungsvorganges wiederholt. Dreißig Aliquot-Gefäße wurden für ca. 1 min geöffnet, wieder verschlossen und anschließend für bis zu 78 Tage bei 7 °C im Kühlschrank gelagert. Währenddessen sollte dem npAg die Möglichkeit gegeben werden, zeitabhängig durch den bei der Öffnung eingetragenen Sauerstoff  $\text{Ag}^+$  freizusetzen (Lee *et al.* 2012, McShan *et al.* 2014). In Abständen von wenigen Tagen wurde wie oben beschrieben je ein Aliquot in Reinstwasser verdünnt und filtriert. Jedes Aliquot wurde nur ein einziges Mal beprobt, sodass auf diese Weise an 30 verschiedenen Zeitpunkten Proben gewonnen werden konnten, deren Silbergehalt per AAS bestimmt wurde (II.1, S. 14).

## 2.2 Verhalten im Expositionsmedium

Das Verhalten von npAg im Expositionsmedium wurde unter möglichst ähnlichen Bedingungen, wie sie im *D. polymorpha*-Expositionsversuch (II.3, S.18) zu erwarten waren, untersucht. Um einen möglichst ähnlichen Gehalt organischer Substanzen zu simulieren, wurden in zwei Versuchsaquarien zunächst je 265 Muscheln mit einer Schalenlänge von 18–28 mm für drei Wochen in 20 L rekonstituiertem Wasser ohne Futterzugabe gehältert. Einen Tag vor Experimentbeginn wurden die Muscheln entfernt und das verbleibende Wasservolumen mit rekonstituiertem Wasser auf 20 L aufgefüllt. Sodann erfolgte der Versuchstart durch die Zugabe von npAg bzw. im anderen Aquarium mit  $\text{Ag}^+$  in Form wässriger  $\text{AgNO}_3$ -Lösung. Beide Silberspezies wurden mit einer nominellen Konzentration von jeweils 100  $\mu\text{g Ag/L}$  eingesetzt. Die abiotischen Parameter des Versuchsmediums sind im Anhang einzusehen (Tab. VI.5.1, S. 134).

Über zwei Wochen hinweg wurden zu 15 Zeitpunkten unfiltrierte, 8  $\mu\text{m}$ -, 1,2  $\mu\text{m}$ -, 0,45  $\mu\text{m}$ - und 0,2  $\mu\text{m}$ -filtrierte Wasserproben gewonnen, wodurch eine Zuordnung des beprobten Silbers zu den Größenklassen  $> 8 \mu\text{m}$  /  $8\text{--}1,2 \mu\text{m}$  /  $1,2\text{--}0,45 \mu\text{m}$  /  $0,45\text{--}0,2 \mu\text{m}$  und  $< 0,2 \mu\text{m}$  ermöglicht wurde. Die Silberkonzentrationen der Wasserproben wurden nachfolgend mittels AAS bestimmt (II.1, S. 14).

# 3 Expositionsversuche mit *Dreissena polymorpha*

## 3.1 Testorganismus

Die Zebra­muschel *Dreissena polymorpha* (Pallas 1771, Eulamellibranchiata: Dreissenidae), auch Dreikant- oder Wandermuschel genannt, erreicht eine Schalenlänge von ca. 3 cm (Schaefer & Brohmer 2002). Sie besitzt die für Süßwassermuscheln außergewöhnliche Fähigkeit, sich auch im adulten Stadium mit Hilfe von Byssusfäden am Substrat anheften zu können. Ein weiteres besonderes Merkmal ist das pelagische Veligerlarvenstadium (Götting 1974).

Ihr ursprüngliches Verbreitungsgebiet befindet sich im Bereich des Schwarzen und Kaspischen Meeres. Als Neozoon, neugebaute Kanäle und die aufkommende Dampfschiffahrt nutzend, wanderte sie ab dem 17. Jahrhundert nach Mittel- und Osteuropa ein (Kinzelbach 1992, van Martens 1865, Thienemann 1950, S. 658–662). Um 1985 wurde sie vermutlich dank des Larvenstadiums via Ballastwasser aus Europa in die Großen Seen Nordamerikas verschleppt (Herbert & Muncaster 1989). Dort ruft sie bis heute enorme ökologische und wirtschaftliche Schäden hervor (Cox 1999, LePlage 1993). Kurz nach der Einschleppung nach Amerika ist *D. polymorpha* dadurch ganz besonders ins Blickfeld der Ökologen gerückt.

Ihre weite Verbreitung, die leichte Identifizierbarkeit, die sessile Lebensweise der Adulten, das populationsstarke Vorkommen und ihre filtrierende Ernährungsweise machen *D. polymorpha* für ökotoxikologische Studien interessant. Weitere Vorteile sind, auch Laborversuche betreffend, dass sie keine aufwändigen Hälterungstechniken benötigt und durch ihre Größe viel Material für Analysen liefert. Außerdem zählt sie nicht zu den geschützten Arten, deren Beprobung nur

eingeschränkt möglich wäre (Elder & Collins 1991, Yeager-Armstead & Yeager 2007).

Zum *in-situ*-Biomweltmonitoring wird *D. polymorpha* seit den 1990ern zur Überwachung der Gewässerqualität eingesetzt (Borcherding 1992b, Umweltprobenbank des Bundes 2013). Auf kommerzieller Ebene ist das Testsystem MOSELMONITOR<sup>®</sup> zu nennen, mit welchem durch Aufzeichnung der Schalenbewegungen von *D. polymorpha* Gewässerkontaminationen nachverfolgt werden können (Sluyts *et al.* 1996, de Zwart *et al.* 1995). Bei Metall-Expositionskonzentrationen im Labor, die deutlich oberhalb des umweltrelevanten Konzentrationsbereichs liegen, zeigt *D. polymorpha* ein zur Außenkonzentration proportionales Anreicherungsverhalten, was sie für Akkumulationsuntersuchungen qualifiziert (Gundacker 1999, Roditi & Fisher 1999). Außerdem erweist sich *D. polymorpha* im Vergleich mit anderen Muschelspezies als sehr robust gegenüber Silber-Exposition und überlebt eine Expositionskonzentration im Wasser von 400 µg Ag/L mehrere Wochen lang, während auf histologisch-biochemischer Ebene durchaus Effekte nachzuweisen sind (Berthet *et al.* 1992). All diese Eigenschaften machen *D. polymorpha* zu einem geeigneten Versuchorganismus, nicht nur im Freiland, sondern auch im Labor.

## 3.2 Exposition der Muscheln

### 3.2.1 Herkunft der Versuchstiere

Individuen von *D. polymorpha* wurden im September und Oktober in der Stever zwischen dem Hullerner und dem Halterner Stausee gesammelt (51,745° n. B., 7,247° ö. L.). In vorangegangenen Arbeiten der Abteilung Aquatische Ökologie an der Universität Duisburg-Essen wurde gezeigt, dass die Silberkonzentrationen im Gewebe der dort lebenden Muscheln unter der Nachweisgrenze liegen. Hätte eine Vorbelastung der Muscheln mit Silber stattgefunden, hätte bei späteren Expositionsversuchen die Akkumulationsfähigkeit möglicherweise vermindert gewesen sein können (Tania & Wang 2004). Die Wassertemperatur betrug zur Zeit der Entnahme aus dem Freiland 12–15 °C, der pH-Wert 7, die Leitfähigkeit etwa 350 µS/cm. Die Tiere wurden in mit Flusswasser gefüllten Tanks innerhalb von 2 h ins Labor überführt. Ab dann wurden die Muscheln

für vier Monate in 50 L großen Plastikbottichen gehältert, wobei rekonstituiertes Wasser (vgl. S. 126) eingesetzt und regelmäßig erneuert wurde. Die Wassertemperatur betrug 15 °C, das Lichtregime 12 : 12 h. Belüftung wurde durch Druckluft gewährleistet, die mittels Sprudelsteinen ins Wasser gepumpt wurde.

### 3.2.2 Durchführung des Expositionsversuchs

Neben dem Kontrollansatz (nur rekonstituiertes Wasser) wurden Versuchsansätze mit Ag<sup>+</sup> (in Form wässriger AgNO<sub>3</sub>-Lösung), npAg und Polyvinylpyrrolidon (PVP) hergestellt, jeweils mit einer nominellen Konzentration von 100 µg/L (Tab. II.3.1, S. 21). PVP ist ein organisches Polymer, welches als Hüllsubstanz der verwendeten npAg diente. Es verhindert die Agglomeration und Verschmelzung der Silber-Nanopartikel (Wang *et al.* 2005).

Parallel zur regelmäßigen Überprüfung von Temperatur, pH-Wert und Leitfähigkeit (Tab. II.3.1, S. 21) wurden mit einer 60 mL-Plastikspritze Wasserproben entnommen. Die Beprobungszeitpunkte sind Tab. VI.5.2 (S. 134) zu entnehmen. Der Spritzeninhalt wurde zu gleichen Teilen unfiltriert belassen bzw. 8 µm- und 0,45 µm-filtriert. Die je 5–10 mL umfassenden Wasserproben wurden durch Vorlage von 10 µL 65 %-iger HNO<sub>3</sub>-Lösung in den Probengefäßen stabilisiert. Bis zu Silberbestimmung per AAS (II.1, S. 14) wurden die Proben im Dunkeln und bei Raumtemperatur gelagert.

Die Muscheln wurden mit einem Schwamm vorsichtig gesäubert und von Aufwuchs befreit und für 9–12 Tage in rekonstituiertem Wasser in den Versuchsaquarien akklimatisiert. Das Wasser wurde einen Tag vor Experimentbeginn vollständig erneuert. Jedes Versuchsaquarium à 15 L rekonstituiertem Wasser war mit 400–450 Muscheln bestückt, zur Verringerung der Verdunstungsverluste mit einer Plastikscheibe abgedeckt und mit einem an Druckluft angeschlossenen Sprudelstein versehen. Stichprobenartige Messungen des Sauerstoffgehalts ergaben in allen Versuchsansätzen eine O<sub>2</sub>-Sättigung von > 93 % (> 9 mg/L). Die stetige Durchmischung des Wassers sollte zudem ein rasches Sedimentieren der Expositionssubstanzen verhindern und nach Versuchsstart ihre rasche und gleichmäßige Verteilung im Medium ermöglichen. Die Versuchstemperatur betrug 15 °C. In allen Becken betrug die Schalenlänge der Muscheln 18–28 mm, was einem Alter von 2–3 Jahren entspricht (Morton 1969b). Innerhalb dieser Spanne war die Größenverteilung gleichmäßig und zufällig (Tab. II.3.1, S. 21).

**Tabelle II.3.1:** Parameter des *Dreissena polymorpha*-Expositionsversuchs. Nominelle Expositions-konzentration: 100 µg Ag/L. Die Angaben entsprechen Mittelwerten ( $\pm$ SD). Weitere Größen- und Masseangaben zu *D. polymorpha*: Tab. VI.5.3, S. 135.

	Langzeit-Exposition				Kurzzeit-Exposition			
	Kontrolle	PVP	Ag <sup>+</sup>	npAg	Kontrolle	PVP	Ag <sup>+</sup>	npAg
Probenahme-zeitpunkte		Tag 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21				Tag 0, 1 Stunde 1, 3, 6, 12		
Temperatur (°C, n $\geq$ 10)	15,2 (0,6)	15,2 (0,5)	15,1 (0,5)	15,2 (0,4)	14,5 (0,1)	14,7 (0,1)	14,8 (0,1)	14,8 (0,3)
pH, n $\geq$ 10	7,7 (0,1)	7,7 (0,1)	7,7 (0,2)	7,7 (0,1)	7,2 (0,2)	7,3 (0,1)	7,3 (0,1)	7,4 (0,1)
Leitfähigkeit (µS/cm, n $\geq$ 10)	976 (15)	976 (16)	992 (25)	977 (17)	753 (1)	755 (1)	760 (2)	758 (2)
Schalenlänge (cm, n $\geq$ 78)	2,3 (0,3)	2,3 (0,3)	2,3 (0,3)	2,3 (0,3)	2,1 (0,3)	2,1 (0,2)	2,1 (0,3)	2,1 (0,3)

Während des gesamten Versuchs betrug die Mortalität in allen Ansätzen  $< 0,25\%$ . Die Muscheln wurden weder vor noch während der Experimente gefüttert. Hierdurch sollten Modifikationen der Expositionssubstanzen verhindert und die Biomagnifikation (Akkumulation von Stoffen per Nahrungsaufnahme) ausgeschlossen werden. Eine derart lange Zeitspanne ohne Nahrungszufuhr verträgt *D. polymorpha* ohne erwähnenswerte Sterblichkeit (Zimmermann *et al.* 2005). Darüber hinaus birgt eine unpräzise abgestimmte Futtermenge die Gefahr, dass sich der Gesundheitszustand der Muscheln trotz Futterzugabe verschlechtert (Kilgour & Baker 1994).

Zunächst wurde mit den vier genannten Versuchsansätzen eine Langzeit-Exposition mit Beprobungszeitpunkten zwischen einem und 21 Tagen durchgeführt. Die Ag-Konzentration im Gewebe von *D. polymorpha* zeigte sich allerdings ab der ersten Beprobung unverändert. Um Einblick in die Aufnahmekinetik zu gewinnen, wurde das Experiment als Kurzzeitversuch, mit Beprobungsintervallen zwischen 3 h und einem Tag, wiederholt (Tab. II.3.1, S. 21).

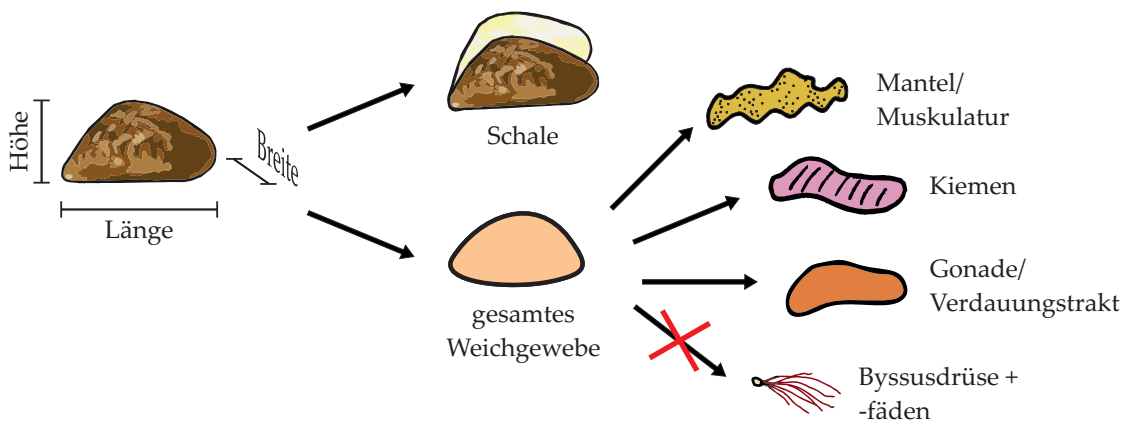
Je Probenahmezeitpunkt wurden aus jedem Versuchsaquarium 60 Individuen entnommen und kurz mit deionisiertem Wasser abgespült. 40 Individuen dieser Probe wurden für die Untersuchung der Aufnahmekinetik vor dem Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zunächst für 24 h in mittels eines Sprudelsteins belüftetem, frischem rekonstituiertem Wasser belassen, um die Entleerung des Darms herbeizuführen. Die übrigen 20 Muscheln wurden für die Zellfraktionierung und die Biomarkeruntersuchungen direkt bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.2.3 Sektion und Probenvorbereitung

Die für die Aufnahmekinetik bestimmten Muschelproben wurden bei  $7^{\circ}\text{C}$  über Nacht aufgetaut. Die für die Zellfraktionierung und die Biomarkeranalysen bestimmten Proben wurden hingegen je nach Muschelgröße für 45 min bis 1,5 h bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde in beiden Gruppen auf Eis gearbeitet. Von außen an den Muscheln haftendes Wasser wurde mit einem Papiertuch entfernt. Mit einer Schieblehre wurden bis auf 0,5 mm genau Schalenlänge, -breite und -höhe vermessen. Anschließend wurde mit einer Analysenwaage die Gesamtmasse erfasst. Mit einem Skalpell wurden die Muscheln geöffnet und das Weichgewebe von der Schale getrennt. Das Weichgewebe wur-

de kurz auf saugfähigem Papier abgetupft und die leere Schale wurde nochmals abgetrocknet, bevor von beidem die Masse erfasst wurde.

In vorliegender Studie gelang es mittels Pinzette, Schere und Skalpell, das Weichgewebe in die Organbereiche Mantel/Muskulatur, die Kiemen und die Gonade samt Verdauungstrakt aufzuteilen (Abb. II.3.1). Die Geschlechtsbestimmung anhand von Gonadenfärbung und -struktur war nur in Einzelfällen zweifelsfrei möglich. Die Byssusdrüse samt anhängender Byssusfäden wurde nach dem Einwiegen verworfen.



**Abbildung II.3.1:** Sektion und morphometrische Messungen an *Dreissena polymorpha*.

Die für die Aufnahmekinetik-Untersuchung bestimmten Proben stellten eine Sammelprobe der jeweiligen Organbereiche aus 40 Muscheln dar. Sie wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren, anschließend für  $> 48$  h gefriergetrocknet und mit einem Mikropistill zerkleinert. Dieses Homogenat wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Für den Mikrowellenaufschluss und die nachfolgende Silberbestimmung per AAS (II.1) wurden mit einer Analysenwaage drei Aliquote à  $50 \pm 10$  mg abgewogen.

Auf Grundlage der Gewebe-Silberkonzentration und der Silberkonzentration im Expositionsmedium wurde der Biokonzentrationsfaktor (BCF) nach Elder & Collins (1991) berechnet. Mit dem BCF lässt sich das Anreicherungspotential eines Stoffes in einem Organismus abschätzen. Ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Innen- und Außenkonzentration vorausgesetzt, werden Innen- (= Muschel) und Außen- (= Expositionsmedium) Konzentration folgendermaßen zueinander in Beziehung gesetzt:

$$\text{Biokonzentrationsfaktor (BCF)} = \frac{\text{Innenkonzentration}}{\text{Außenkonzentration}} \quad (\text{II.3.1})$$

Für die Zellfraktionierung wurden fünf bis acht Individuen seziiert. Die jeweiligen Organbereiche wurden in drei Sammelproben zusammengeführt. Außerdem wurde eine Probe des gesamten Weichgewebes gewonnen, die aus einer Sammelprobe der gesamten Weichgewebe von zwei bis drei Individuen bestand. Die Proben wurden durch mindestens fünf einsekündige Ultraschallimpulse à 70 W homogenisiert, in drei jeweils ca. 100 mg Gewebe umfassende Aliquote aufgeteilt und direkt weiterverarbeitet (II.3.2.4, S. 25).

Für die Biomarkeranalyse wurde aus neun Muscheln je Organbereich eine separate Probe gewonnen, d. h. je Versuchsansatz und Beprobungszeitpunkt 27 Einzelproben. Maximal 150 mg Frischgewebe eines Organbereichs wurden mit fünf einsekündigen Ultraschallstößen à 70 W homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µL Phosphatpuffer, welcher 5 Volumen-% Proteasehemmer enthielt, wurde das Gewebe mit weiteren fünf Ultraschallimpulsen suspendiert. Die Proben wurden anschließend bei 14000 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung (II.3.2.5, S. 27) bei -20 °C gelagert.

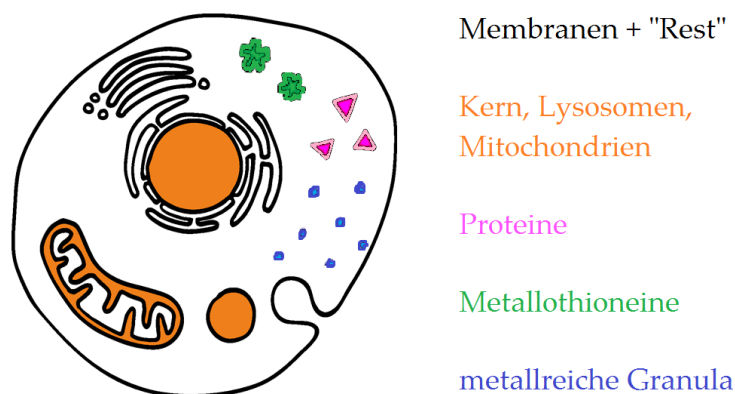


### 3.2.4 Zellfraktionierung

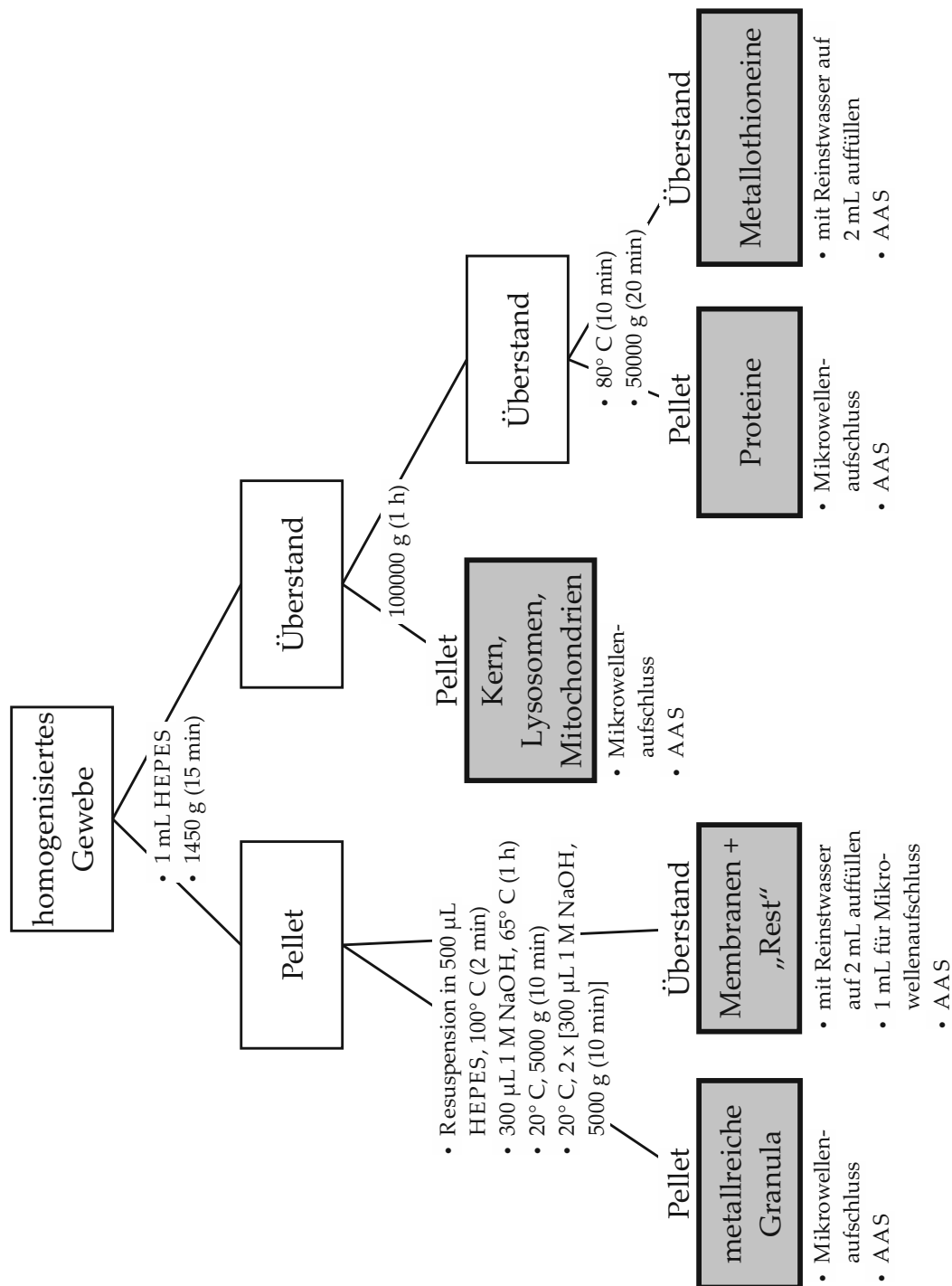
Die Zellfraktionierung nach Wallace *et al.* (2003) ermöglicht durch mehrfache Erhitzung und Zentrifugation die Aufspaltung von Gewebeproben in fünf Zellkompartimente: Membranen + „Rest“, Kern/Lysosomen/Mitochondrien, hitzelabile Proteine, Metallothioneine und metallreiche Granula (Abb. II.3.2).

Die homogenisierten *D. polymorpha*-Gewebeproben-Aliquote wurden dem in Abb. II.3.3 (S. 26) dargestellten Schema gemäß verarbeitet. Sofern nicht anders gekennzeichnet, erfolgten die Arbeitsschritte bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Proben bei -80°C gelagert und vor dem Mikrowellenaufschluss bzw. der Silberbestimmung (II.1) für bis zu 1 h bei Raumtemperatur aufgetaut.

Die als Pellet vorliegenden *D. polymorpha*-Proben (jeweils max. 50 mg FM: metallreiche Granula, Kern/Lysosomen/Mitochondrien, Proteine) wurden mit einem Teil der im Mikrowellenaufschluss verwendeten HNO<sub>3</sub>-Lösung resuspendiert und in die Mikrowellen-Aufschlussgefäße überführt. Jener Zentrifugationsüberstand, der die Membranen + „Rest“-Fraktion enthielt, wurde zunächst mit Reinstwasser auf 2 mL aufgefüllt, um die Probenvolumina zu vereinheitlichen. Sodann wurden hiervon 1 mL abgenommen und ebenfalls in der Mikrowelle aufgeschlossen. Der in dieser Suspension enthaltene organische Anteil belief sich ebenfalls auf max. 50 mg FM. Der die Metallothion-Fraktion enthaltende Zentrifugationsüberstand wurde erst mit Reinstwasser auf 2 mL aufgefüllt und dann nicht in der Mikrowelle aufgeschlossen, sondern direkt per AAS analysiert.



**Abbildung II.3.2:** Schematischer Zellaufbau mit Betonung der durch die Zellfraktionierung nach Wallace *et al.* (2003) unterschiedenen Kompartimente. Nach Alberts *et al.* (1999).



**Abbildung II.3.3:** Zellfraktionierung nach Wallace *et al.* (2003). Sofern nicht anders gekennzeichnet, erfolgten die Arbeitsschritte bei 4 °C.

### 3.2.5 Analyse verschiedener Biomarker

#### 3.2.5.1 Fitness-Index

Zur Ermittlung der Fitness-Indizes wurden die morphometrischen Daten sämtlicher Muscheln eines Beprobungszeitpunktes herangezogen, unabhängig davon, ob sie für die Akkumulations- oder Biomarkeruntersuchungen bestimmt waren. Der Fitness-Index (condition index nach Schäfer 2012) berechnete sich folgendermaßen:

$$\text{Fitness-Index (FI)} = \text{Weichkörpermasse} / \text{Schalenmasse} \quad (\text{II.3.2})$$

#### 3.2.5.2 Proteingehalt-Bestimmung

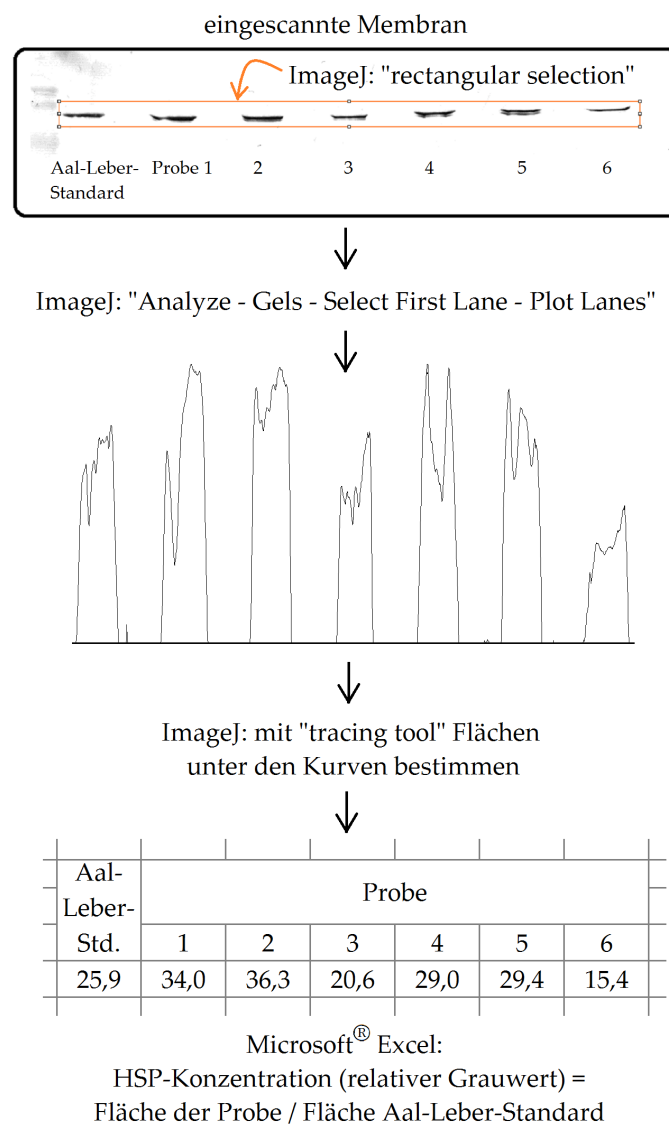
Als Bezugsgröße der Enzymaktivitäten und der Hitzeschockprotein-Konzentration diente der Proteingehalt der Proben, der nach dem Protokoll des Pierce® BCA Protein Assay Kit photometrisch bestimmt wurde. Hierfür wurde eine 96er-Mikrotiterplatte benutzt.

#### 3.2.5.3 Hitzeschockprotein-Konzentration

Hitzeschockproteine (HSP) assistieren bei der Faltung und Reparatur von Proteinen. Wenn äußere Einflüsse zu vermehrten Schäden an Proteinen führen, können HSP in der Zelle in höheren Konzentrationen auftreten als zuvor (Sanders 1993). In dieser Arbeit wurden HSP der Masse 70 kDa (HSP 70) per Gelelektrophorese isoliert, durch Western Blot auf eine Membran transferiert und immunologisch semi-quantitativ nachgewiesen.

Vom bei der Probenvorbereitung gewonnenen Überstand wurden 20 µL 1:1 mit Laemmli-Puffer verdünnt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. In die Taschen des Elektrophorese-Gels wurde eine 10 µg Protein entsprechende Probenmenge pipettiert (max. 16 µL). Als Vergleichsstandard für sämtliche Proben dienten 4 µL einer Aal-Leberprobe. Die mit Elektrodenpuffer befüllte Gelelektrophoresekammer wurde 20 min bei 180 V betrieben. Anschließend wurden die Gele zu recht geschnitten, einige Sekunden in Transferpuffer geschwenkt und für 1,5–2 h

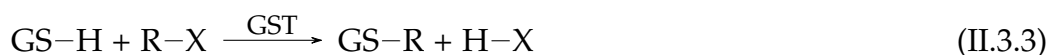
bei ca. 10 V in der Western-Blot-Kammer auf eine Nitrocellulosemembran geblotet, welche zuvor einige Minuten erst in Reinstwasser, dann in Transferpuffer eingeweicht wurde. Die Membranen wurden dann für mindestens 2 h in Absättigungslösung eingelegt und nach einer fünfminütigen Spülung in TBS über Nacht in Primärantikörper-Suspension inkubiert. Nach einer weiteren fünfminütigen Spülung in TBS erfolgte für 1,5–2 h die Inkubation in Sekundärantikörper-Suspension. Die Membranen wurden in TBS gespült und in die Färbelösung überführt. Der Färbevorgang wurde nach etwa 10 min in Reinstwasser beendet. Nach der Trocknung wurden die HSP 70-Banden eingescannt (Bitmap mit Auflösung 600 dpi), in Corel® PHOTO-PAINT™ X6 in ein 8-Bit-Graustufenbild konvertiert und mit dem Programm ImageJ unter Verwendung der Gelanalyse-Funktionen ausgewertet (Abb. II.3.4).



**Abbildung II.3.4:** Auswertung der Hitzeschockprotein-Banden.

### 3.2.5.4 Glutathion-S-Transferasen-Aktivität

Oxidativer Stress stellt durch Peroxidation von Lipiden, Schädigung der DNA und Protein-Inhibition für die Zelle eine erhebliche Gefahr dar. Er kann in der Zelle einerseits durch reaktive Sauerstoff-Spezies wie z. B. Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) hervorgerufen werden, die während normaler Stoffwechselprozesse freigesetzt werden (Winston & Di Giulio 1991). Andererseits können auch elektrophile Xenobiotika und deren toxische Abbauprodukte zu oxidativem Stress führen (Hayes & McLellan 1999). In Muscheln führt Exposition mit  $\text{npAg}$  zu oxidativem Stress. In den Muscheln werden daraufhin verschiedene anti-oxidativ wirkende Enzyme aktiviert (Buffet *et al.* 2013, 2014, Gagné *et al.* 2013, McCarthy *et al.* 2013, Navarro *et al.* 2011). Zu diesen Enzymen gehört die Gruppe der Glutathiontransferasen (GST, Enzyme Commission number 2.5.1.18). Sie katalysieren die Reaktion, in der das nukleophile Molekül Glutathion ( $\text{GS-H}$ ) oxidativ wirksame Moleküle ( $\text{R-X}$ ) mittels Thioetherbildung in unschädliche Glutathion-S-Konjugate ( $\text{GS-R}$ ) überführt (Armstrong 1997, Sies 1989):



Mit der durch GST vermittelten Konjugation des Substrats CDNB mit  $\text{GS-H}$  geht eine Erhöhung der Absorption von Licht bei einer Wellenlänge von 340 nm einher. Diese Absorptionzunahme hängt proportional mit der GST-Aktivität der Probe zusammen. Die Veränderung der Absorption über die Zeit wurde photometrisch bestimmt.

Vom vorbereiteten Zentrifugations-Überstand wurden 4  $\mu\text{L}$  in UV-durchlässiger 96er-Mikrotiterplatte mit 196  $\mu\text{L}$  der GST-Reaktionslösung versetzt. Alle Proben wurden in Triplikaten photometrisch bei 340 nm analysiert. Diese Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Auswertung der GST-Aktivität wurde folgende Formel herangezogen:

$$\frac{U}{\text{mg Protein}} = \frac{\Delta A_{340}}{\varepsilon_{\text{mM}} * V * c_{\text{Probe}}} \quad (\text{II.3.4})$$

$\Delta A_{340}$  = Änderung der Extinktion pro Minute bei 340 nm

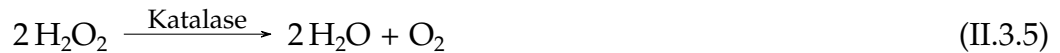
$\varepsilon_{\text{mM}}$  = CDNB-Extinktionskoeffizient = 4,989024

V = Volumen der Probe, 4  $\mu\text{L}$

$c_{\text{Probe}}$  = Proteinkonzentration der Probe

### 3.2.5.5 Katalase-Aktivität

Neben der GST-Aktivität kann auch die Aktivität des Enzyms Katalase in *D. polymorpha* oxidativen Stress anzeigen (Burmester *et al.* 2012, Navarro *et al.* 2011, Parolini & Binelli 2014). Katalase ist imstande, durch die Reaktion



Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu detoxifizieren (Hermel & Ravelmann 1966). In dieser Arbeit wurde der enzymatische Umsatz des Substrats  $\text{H}_2\text{O}_2$  photometrisch über die Zeit nachverfolgt.

Zur Kalibrierung wurde mit Phosphatpuffer eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0–30 mM hergestellt und die Kalibriergerade bestimmt. Vom bei der Probenvorbereitung gewonnenen Zentrifugationsüberstand wurden 4  $\mu\text{L}$  mit 216  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer verdünnt. Unmittelbar vor der Dreifachbestimmung, die in UV-durchlässigen Mikrotiterplatten bei 25 °C stattfand, wurden jeweils 90  $\mu\text{L}$  Substrat, d. h. 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzugegeben. Es folgten nun in 15-sekündigem Abstand zehn photometrische Messungen der Extinktion bei 240 nm. Die Steigung der Extinktion der Proben wurde aus den Extinktionswerten, die nach einer halben Minute ( $E_{240(0,5)}$ ) und viereinhalb Minuten ( $E_{240(4,5)}$ ) gemessen wurden, gebildet. Die Extinktionsänderung ( $\Delta E_{240}$ ) pro Minute berechnete sich in folgender Weise:

$$\Delta E_{240} = \frac{E_{240(4,5)} - E_{240(0,5)}}{4,5 \text{ min} - 0,5 \text{ min}} \quad (\text{II.3.6})$$

Die Katalase-Aktivität (U/mg) Protein wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{U}}{\text{mg Protein}} = \frac{\Delta E_{240} * 1000}{a * V * c_{\text{Probe}}} \quad (\text{II.3.7})$$

$\Delta E_{240}$  = Änderung der Extinktion pro Minute bei 240 nm

Faktor 1000 = Umrechnung von  $\mu\text{g}$  Protein in mg Protein

a = Steigung der Kalibriergeraden  $\frac{\text{Extinktion}}{\text{mM H}_2\text{O}_2} = E/\text{mM}$ , auf alle 10 Extinktionsmesswerte bezogen

V = Volumen der Probe, 4  $\mu\text{L}$

$c_{\text{Probe}}$  = Proteinkonzentration der Probe (vgl. S. 27)

# 4 Expositionsversuche mit *Marisa cornuarietis*

## 4.1 Testorganismus

Die bis zu 5 cm große, ovipare Süßwasserschnecke *Marisa cornuarietis* (Linné 1758, Prosobranchia, Familie Ampullariidae) tritt, wie auch die Muschel *D. polymorpha*, als Neozoon auf. Sie wurde in den 1980er Jahren aus ihrem ursprünglichen Verbreitungsgebiet, der Karibik und Südamerika, zur Eindämmung der parasitären Erkrankung Schistosomiasis nach Afrika eingeführt (Brown 1994). Ihr Vorkommen ist mittlerweile in Europa nachgewiesen (Arias & Torraba-Burrial 2014).

Die Eignung der noch im Ei befindlichen Embryonen als ökotoxikologisches Testsystem ist seit dem Jahr 2000 bekannt (Oehlmann *et al.* 2000, Schulte-Oehlmann *et al.* 2000). Zu ihren besonderen Vorteilen zählt die unkomplizierte Hälterung der adulten Schnecken im Labor und die ganzjährige Laichaktivität. Außerdem werden die Eier wenige Tage nach der Befruchtung transparent (Schirling *et al.* 2006, Abb. II.4.1), was eine Untersuchung der Embryonen erlaubt, ohne in den Versuch eingreifen zu müssen. Aufgrund der Größe der Embryonen, welche zum Schlupfzeitpunkt ca. 1,3 mm beträgt (Demian & You-sif 1973), ist die Beobachtung mit einfachen optischen Methoden möglich. Der *Marisa* Embryo Toxicity Test (*MariETT*), dessen Protokoll in dieser Arbeit in leicht variiertes Form eingesetzt wurde, ist von Schirling



**Abbildung II.4.1:** 14 Tage alter, normal entwickelter *Marisa cornuarietis*-Embryo im Ei. Größe des Embryos ca. 1,3 mm.

*et al.* (2006) entwickelt und seitdem mehrfach erfolgreich zur Toxizitätsabschätzung von Metallen angewendet worden (Osterauer *et al.* 2009, 2011, Sawasdee & Köhler 2009, 2010).

## 4.2 *Marisa* Embryo Toxicity Test

### 4.2.1 Hälterung der Versuchstiere

Adulte *M. cornuarietis*, bezogen aus der Stammkultur der AG Prof. Dr. Heinz-R. Köhler, Universität Tübingen, wurden in 40–250 L großen Glasaquarien bei einer Wassertemperatur von ca. 24 °C gehältert. Es wurde rekonstituiertes Wasser verwendet, welches mindestens einmal pro Woche zu etwa 30 % erneuert wurde. Gefüttert wurde mit TetraMin<sup>®</sup>-Flockenfutter und biologisch angebauten, geschälten Karotten, Gurken, Zucchini und Kohlrabi.

### 4.2.2 Durchführung

#### 4.2.2.1 Expositionsmedium

Als Nullkontrolle diente rekonstituiertes Wasser, eine auf deionisiertem Wasser basierende Salzlösung. Daneben wurden als Kontrollen zu den npAg-Ansätzen analog konzentrierte Ansätze des Hüll-Polymers PVP verwendet. Diese Ansätze wurden aus einer Stammsuspension der Konzentration von ca. 0,1 g PVP/L hergestellt. Als Kontrollen für Ag<sup>+</sup> dienten NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ansätze (Konzentration der Stammlösung: ca. 0,1 g NaNO<sub>3</sub>/L), weil Ag<sup>+</sup> in Form von AgNO<sub>3</sub> eingesetzt wurde (Konzentration der Stammlösung: 50 µg Ag/L). Toxischer Einfluss von Na<sup>+</sup>-Ionen wurde als vernachlässigbar eingeschätzt, da die zugefügte Natriummenge < 3 Gewichts-% der Na<sup>+</sup>-Konzentration des Hälterungswassers ausmachte. Zudem wurden gealtertes („altes“) und frisch synthetisiertes („neues“) npAg verwendet (Konzentrationen der Stammsuspensionen: ca. 0,5 mg/L). Die im *MariETT* eingesetzten nominellen Expositionskonzentrationen sind in Tab. II.4.1 (S. 33) aufgeführt.

Das Expositionsmedium wurde täglich komplett erneuert. Der Wasserwechsel erfolgte mit Hilfe von Plastiksieben, durch welche das Expositionsmedium samt



**Tabelle II.4.1:** Versuchsansätze des *MariETT*.

Nominal- konzentration ( $\mu\text{g/L}$ )		Kon- trolle	PVP	$\text{NO}_3^-$	$\text{Ag}^+$	npAg „alt“* „neu“*	
0		x					
10			x	x	x	x	x
30					x		
50			x	x	x	x	
100						x	
200			x			x	x

\* Vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40)

der darin enthaltenen Eier gegossen wurde. Zum erneuten Ansetzen der Expositionen wurden zunächst wenige mL des rekonstituierten Wassers in die Petrischale gegossen, wo hinein die Expositionssubstanz pipettiert wurde. Anschließend wurden die Eier aus dem Sieb zurück in die Petrischale gegeben, welche dann zur vollständigen Durchmischung des Inhalts zügig mit rekonstituiertem Wasser auf 60 mL aufgefüllt wurde.

Zur Gewährleistung konstanter Versuchsbedingungen wurde der Versuch in einer Klimakammer durchgeführt. Die Versuchstemperatur betrug  $25 \pm 1$  °C, gleichzeitig war ein Hell-Dunkel-Zyklus von 12 : 12 h gegeben. Direkt vor dem Austausch des Expositionsmediums wurden Temperatur, pH-Wert und Leitfähigkeit gemessen (Tab. VI.5.4, S. 136), wobei zunächst teils Sammelproben aus bis zu drei Einzelreplikaten hergestellt wurden. Diese Messungen fanden je nach Exposition insgesamt ein- bis zweimal statt. Ebenfalls stets kurz vor dem Wasserwechsel wurden dem Expositionsmedium in unregelmäßigen Abständen wie unter II.3.2.2 (S. 20) beschrieben unfiltrierte und 0,2  $\mu\text{m}$ -filtrierte Wasserproben entnommen.

### 4.2.3 Toxikologische Endpunkte

Für die Experimente wurden ausschließlich Eier, die innerhalb der vorangegangenen 24 h abgelegt worden waren, verwendet. Je nach Laichaktivität konnten zwischen einem und sieben Gelegen auf einmal entnommen werden. Die in einer Gallertmasse eingeschlossenen Eier wurden mit einer Pinzette aus den Aquarien entfernt, mit einer Schere vereinzelt, unter dem Stereomikroskop auf

Unversehrtheit und normalen Aufbau überprüft und gleichmäßig auf Petrischalen verteilt. Jede Petrischale wurde mit 17–22 Eiern bestückt. Wie im Protokoll des *MariETT* (Schirling *et al.* 2006) vorgesehen, untersuchte auch diese Arbeit die Herzfrequenz am 9. Expositionstag und die Masse der geschlüpften Schnecken. Tentakel- und Augenbildung wurden in vorliegender Arbeit nicht berücksichtigt. Ab dem fünften Expositionstag erfolgte die Sichtkontrolle auf nicht entwickelte oder abgestorbene Individuen, die sodann entfernt wurden. Kriterien für den Tod der Embryonen waren: ausdauernd kugelige Verformung des Embryos (im frühen Stadium), ausfransende Körperkonturen, fehlende Bewegung, kein Herzschlag und fehlende Anhaftung an die Eihülle. Als tot galten ebenso Embryonen, die nicht bis zum 21. Versuchstag schlüpften. Das ursprüngliche Protokoll von Schirling *et al.* (2006) sieht eine Betrachtung der Mortalität und des Schlupferfolgs nur bis Expositionstag 14 vor. Da in Vorversuchen festgestellt wurde, dass unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen selbst in den Kontroll-Ansätzen ein bedeutender Anteil der Embryonen erst nach diesem Zeitpunkt schlüpfte, wurde der Beobachtungszeitraum in dieser Arbeit auf 21 Tage ausgedehnt. Vorversuche mit Beobachtungszeiten bis zu einem Monat zeigten, dass Embryonen, die bis zum 21. Tag nicht geschlüpft, aber trotzdem noch lebendig waren, auch später nicht mehr schlüpften und im Ei abstarben. Die hier angegebene Mortalität und Entwicklungsdauer bezieht sich also auf 21 Expositionstage. Diese Untersuchungen wurden unter dem Stereomikroskop in der Klimakammer durchgeführt. Eier, die Mehrlinge enthielten, wurden entfernt und nicht in die Auswertung aufgenommen.

#### 4.2.3.1 Silber-Akkumulation

Zur Analyse der Silberakkumulation im Gewebe der *M. cornuarietis*-Embryonen wurden frisch geschlüpfte Schnecken innerhalb von 24 h nach dem Schlupf mit einer Federstahlpinzette entnommen und kurz mit Reinstwasser abgespült. Alle geschlüpften Schnecken eines Replikats wurden auch bei unterschiedlichen Schlupfzeitpunkten in einer Probe zusammengefasst, welche bei -20 °C eingefroren wurde. Nach > 48 h Gefriertrocknung wurde die Probe (max. 20 mg) mit Hilfe der zum Mikrowellenaufschluss verwendeten HNO<sub>3</sub>-Lösung vollständig in das Mikrowellengefäß gespült.

#### 4.2.3.2 Mortalität

Da die Sterblichkeit nicht-exponierter Embryonen stark schwankte ( $48\% \pm 37\% \text{ SD}$ ,  $n = 60$ ), wurde die Veränderung der Mortalität in Bezug zur jeweiligen Kontrolle berechnet (= Netto-Mortalität, NM):

$$\text{NM (\%)} = \text{Mortalität}_{\text{Exposition}} - \text{Mortalität}_{\text{Kontrolle}} \quad (\text{II.4.1})$$

Es wurden nur Replikate verwendet, die lückenlos bis zum 21. Expositionstag beobachtet wurden.

#### 4.2.3.3 Entwicklungsdauer

Die Entwicklungsdauer (ED) bezeichnet die Anzahl Tage, die bis zum Zeitpunkt des Schlupfes verstrichen. Sie wurde auf die ED der jeweiligen Kontrolle bezogen und dann als Netto-Entwicklungsdauer (NED) bezeichnet:

$$\text{NED (d)} = \text{ED}_{\text{Exposition}} \text{ (d)} - \text{ED}_{\text{Kontrolle}} \text{ (d)} \quad (\text{II.4.2})$$

Um die Netto-Entwicklungsdauer berechnen zu können, musste die Mortalität des Kontrollansatzes  $< 100\%$  betragen, da sonst keine Entwicklungsdauer für die Kontrolle bestimmt werden konnte. Des Weiteren wurden nur Replikate verwendet, die lückenlos bis zum 21. Tag beobachtet wurden.

#### 4.2.3.4 Körpermasse

Frisch geschlüpfte Embryonen wurden spätestens nach einem Tag mit einer Federstahlpinzette aus der Petrischale entfernt, kurz mit Reinstwasser ab gespült und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Auch bei unterschiedlichen Entwicklungsgeschwindigkeiten der Schnecken wurde aus allen geschlüpfen Individuen eines Replikats eine Sammelprobe angefertigt. Diese Proben wurden gefriergetrocknet und anschließend mit einer Analysenwaage gewogen.

#### 4.2.3.5 Herzfrequenz

Die Messung der Herzfrequenz (HF) wurde am 9. Versuchstag durchgeführt. Hierzu wurde mit Hilfe eines Stereomikroskops bei jeder Schnecke eines Replikats während 20 s die Anzahl der Pulsschläge gezählt. Die Werte aller Schnecken eines Replikats wurden dann gemittelt. Die Herzfrequenz wurde als Netto-Herzfrequenz (NHF) auf die in der dazugehörigen Kontrolle ermittelte Herzfrequenz bezogen:

$$\text{NHF (Schläge/20 s)} = \text{HF}_{\text{Exposition}} - \text{HF}_{\text{Kontrolle}} \quad (\text{II.4.3})$$

## 5 Statistische Auswertung

Für alle Datensätze wurde keine Normalverteilung der Messwerte vorausgesetzt. Somit wurden zur statistischen Analyse ausschließlich nicht-parametrische Tests verwendet. Das Signifikanz-Niveau lag bei  $p = 0,05$  und wurde bei mehrfachen Tests durch Bonferroni-Korrektur angepasst. Datensätze mit mehr als zwei Stichproben wurden zunächst mittels ANOVA getestet. Für abhängige Messwerte wurde Friedman's ANOVA verwendet, für unabhängige Stichproben der Kruskal-Wallis-Test. Wurden hierbei signifikante Unterschiede festgestellt, wurden paarweise Tests durchgeführt: Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test oder Dunn's Post-hoc-Test für abhängige, der Mann-Whitney-U-Test oder wiederum der Dunn's Post-hoc-Test für unabhängige Stichproben.

Prozentual angegebene Daten (Silberverteilung innerhalb der Zellkompartimente von *D. polymorpha*, Mortalität in *M. cornuarietis*) wurden, um eine vergleichbare Skalierung zu erreichen, vor der Analyse Quadratwurzel- und Arcus-Sinus-transformiert.

### **Silberkonzentration in den Zellkompartimenten von *Dreissena polymorpha***

Unterschiede in der Silberkonzentration derselben Zellfraktion desselben Versuchsansatzes und -tages verschiedener Organbereiche (z. B. Lysosomen-Fraktion in Mantel/Muskulatur, Kiemen und Gonade/Verdauungstrakt im npAg-Versuchsansatz an Expositionstag 1) wurden mit Friedman's ANOVA und nachfolgendem Dunn's Post-hoc-Test überprüft .

Innerhalb jedes Organbereichs desselben Versuchsansatzes und -tags wurden Unterschiede in der Silberkonzentration der Zellkompartimente ebenfalls mit Friedman's ANOVA und Dunn's Post-hoc-Test überprüft (z. B. Lysosomen-Fraktion im Vergleich mit der Membranen + „Rest“- und Metallothionein-Fraktion).

Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Expositionstagen wurden jeweils mit Mann-Whitney-U-Tests überprüft. Für die genannten Analysen wurde das Programm GraphPad Prism verwendet.

Die Ergebnisse des gesamten Weichgewebes wurden nicht mit denjenigen der anderen drei Organbereiche verglichen, da die Organbereiche Mantel/Muskulatur, Kiemen und Gonade/Verdauungstrakt untereinander abhängig waren, aber von den Proben des gesamten Weichgewebes unabhängig. Weil die Silberkonzentration im Protein- und metallreichen Granula-Zellkompartiment in einigen Replikaten unterhalb der Nachweisgrenze lag, wurden die Daten dieser Zellkompartimente nicht in die Analyse einbezogen.

### **Biomarkerantworten in *Dreissena polymorpha***

Unterschiede der Enzymaktivität (bzw. der HSP 70-Konzentration) der Organbereiche eines jeden Versuchsansatzes (z. B. Enzymaktivität in Mantel/Muskulatur, Kiemen und Gonade/Verdauungstrakt der Kontrolle an Tag 0) wurden mit Friedman's ANOVA und nachfolgendem Wilcoxon-Test überprüft (Programm STATISTICA).

Unterschiede zwischen den gleichen Organbereichen verschiedener Versuchsansätze (z. B. Enzymaktivität in den Kiemen des Kontroll-, PVP-, Ag<sup>+</sup>- und npAg-Ansatzes an Tag 7) wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und nachfolgenden Mann-Whitney-U-Tests überprüft. Unterschiede zwischen Versuchstag 1 und 7 wurden mit Mann-Whitney-U-Tests überprüft (z. B. Mantel/Muskulatur des npAg-Ansatzes an Tag 1 und 7). Diese Analysen wurden mit dem Programm STATISTICA durchgeführt.

### **Silberkonzentration in den Wasserproben des *MariETT***

Die Silberkonzentration der unfiltrierten Wasserproben eines jeweiligen Versuchsansatzes wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests mit der Konzentration der entsprechenden 0,2 µm-filtrierten Proben verglichen. Hierfür wurde das Programm GraphPad Prism verwendet.

### **Silberaufnahme in *Marisa cornuarietis***

Unterschiede zwischen den Gewebe-Silberkonzentrationen der Expositionsansätze wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn's Post-hoc-Test überprüft (GraphPad Prism).

### **Toxikologische Endpunkte des *MariETT***

Die Unterschiede zwischen den Körpermassen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test überprüft (Programm STATISTICA).

Für die statistische Untersuchung der Ergebnisse zur Netto-Mortalität, Netto-Entwicklungsdauer und Netto-Herzfrequenz wurde das Programm GraphPad Prism verwendet und ebenfalls der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt, mit nachgeschaltetem Dunn's Post-hoc-Test. Hierbei wurden die Effekte der Silber-Ansätze mit denjenigen der dazugehörigen PVP- bzw.  $\text{NO}_3^-$ -Kontrolle miteinander verglichen. Die Nullkontrolle diente als Bezugsgröße für die Berechnung der Netto-Endpunkte und kam daher für einen statistischen Vergleich nicht in Betracht.

# III

## Ergebnisse

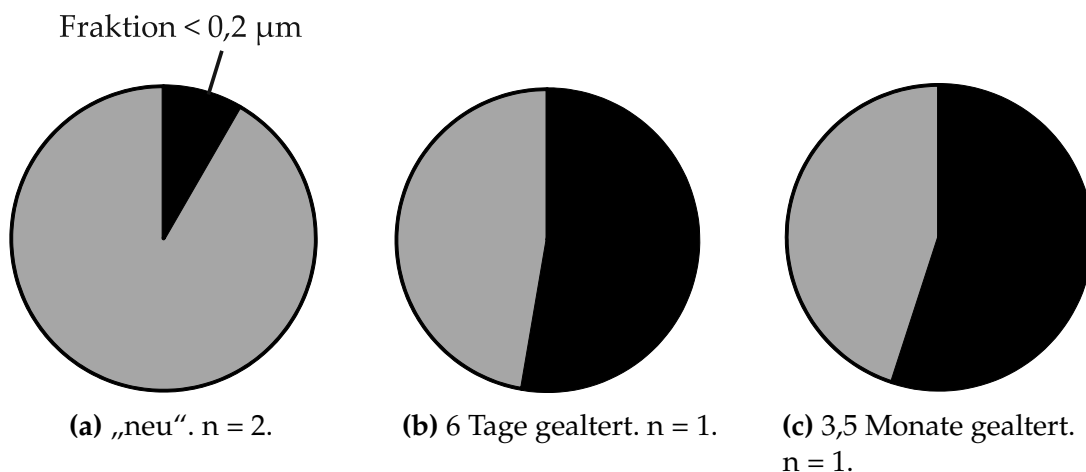
### 1 Stabilität des nanopartikulären Silbers

#### 1.1 Einfluss von Luft

Es wurde überprüft, in wieweit sich in bis zu mehrere Monate alten npAg-Stammsuspensionen, die zwischenzeitlich mit Luft in Kontakt waren, der Anteil gelösten Silbers und die Größe des verbliebenen npAg verändert.

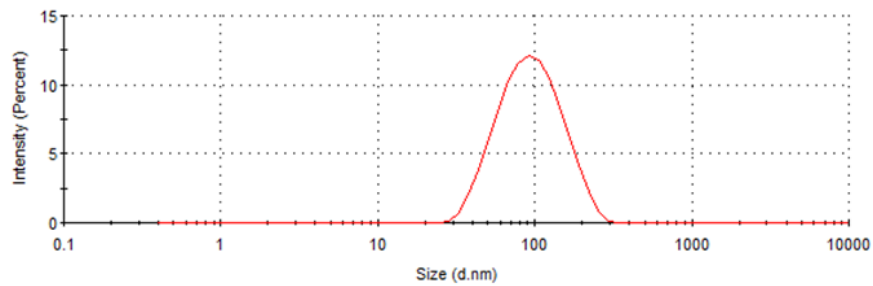
Die Filtration der 6 Tage bzw. 3,5 Monate gealterten npAg-Stammsuspensionen durch eine 0,2 µm-Membran deckte ein im Vergleich zu frisch synthetisiertem npAg charakteristisches Auflösungsmuster auf. In beiden „alten“ Suspensionen, die zuvor mindestens einmal geöffnet worden waren, lag trotz des in unbekanntem Umfang stattgefundenen Einflusses von Luft und unabhängig vom Alter der Suspensionen mehr als die Hälfte des Silbers in gelöster Form, d. h. in der Filtrationsfraktion  $< 0,2 \mu\text{m}$  vor (Abb. III.1.1b und c, S. 41).



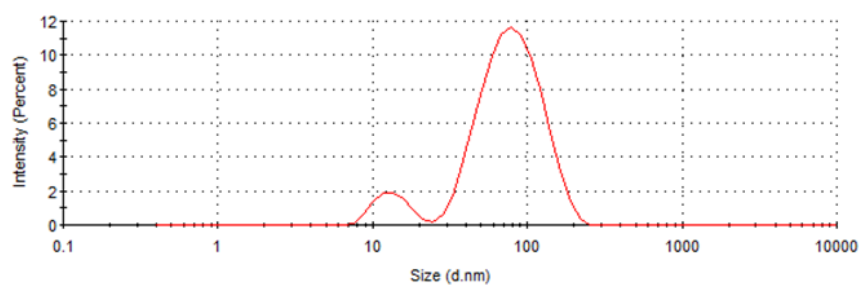


**Abbildung III.1.1:** Anteil gelösten Silbers (< 0,2  $\mu\text{m}$ ) in gealterten und frischen Chargen nanopartikulären Silbers.

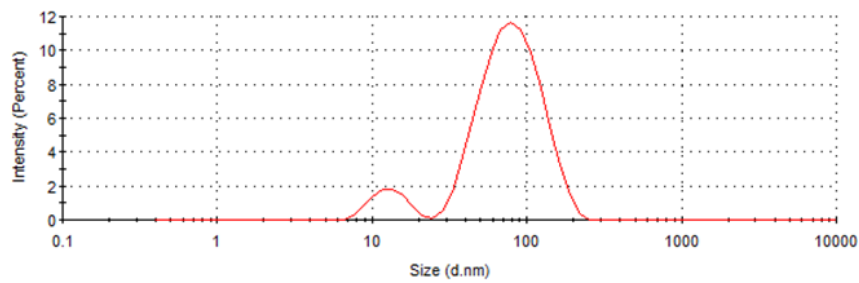
Dynamische-Lichtstreuungs-Messungen (DLS) veranschaulichten zudem, dass auch die Größenverteilung in „altem“ npAg in ähnlicher Weise verändert war. Charakteristisch für bis zu 8 Monate „altes“ npAg war die Aufspaltung in zwei Größenklassen: Der Hauptteil der vermessenen Partikel war entweder noch immer so groß wie (Abb. III.1.2d, S. 42, 100 nm hydrodynamischer Durchmesser) oder kleiner als (Abb. III.1.2b und c, 85 nm) frisch synthetisiertes npAg (Abb. III.1.2a, 102 nm), was sich in einer Linksverschiebung der DLS-Kurve widerspiegelte. Ein geringer Anteil gealterten npAg lag außerdem in einer Größe zwischen 10 und 20 nm vor, zu erkennen am zweiten, niedrigeren Kurvenmaximum der DLS-Diagramme in Abb. III.1.2b–d (S. 42).



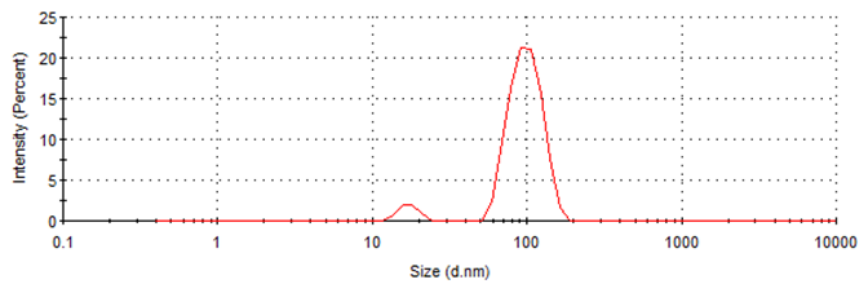
(a) „neu“.



(b) 6 Tage gealtert.



(c) 3,5 Monate gealtert.

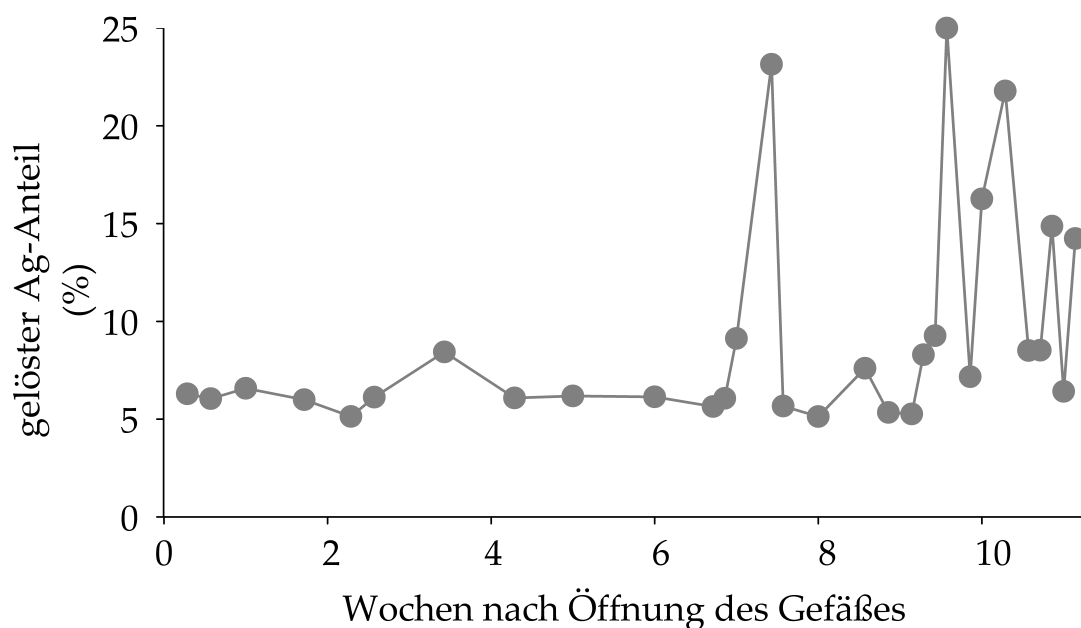


(d) 8 Monate gealtert.

**Abbildung III.1.2:** Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuungs-Analyse gealterter npAg-Stamm suspensionen. Die Gefäße wurden innerhalb der angegebenen Zeitspanne mehrere Male geöffnet. Quelle der Grafiken: AG Prof. Dr. Epple, Universität Duisburg-Essen.

Mit einem Zeitreihenversuch wurde in npAg-Stammsuspensionen nach einmaligem Luftkontakt über mehrere Wochen hinweg der Anteil gelösten Silbers analysiert.

Während dieser Versuchsreihe änderte sich der Anteil gelösten Silbers in den npAg-Aliquoten während der ersten sieben Wochen nicht (Abb. III.1.3). Der Anteil der Fraktion  $<0,2\ \mu\text{m}$  am Gesamt-Silber betrug währenddessen durchschnittlich 6 %. Zu späteren Beprobungszeitpunkten ergab sich hingegen ein heterogenes Bild. In 6 von 18 untersuchten Stammsuspensionen, die mindestens 8 Wochen der einmalig ins Gefäß eingetragenen Luft ausgesetzt waren, hatte sich der gelöste Anteil auf 14–25 % erhöht – in den übrigen 12 Proben hatte sich der Anteil gelösten Silbers im Vergleich zu den Proben der ersten Versuchswochen kaum verändert.



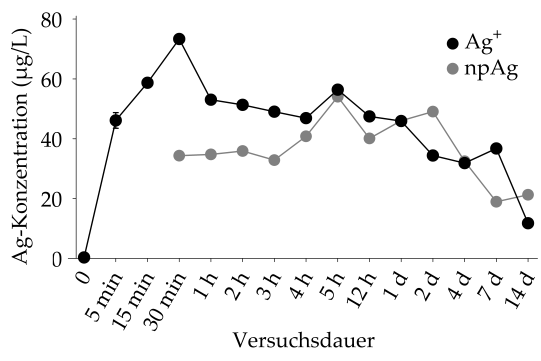
**Abbildung III.1.3:** Zeitabhängiger Anteil gelösten Silbers ( $<0,2\ \mu\text{m}$ ) in npAg-Stammsuspensionen nach einmaligen Sauerstoffkontakt durch Öffnung des Gefäßes. Die gezeigten Daten beruhen auf Verdünnungen mit Reinstwasser.  $n = 1$ .

## 1.2 Verhalten im Expositionsmedium

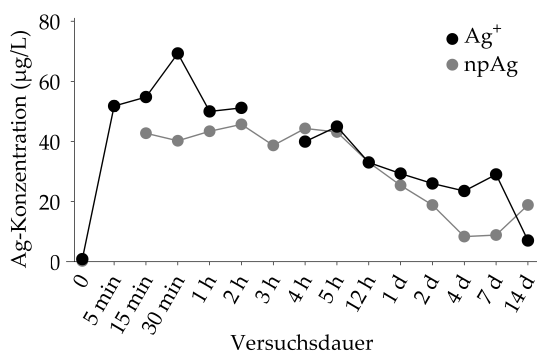
In rekonstituiertem Wasser, welches auch für die Expositionsversuche mit den Testorganismen eingesetzt wurde, wurde über zwei Wochen hinweg das Ausfällungs- und Aggregationsverhalten von npAg mit demjenigen von  $\text{Ag}^+$  verglichen.

Fünf Minuten nach Versuchsbeginn betrug die Ag-Wiederfindungsrate im unfiltrierten rekonstituierten Wasser sowohl für beide Silberspezies rund 50 % der eingesetzten  $100 \mu\text{g Ag/L}$  (Abb. III.1.4a, S. 45). Im weiteren Versuchsverlauf verringerte sich die Konzentration im Medium auf ca.  $20 \mu\text{g Ag/L}$  (14 d).

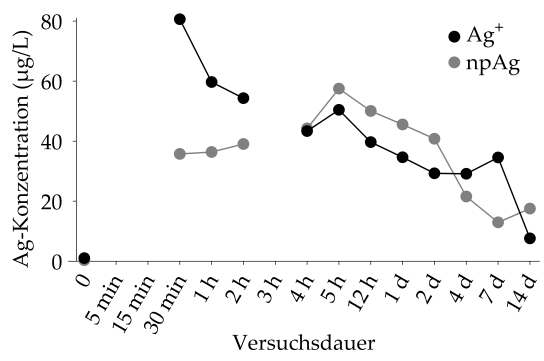
Die  $8 \mu\text{m}$ - und  $1,2 \mu\text{m}$ -filtrierten Proben (Abb. III.1.4b und c) unterschieden sich nicht von den unfiltrierten Proben. Erst durch Mikrofiltration mit einer Porengröße  $\leq 0,45 \mu\text{m}$  wurde ein Teil des im Wasser vorhandenen Silbers zurückgehalten. Etwa 75 % des wiedergefundenen npAg lagen demnach in einer Größe  $< 1,2 \mu\text{m}$ , jedoch  $> 0,45 \mu\text{m}$  vor, waren also agglomeriert. Die restlichen 25 % konnten sowohl die Membran mit  $0,45 \mu\text{m}$  Porengröße als auch diejenige mit  $0,2 \mu\text{m}$  Porengröße passieren, waren also  $< 0,45 \mu\text{m}$  und damit gelöst. Im  $\text{Ag}^+$ -Ansatz belief sich das Verhältnis von agglomeriertem zu gelöstem Silber auf ca. 50 : 50.



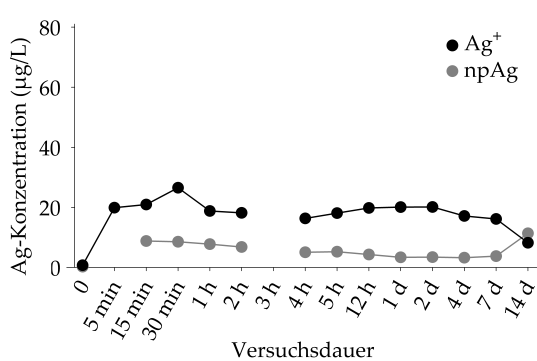
(a) unfiltriert.



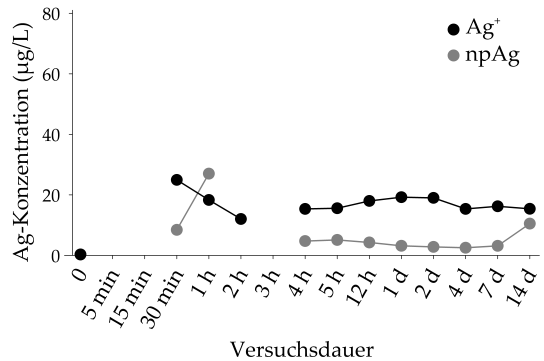
(b) Fraktion < 8 µm.



(c) Fraktion < 1,2 µm.



(d) Fraktion < 0,45 µm.



(e) Fraktion < 0,2 µm.

**Abbildung III.1.4:** Zeitabhängige Konzentrationsveränderung von npAg im Ag<sup>+</sup> in rekonstituiertem, Expositionsversuch-ähnlichem Wasser. Mittelwerte (± SD) aus drei AAS-Detektionen einer Probe. Nominelle Silberkonzentration: 100 µg/L. Nachweisgrenze: 0,005 µg Ag/L.

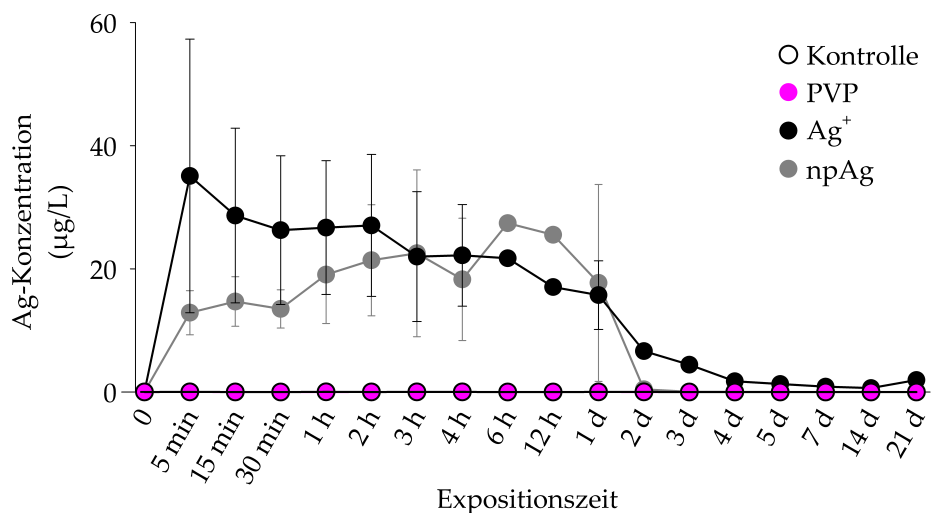
## 2 *Dreissena polymorpha*

### 2.1 Expositionsmedium

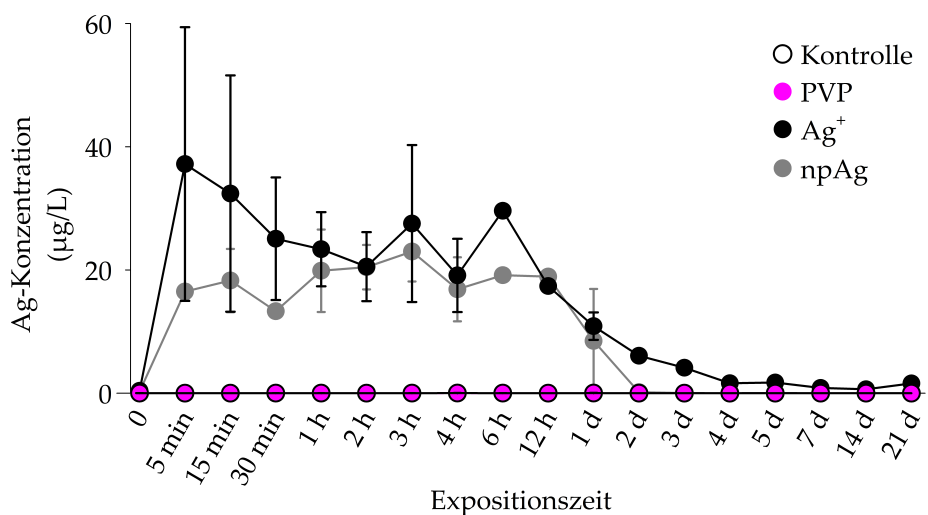
Die Silberkonzentration des Expositionsmediums des *D. polymorpha*-Expositionsversuchs wurde bis zum Ende des dreiwöchigen Experiments mehrmals bestimmt.

Bei der ersten Beprobung nach Expositionsbeginn (5 min) waren im Wasser der Ag-Expositionen ca. 25 % der nominal eingesetzten 100 µg Ag/L wiederzufinden (Abb. III.2.1, S. 47). Im npAg-behandelten Wasser war zumeist etwas weniger Silber nachzuweisen als im Ag<sup>+</sup>-Ansatz. Nachfolgend verringerte sich die Ag-Konzentration allmählich, wobei man die verzerrte Abszisse berücksichtigen sollte. Während dieser Phase (5 min nach Versuchsstart bis Tag 1) lag etwa die Hälfte des wiedergefundenen Silbers in beiden Ansätzen agglomeriert vor, d. h. > 0,45 µm.

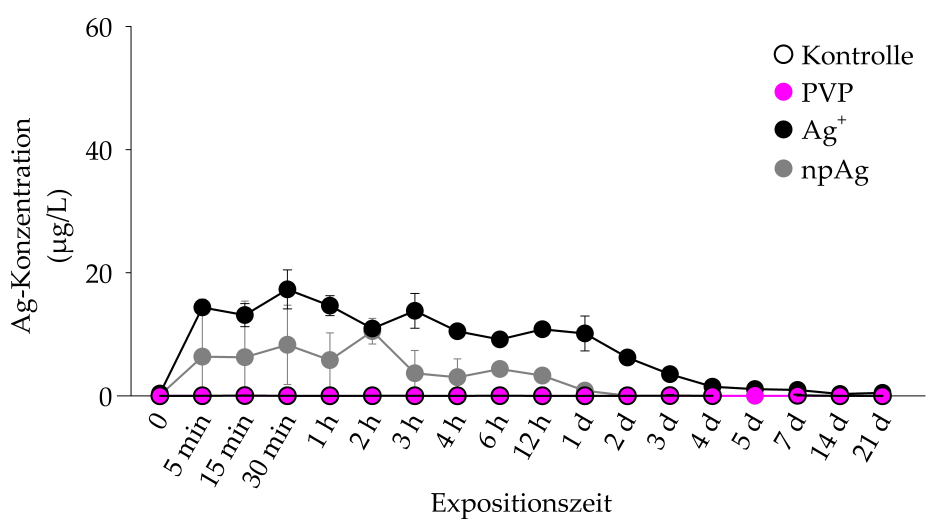
Ab Versuchstag 2 lag die Ag-Konzentration im Wasser der npAg-Exposition unter der Nachweisgrenze. Die Ag-Konzentration der Ag<sup>+</sup>-Behandlung war ab Tag 4 auf < 2 µg Ag/L abgesunken. In sämtlichen Wasserproben der Kontroll- und PVP-Exposition lag die Ag-Konzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,016 µg Ag/L.



(a) unfiltriert.



(b) Fraktion &lt; 8 µm.



(c) Fraktion &lt; 0,45 µm.

**Abbildung III.2.1:** Ag-Konzentrationen im Expositionsmedium während dreiwöchiger Exposition von *D. polymorpha*, Mittelwerte  $\pm$  SD. Nominelle Expositionskonzentration: 100 µg Ag/L. Nachweisgrenze: 0,005 µg Ag/L.

## 2.2 Silberaufnahme in *Dreissena polymorpha*

### 2.2.1 Organspezifische Aufnahmekinetik

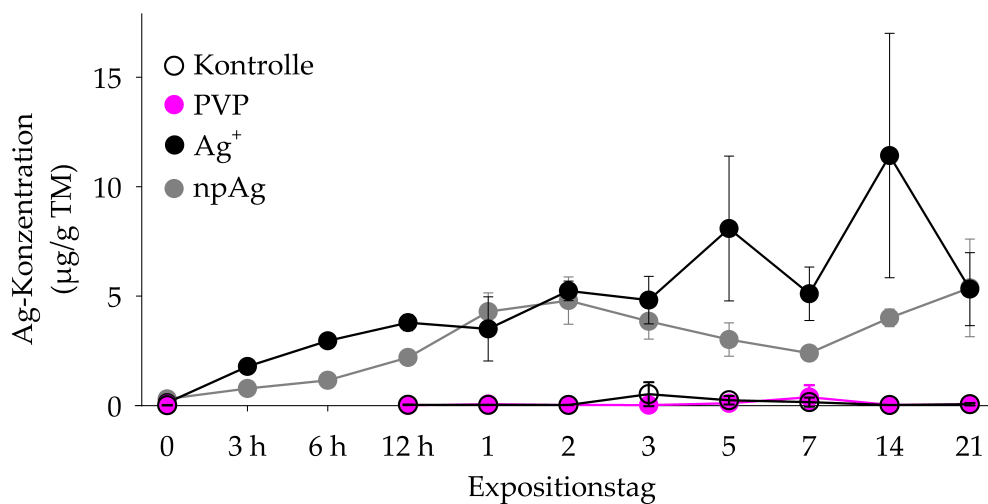
Durch die Sektion des Muschel-Weichkörpergewebes in drei Organbereiche wurde die organspezifische Betrachtung der Silberaufnahme während der 21 Expositionstage ermöglicht.

Bereits zum ersten Beprobungszeitpunkt, nach 3 h, war Silber im Gewebe von *D. polymorpha* nachzuweisen. Ab Tag 1 änderte sich die Ag-Konzentration im Gewebe kaum mehr und blieb bis zum Versuchende an Tag 21 auf einem Niveau von durchschnittlich 6 µg Ag/g Trockenmasse (Abb. III.2.2, S. 49). Die Anreicherung lässt sich in etwa als komplementär zu der Konzentrationsabnahme des Expositionsmediums beschreiben. Zwischen den drei Organbereichen Mantel/Muskulatur (III.2.2a), Kiemen (III.2.2b) und Gonade/Verdauungstrakt (III.2.2c) gab es keine Unterschiede. Die Aufnahme beider Silberspezies erfolgte bis zum Erreichen des Anreicherungs-Plateaus von Versuchsbeginn an etwa gleich schnell und in ähnlichem Ausmaß.

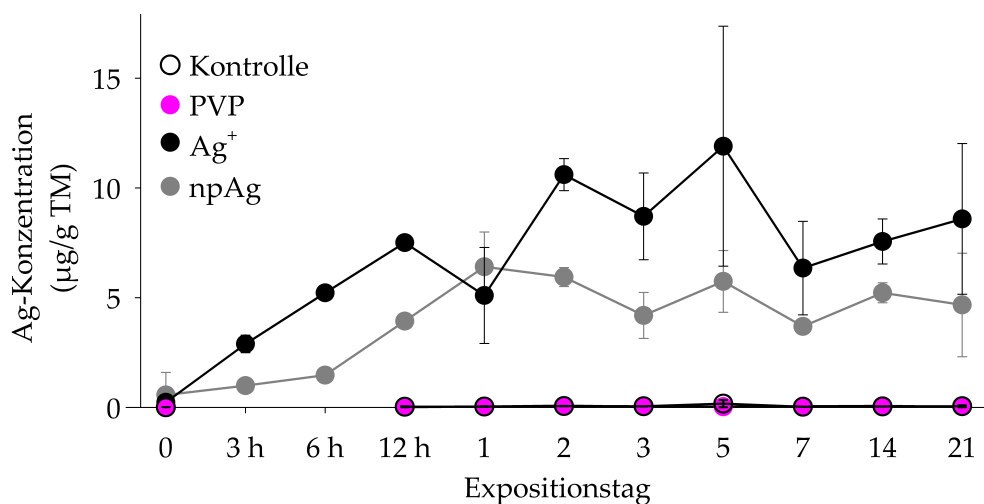
Das zur Berechnung des Biokonzentrationsfaktors (BCF, nach Elder & Collins 1991) vorausgesetzte Verteilungsgleichgewicht zwischen Innen- und Außenkonzentration hatte sich im *D. polymorpha*-Gewebe (Abb. III.2.2a–c, S. 49) und im Expositionsmedium (Abb. III.2.1a, S. 47) spätestens ab dem 4. Versuchstag eingestellt. Bei der Ermittlung des BCF wurde, da sich die ab Tag 4 erreichten Ag-Konzentrationen zwischen den drei Organbereichen nicht wesentlich unterschieden, auf die organspezifische Berechnung verzichtet. Für den betreffenden Zeitraum zwischen Tag 4 und Tag 21 konnte, weil die npAg-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 0,005 µg Ag/L lag, kein  $BCF_{npAg}$  berechnet werden. Beim  $BCF_{Ag^+}$  wurde von einer mittleren Organ-unabhängigen Gewebekonzentration von 6 µg Ag/g Trockenmasse ausgegangen. Ein Trockenmasse- (TM) : Frischmasse (FM)-Verhältnis von 1 : 10 (ca. 90 % Wassergehalt der FM, Tab. VI.5.5, S. 136) und eine Konzentration im Expositionsmedium von 1,4 µg Ag<sup>+</sup>/L während des Verteilungsgleichgewichts vorausgesetzt, ergab sich:

$$BCF_{Ag^+} = \frac{600 \mu\text{g Ag/kg (in der Muschel-FM)}}{1,4 \mu\text{g Ag/L (im Wasser)}} \approx 400 \quad (\text{III.2.1})$$

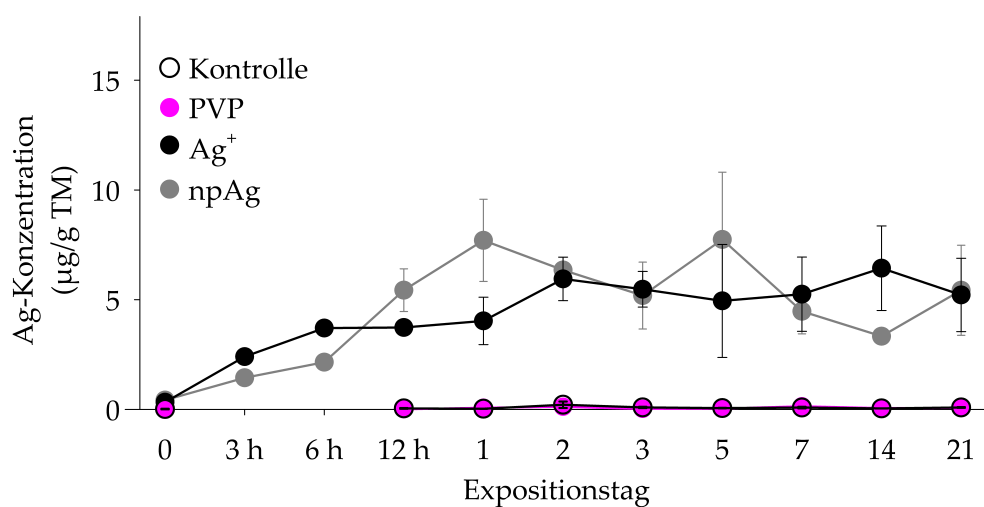




(a) Mantel/Muskulatur.



(b) Kiemen.



(c) Gonade/Verdauungstrakt.

**Abbildung III.2.2:** Organspezifische Ag-Akkumulation in *D. polymorpha*, Mittelwerte  $\pm$  SD. Die Standardabweichungen beziehen sich auf die dreifache Ag-Bestimmung einer Sammelprobe aus 40 Muscheln. Nominelle Expositionskonzentration: 100  $\mu\text{g Ag/L}$ . Nachweisgrenze: 0,005  $\mu\text{g Ag/L}$ .

### 2.2.2 Subzelluläre Verteilung

Durch die Zellfraktionierung nach Wallace *et al.* (2003) konnte innerhalb der drei Organbereiche von *D. polymorpha* die Silberkonzentration in fünf verschiedenen Zellkompartimenten bestimmt werden. Diese Untersuchung wurde an Muschelproben des 1. und 7. Expositionstags durchgeführt.

In der Ergebnisbeschreibung gelten folgende Einschränkungen, die auf statistischen Gründen beruhen (vgl. II.5, S. 37):

Der Terminus „Kompartimente“ beschreibt nachfolgend nur die Zellfraktionen Membranen + „Rest“, Metallothioneine und das Kompartiment, welches Kern, Lysosomen und Mitochondrien umfasst, weil sich in den Kompartimenten der Proteine und der metallreichen Granula die Silberkonzentration nahe und unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,016 µg Ag/L bewegte. Wenn außerdem von Vergleichen zwischen „Organbereichen“ die Rede ist, wird nur auf Mantel/Muskulatur, Kiemen und Gonade/Verdauungstrakt Bezug genommen, nicht auf das gesamte Weichgewebe.

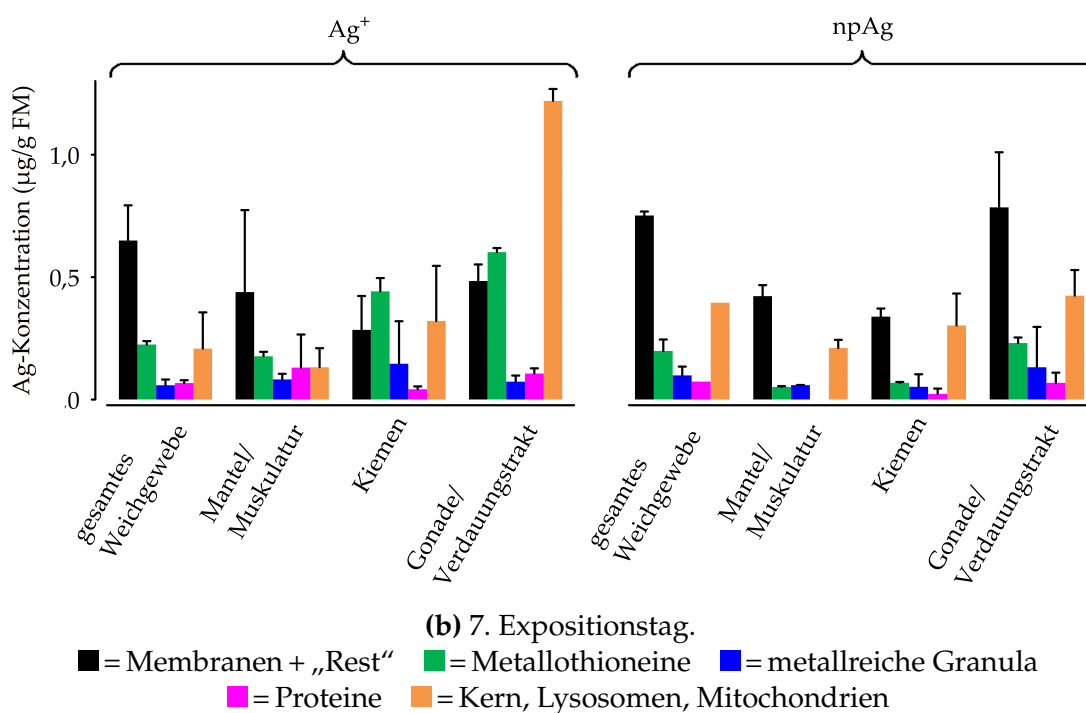
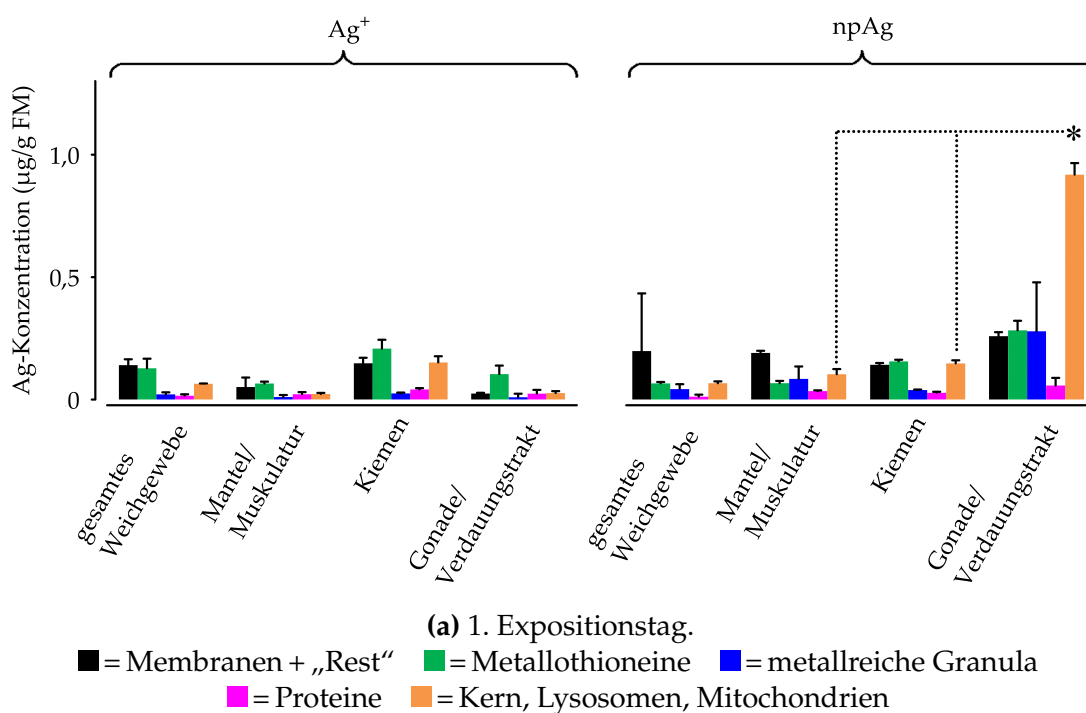
Am 1. Expositionstag waren zwei Auffälligkeiten zu beobachten: In allen Organbereichen und Zellkompartimenten beider Silber-Expositionsansätze wurde eine Ag-Konzentration von 0,5 µg Ag/g Frischmasse (FM) nicht überschritten (Abb. III.2.3a, S. 52). Lediglich in der Kern/Lysosomen/Mitochondrien-Fraktion des Organbereichs Gonade/Verdauungstrakt des npAg-Ansatzes war, im Verhältnis zur Ag-Konzentration in der Kern/Lysosomen/Mitochondrien-Fraktion der anderen beiden Organbereiche, mit fast 1 µg Ag/g FM eine signifikant höhere Ag-Konzentration festzustellen (Friedman's ANOVA und Dunn's Post-hoc-Test, Symbol \* in Abb. III.2.3a). Im Ag<sup>+</sup>-Ansatz war in allen Organbereichen am 1. Expositionstag in der Metallothionein-Fraktion der größte Anteil des aufgenommenen Silbers wiederzufinden (Abb. III.2.4a, S. 53).

Am 7. Expositionstag hatte sich die mittlere Ag-Konzentration aller Zellkompartimente im Schnitt um den Faktor 4 im Verhältnis zu Tag 1 erhöht (Abb. III.2.3b, S. 52). Dieser Konzentrationsunterschied zu Tag 1 war allerdings nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Tests). Eine besonders hohe Ag-Konzentration von 1,2 µg/g FM an Tag 7 war im Ag<sup>+</sup>-Ansatz in der Kern/Lysosomen/Mitochondrien-Fraktion des Organbereichs Gonade/Verdauungstrakt nachzuweisen. Eine statistische Auswertung dieses Datenpunkts im Vergleich zu anderen Organbereichen oder Zellkompartimenten war wegen des Stichprobenumfangs von n = 2

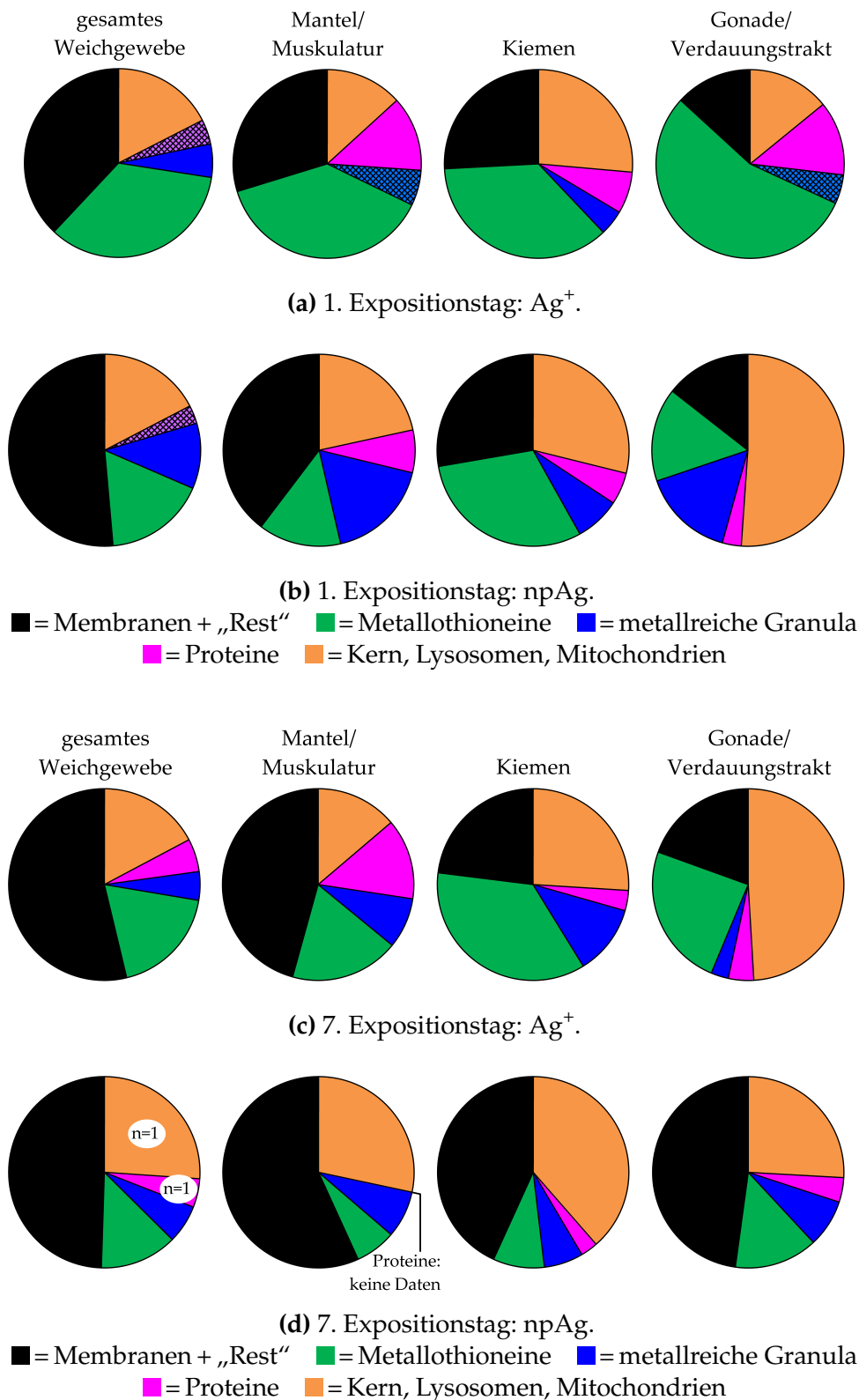
allerdings nicht möglich.  $\text{Ag}^+$ -Exposition führte ansonsten zu einer stärkeren Ag-Anreicherung in der Metallothionein-Fraktion, als es bei npAg-Exposition der Fall war. Im npAg-Ansatz lag an Tag 7 der größte Anteil des aufgenommenen Silbers über alle Organbereiche hinweg im Membranen + „Rest“-Kompartiment vor (Abb. III.2.4d, S. 53). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Friedman's ANOVA bzw. Mann-Whitney-U-Tests).

In den Gesamtgewebe-Proben (Abb. III.2.4a–d, S. 53) zeigten sich zwischen den Versuchstagen und -ansätzen keine Unterschiede der Silberverteilung (Mann-Whitney-U-Tests).

Eine exemplarische Analyse von 76 Proben der Kontroll- und PVP-Gruppe zum Beprobungszeitpunkt 6 h zeigte in allen fünf Zellkompartimenten, dass die Silberkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze von  $0,005 \mu\text{g Ag/L}$  lag. Auch war bei vorhergehenden Zellfraktionierungs-Experimenten, die in der Abteilung für Aquatische Ökologie an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt wurden, nach npAg-Exposition in der Kontrolle zu keinem Zeitpunkt der Exposition Silber nachweisbar (Kiany 2010, S. 42). Die Kontroll- und die PVP-Exposition wurden daher bei der Durchführung und Auswertung der Zellfraktionierung nicht weiter berücksichtigt.



**Abbildung III.2.3:** Säulendarstellung der subzellulären Ag-Verteilung in *D. polymorpha*. Nominelle Expositionskonzentration: 100 µg Ag/L. Nachweisgrenze: 0,005 µg Ag/L. Gesamtes Weichgewebe: Sammelprobe aus 2–3 Muscheln. Andere Organbereiche:  $n \leq 3$  Replikate einer Sammelprobe aus  $\leq 8$  Muscheln. \* = signifikanter Unterschied (Friedman’s ANOVA + Dunn’s Post-hoc-Test).

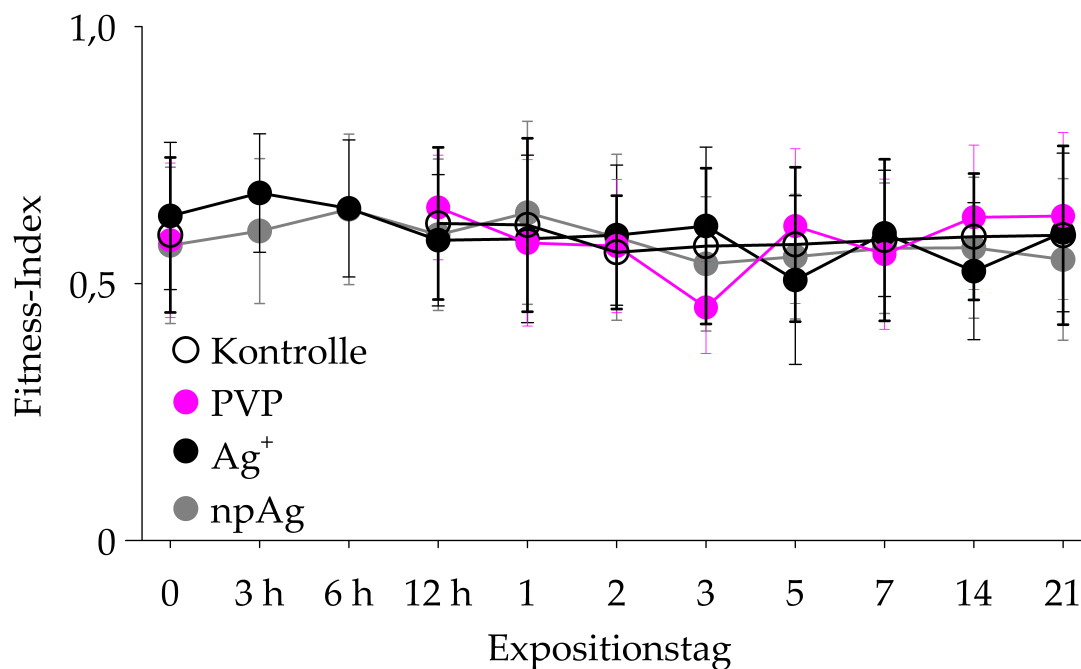


**Abbildung III.2.4:** Kreis-Diagramm-Darstellung der subzellulären Ag-Verteilung in *D. polymorpha*. **(a) + (b):** 1. Expositionstag, **(c) + (d):** 7. Expositionstag. Schraffierte Segmente = Konzentration mindestens eines Replikats unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,016 µg Ag/L. Nominelle Expositionskonzentration: 100 µg Ag/L. Gesamtes Weichgewebe: Sammelprobe aus 2–3 Muscheln. Andere Organbereiche: n ≤ 3 Replikate einer Sammelprobe aus ≤ 8 Muscheln.

## 2.2.3 Biomarkerantworten

### 2.2.3.1 Fitness-Index

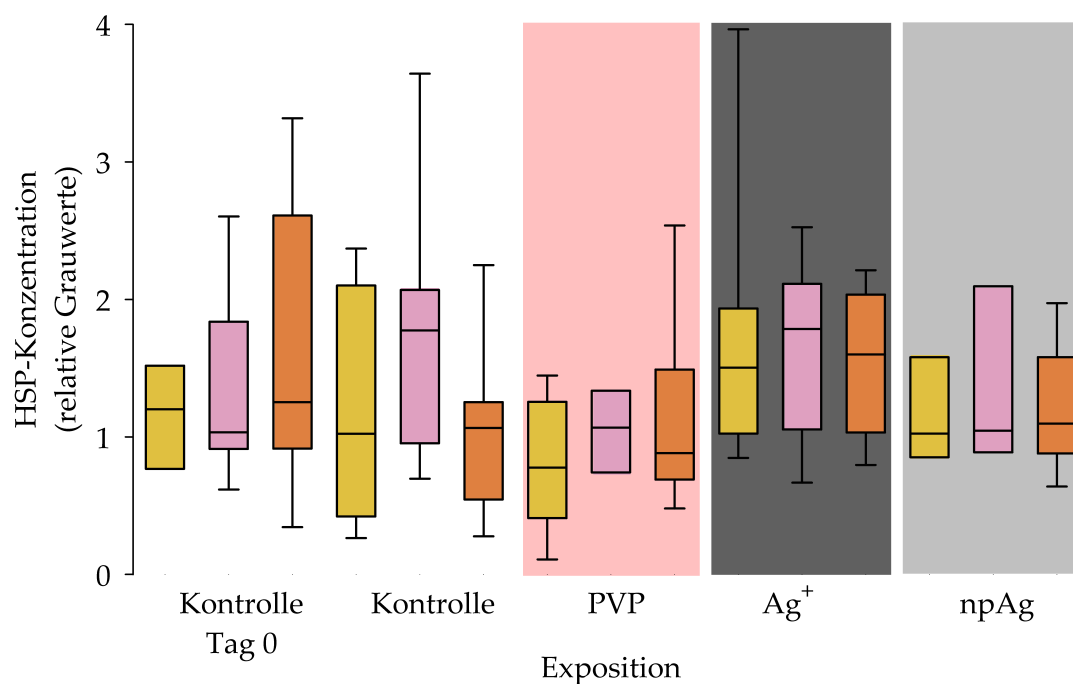
Auf morphologischer Betrachtungsebene waren in *D. polymorpha* keine Veränderungen festzustellen. Der Fitness-Index stagnierte während des dreiwöchigen Versuchszeitraums auf einem Niveau von durchschnittlich 0,6 ( $\pm 0,2$  SD, Abb. III.2.5), unabhängig davon, ob die Muscheln mit npAg oder  $\text{Ag}^+$  exponiert waren oder den Kontrollgruppen angehörten.



**Abbildung III.2.5:** Fitness-Index (FI) von *D. polymorpha* während dreiwöchiger Ag-Exposition. Nominelle Expositionskonzentration:  $100 \mu\text{g Ag/L}$ . Mittelwerte von jeweils  $\geq 36$  Muscheln  $\pm$  SD. FI = Weichkörpermasse / Schalenmasse nach Schäfer (2012).

### 2.2.3.2 Hitzeschockproteine

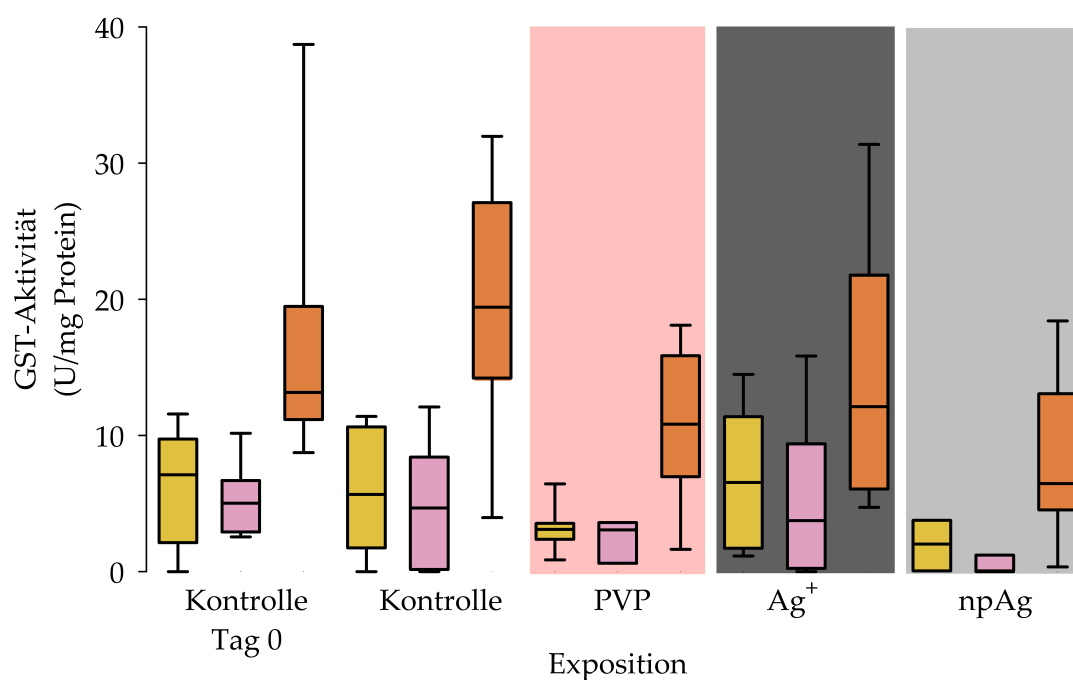
Vor Expositionsbeginn unterschieden sich die drei Organbereiche Mantel/Muskulatur, Kiemen und Gonade/Verdauungstrakt nicht (Friedman's ANOVA). Daten für diesen Beprobungstag sind nur für die Kontrolle gezeigt (Abb. III.2.6). Die siebentägige Exposition mit PVP, Ag<sup>+</sup> und npAg (jeweils nominell 100 µg/L) hatte keinen Einfluss auf die HSP 70-Konzentration.



**Abbildung III.2.6:** HSP 70-Konzentration in *D. polymorpha* nach sieben Tagen Ag-Exposition (100 µg Ag/L nominelle Expositionskonzentration). n = 8–9. Box mit Median = 25–75-Perzentil, Whiskers = 10–90-Perzentil.  
 ■ = Mantel/Muskulatur, ■ = Kiemen, ■ = Gonade/Verdauungstrakt.

### 2.2.3.3 Glutathion-S-Transferasen

Vor Expositionsbeginn war die GST-Aktivität aller vier Versuchsgruppen (Kontrolle, PVP, Ag<sup>+</sup>, npAg) ähnlich. Im Organbereich Gonade/Verdauungstrakt lag die enzymatische Aktivität jeweils auf einem etwas höheren Niveau als in den Bereichen Mantel/Muskulatur und den Kiemen (nicht signifikant, Friedman's ANOVA). Nach sieben Tagen blieb dieses Bild in allen Expositionsgruppen unverändert. Auch das absolute Aktivitätsniveau blieb identisch auf einem Niveau < 30 U/mg Protein (Abb. III.2.7).

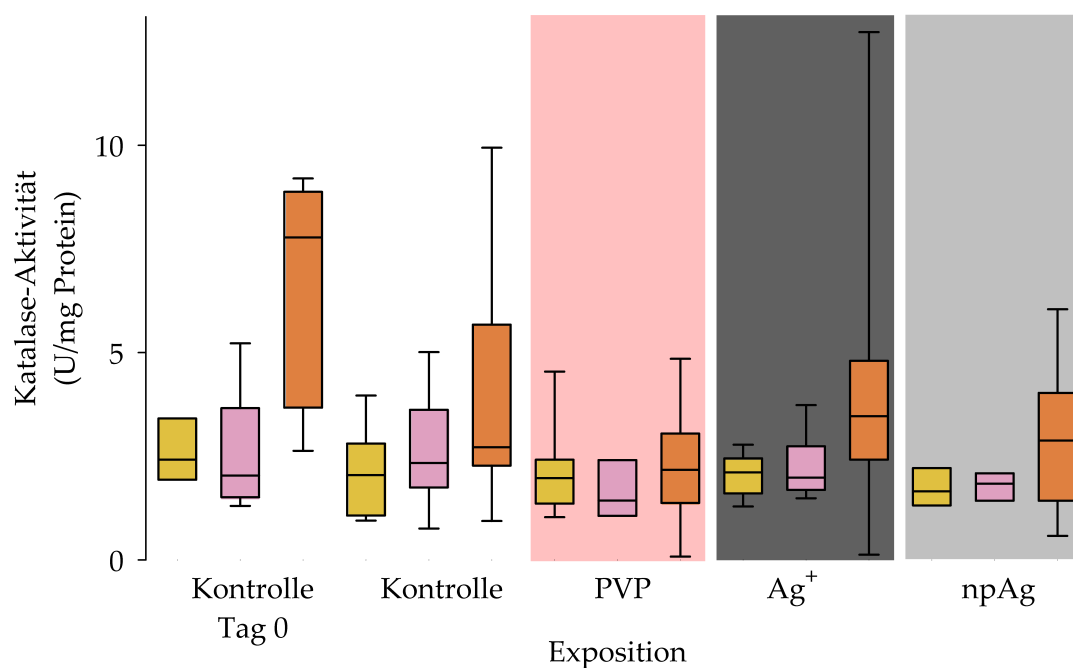


**Abbildung III.2.7:** GST-Aktivität in *D. polymorpha* nach sieben Tagen Ag-Exposition (100 µg Ag/L nominelle Expositions-konzentration). n = 8-9. Box mit Median = 25-75-Perzentil, Whiskers = 10-90-Perzentil.  
 ■ = Mantel/Muskulatur, ■ = Kiemen, ■ = Gonade/Verdauungstrakt.



## 2.2.3.4 Katalase

Das Aktivitätsmuster der Katalase im *D. polymorpha*-Gewebe glich demjenigen der GST. In Gonade/Verdauungstrakt war mit mit ca. 3 U/mg Protein gegenüber den anderen Organbereichen eine höhere enzymatische Aktivität festzustellen (Abb. III.2.8). Diese Tendenz war nicht signifikant (Friedman's ANOVA). Eine sieben-tägige Exposition mit PVP, Ag<sup>+</sup> oder npAg beeinflusste die Katalase-Aktivität nicht (Mann-Whitney-U-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test).

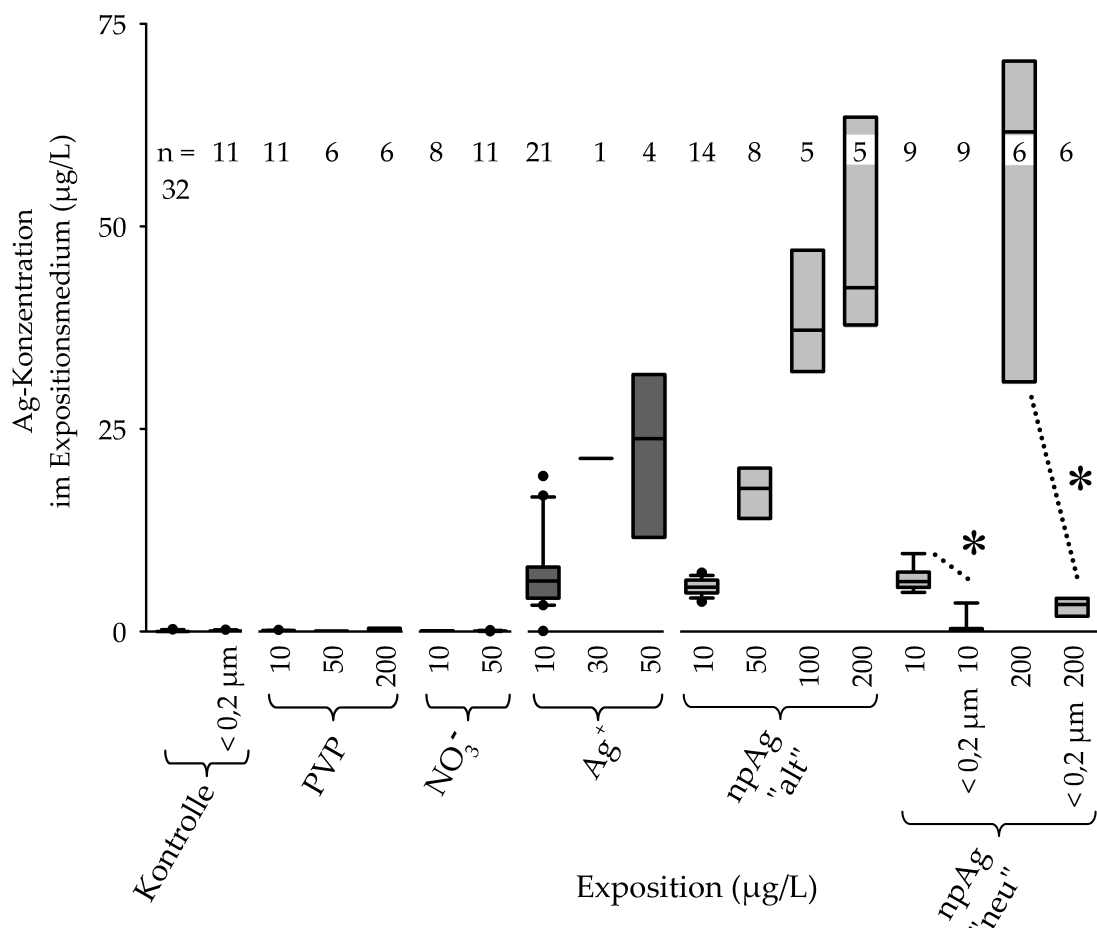


**Abbildung III.2.8:** Katalase-Aktivität in *D. polymorpha* nach sieben Tagen Ag-Exposition (100 µg Ag/L nominelle Expositionskonzentration). n = 8–9. Box mit Median = 25–75-Perzentil, Whiskers = 10–90-Perzentil.  
 ■ = Mantel/Muskulatur, ■ = Kiemen, ■ = Gonade/Verdauungstrakt.

## 3 *Marisa cornuarietis*

### 3.1 Expositionsmedium

Die Ag-Wiederfindungsrate im Expositionsmedium des *Mari*ETT betrug 25%–50% des nominal eingesetzten Silbers, sowohl auf npAg als auch auf Ag<sup>+</sup> bezogen (Abb. III.3.1).

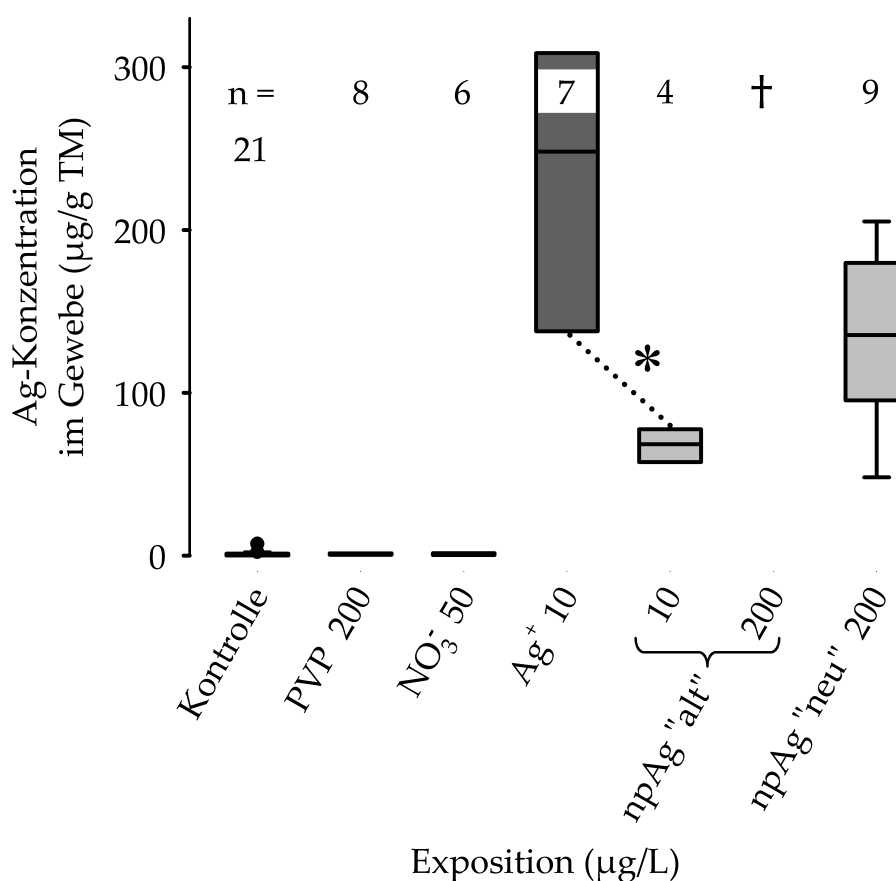


**Abbildung III.3.1:** Ag-Konzentrationen des *Mari*ETT-Expositionsmediums. „< 0,2 µm“ = 0,2 µm-filtrierte Proben. \* = signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test). Zu den Bezeichnungen „alt“ und „neu“ vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40). Box mit Median = 25–75-Perzentil, Whiskers = 10–90-Perzentil.

6–12 % des wiedergefundenen „neuen“ npAg (Expositionskonzentrationen 10 und 200  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) im Medium waren gelöst, d. h. der Fraktion  $< 0,2 \mu\text{m}$  zuzuordnen. Die Konzentrationsunterschiede zwischen der unfiltrierten und der jeweiligen filtrierten Probe waren signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test).

### 3.2 Silberaufnahme in *Marisa cornuarietis*

Die in den Schnecken-Embryonen nachgewiesenen Silbermengen der Ag-Expositionen 10  $\mu\text{g Ag}^+/\text{L}$  bzw. npAg „alt“ /L und 200  $\mu\text{g npAg „neu“}/\text{L}$  bewegten sich im Konzentrationsbereich von im Mittel 70  $\mu\text{g Ag}/\text{g TM}$  (10  $\mu\text{g npAg „alt“}/\text{L}$ ) über 160  $\mu\text{g Ag}/\text{g TM}$  (200  $\mu\text{g npAg „neu“}/\text{L}$ ) bis hin zu 220  $\mu\text{g Ag}/\text{g TM}$  (10  $\mu\text{g Ag}^+/\text{L}$ ) und waren damit signifikant höher als die Ag-Konzentration der Kontrolle (Kruskal-Wallis-H-Test und Dunn's Post-hoc-Test, Abb. III.3.2).



**Abbildung III.3.2:** Ag-Konzentration im Gewebe frisch geschlüpfter *M. cornuarietis*-Embryonen nach Durchführung des MariETT. † = wegen zu hoher Mortalität keine Datenerhebung möglich. Zu den Bezeichnungen „alt“ und „neu“ vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40). Nachweisgrenze: 0,005  $\mu\text{g Ag}/\text{L}$ . Box mit Median = 25–75-Perzentil, Whiskers = 10–90-Perzentil.

Für die *M. cornuarietis*-Embryonen konnten die Biokonzentrationsfaktoren (BCF, nach Elder & Collins 1991) für die Expositionsstufen  $10 \mu\text{g Ag}^+/\text{L}$ ,  $10 \mu\text{g npAg „alt“}/\text{L}$  und  $200 \mu\text{g npAg „neu“}/\text{L}$  berechnet werden. Für diese Expositionen waren die dafür notwendigen Ag-Konzentrationen im Schneckengewebe bestimmt worden (Abb. III.3.5, S. 65). Der BCF konnte nur überschlagsmäßig abgeschätzt werden, weil die Bestimmung der Frischmasse (FM) wegen des anhaftenden Wassers und der geringen Masse der geschlüpften Schnecken (Größe ca. 1,3 mm, vgl. Demian & Yousif 1973) nicht möglich war. Daher wurde, wie in Tab. VI.5.3 (S. 135) für *D. polymorpha* dargestellt, auch für *M. cornuarietis* ein TM:FM-Verhältnis von 1:10 angenommen.

Dieses Verhältnis fließt als Faktor 10 in den Nenner untenstehender Formeln ein. Statt mit den nominellen Expositionskonzentrationen wird mit den tatsächlichen Expositionskonzentrationen gerechnet, denn nur diese sind für die potentielle Akkumulation ausschlaggebend:

$$\text{BCF}_{\text{npAg „neu“ } 200 \mu\text{g/L}} = \frac{159663 \mu\text{g Ag/kg}}{51,8 \mu\text{g Ag/L} \cdot 10} \approx 308 \quad (\text{III.3.1})$$

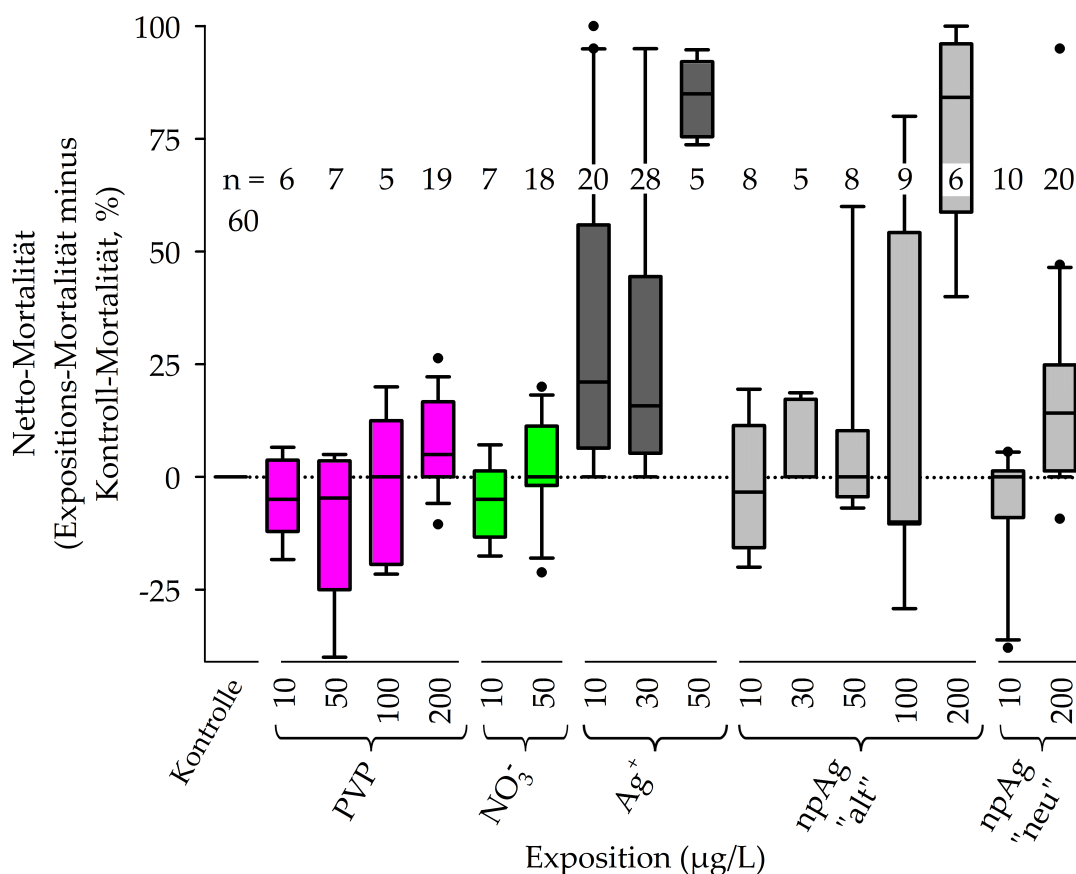
$$\text{BCF}_{\text{npAg „alt“ } 10 \mu\text{g/L}} = \frac{67803 \mu\text{g Ag/kg}}{5,5 \mu\text{g Ag/L} \cdot 10} \approx 1200 \quad (\text{III.3.2})$$

$$\text{BCF}_{\text{Ag}^+ 10 \mu\text{g/L}} = \frac{223881 \mu\text{g Ag/kg}}{6,1 \mu\text{g Ag/L} \cdot 10} \approx 3700 \quad (\text{III.3.3})$$

### 3.3 Embryotoxizität

#### 3.3.1 Mortalität

Die Mortalität der *Marisa cornuarietis*-Embryonen betrug in den Kontrolle des *MariETT*  $48 \pm 37\%$  (SD). Diese große Varianz war auch bei exponierten Embryonen festzustellen (Tab. VI.5.6, S. 137). Um eine bessere Überschaubarkeit der Daten zu erzielen, ist in Abb. III.3.3 statt der absoluten Mortalität die Netto-Mortalität (NM) dargestellt.



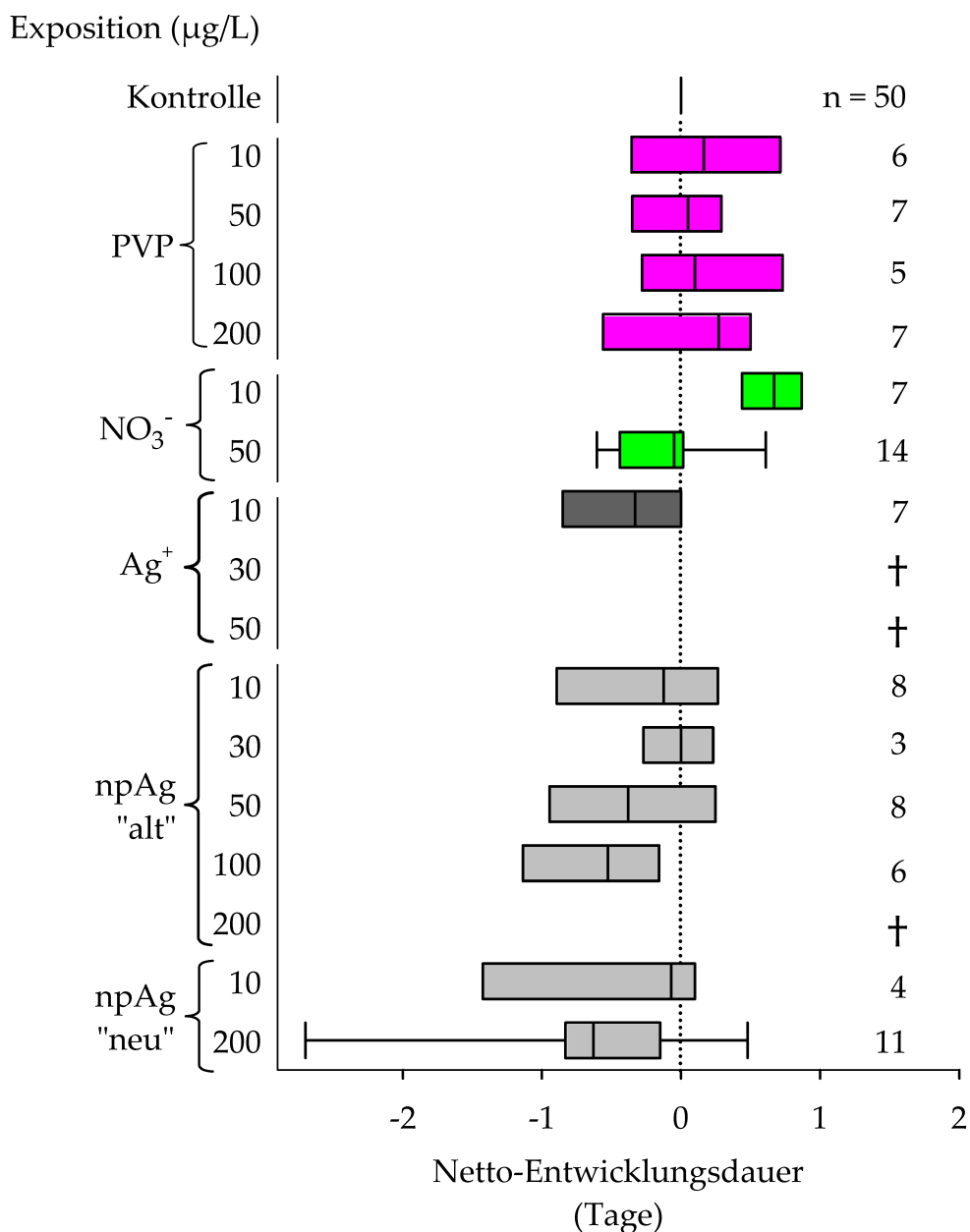
**Abbildung III.3.3:** Netto-Mortalität von *M. cornuarietis*-Embryonen bis zum 21. Versuchstag des *MariETT*. Zu den Bezeichnungen „alt“ und „neu“ vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40). Box mit Median = 25–75-Perzentil, Whiskers = 10–90-Perzentil.

Die NM ist die um die jeweilige Kontroll-Mortalität bereinigte Mortalität eines Versuchsansatzes. Bei Werten  $> 0$  war die Sterblichkeit im Versuchsansatz größer als in der dazugehörigen Kontrolle, bei Werten  $< 0$  überlebten hingegen verhältnismäßig mehr Embryonen. Aus diesem Grund kann ein Versuchsansatz trotz einer absoluten Mortalität von beispielsweise 100 % eine geringe NM aufweisen, nämlich wenn in der dazugehörigen Kontrolle ebenfalls eine absolute Mortalität von 100 % erreicht wurde.

Exposition mit „altem“ npAg führte ab einer Expositionskonzentration von 200  $\mu\text{g}$  npAg/L zu einer signifikanten Erhöhung der NM im Vergleich zur entsprechenden PVP-Kontrolle. Die npAg „alt“-Exposition der Konzentrationsstufe 30  $\mu\text{g}$ /L wurde bei der statistischen Auswertung (Kruskal-Wallis-Test und Dunns' Post-hoc-Test) mit der nächsthöher dosierten PVP-Kontrolle (50  $\mu\text{g}$ /L) in Beziehung gesetzt. Die Exposition mit „neuem“ npAg führte selbst bei 200  $\mu\text{g}$  npAg/L zu keiner NM-Veränderung.  $\text{Ag}^+$  führte hingegen bereits in der niedrigsten Konzentrationsstufe von 10  $\mu\text{g}$ /L zu signifikant höherer NM als in den jeweiligen  $\text{NO}_3^-$ -Kontrollen. Auch hier wurde die 30  $\mu\text{g}$   $\text{Ag}^+$ /L-Exposition mangels entsprechend konzentrierter  $\text{NO}_3^-$ -Kontrolle mit der 50  $\mu\text{g}$   $\text{NO}_3^-$ /L-Kontrolle verglichen.

### 3.3.2 Entwicklungsdauer

Die mittlere Entwicklungsdauer nicht-exponierter *M. cornuarietis*-Embryonen betrug 14,4 Tage ( $\pm 2,3$  SD, übrige Absolutwerte s. Tab. VI.5.7, S. 138). Exposition mit npAg und  $\text{Ag}^+$  führte im Vergleich zur Kontrolle zu rascherer Entwicklung (Abb. III.3.4), d. h. negativen Netto-Entwicklungszeiten.



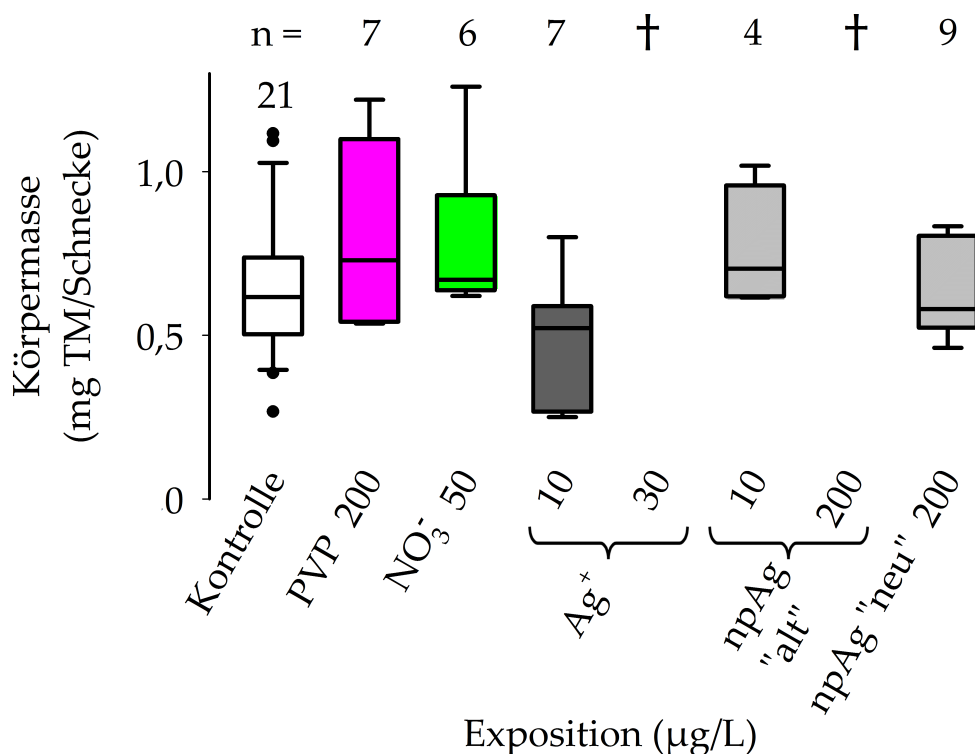
**Abbildung III.3.4:** Netto-Entwicklungsdauer von *M. cornuarietis*-Embryonen bis zum Schlupf. † = wegen zu hoher Mortalität keine Datenerhebung möglich. Zu den Bezeichnungen „alt“ und „neu“ vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40). Box mit Median = 25–75-Perzentil, Whiskers = 10–90-Perzentil.

Dieser Trend war allerdings nicht signifikant von der dazugehörigen  $\text{NO}_3^-$  bzw. PVP-Kontrolle verschieden (Kruskal-Wallis-H-Test). Bei einer Exposition mit  $200 \mu\text{g/L}$  „altem“  $\text{npAg}$  und bei Exposition mit  $> 10 \mu\text{g Ag}^+/\text{L}$  betrug die absolute Mortalität 100 %, sodass für diese Gruppen keine Daten zur Entwicklungsdauer gewonnen werden konnten (Symbol †).



### 3.3.3 Körpermasse

Nicht-exponierte *M. cornuarietis*-Embryonen wogen direkt nach dem Schlupf aus dem Ei durchschnittlich  $0,6 \pm 0,2$  mg/Individuum (s. Abb. III.3.5). Wie auch die PVP- und  $\text{NO}_3^-$ -Kontrolle hatte die Exposition mit niedrig konzentriertem „altem“ npAg ( $10 \mu\text{g/L}$ ) keinen Einfluss auf die Körpermasse. Auch mit  $200 \mu\text{g/L}$  „neuem“ npAg exponierte Embryonen wiesen zum Zeitpunkt des Schlupfes keine veränderte Körpermasse auf (Kruskal-Wallis-H-Test). Das Gewicht der mit  $200 \mu\text{g/L}$  „alten“ npAg exponierten Schnecken konnte nicht ermittelt werden, weil keines der Tiere seine Entwicklung bis zum Schlupf abschließen konnte (Symbol †). Dasselbe traf auf die mit  $30 \mu\text{Ag}^+$   $\mu\text{g/L}$  exponierten Schnecken zu.  $10 \mu\text{Ag}^+$   $\mu\text{g/L}$  bewirkten eine geringfügige, wenn auch nicht signifikante Reduktion der Körpermasse.

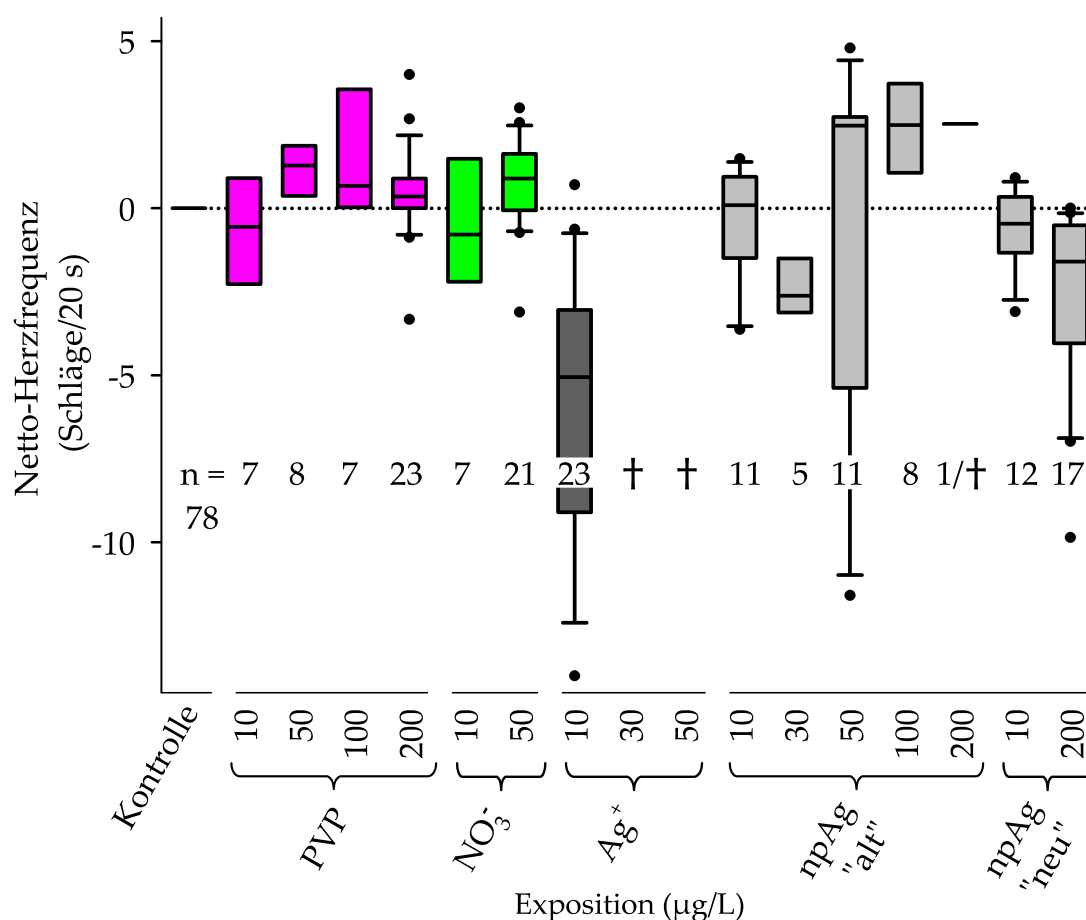


**Abbildung III.3.5:** Trockenmassen (TM) frisch geschlüpfter *M. cornuarietis*-Embryonen. † = wegen zu hoher Mortalität keine Datenerhebung möglich. Zu den Bezeichnungen „alt“ und „neu“ vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40). Box mit Median = 25–75-Perzentil, Whiskers = 10–90-Perzentil.

### 3.3.4 Herzfrequenz

Die mittlere Herzfrequenz (Schläge/20 s) in der Kontrolle betrug 20,7/20 s ( $\pm 4,3$  SD, übrige Absolutwerte s. Tab. VI.5.8, S. 139). Silber-Exposition führte zu einer Verringerung der Netto-Herzfrequenz (Abb. III.3.6).

Im Extremfall waren die Schnecken zum Zeitpunkt der Herzfrequenzmessung entweder schon gestorben (Symbol †, ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{g Ag}^+$ /L), zeigten keinen Pulsschlag mehr, (was mit „0“ gewertet wurde) oder eine stark verlangsamte Herzaktivität mit unregelmäßigen, vereinzelt Schlägen.



**Abbildung III.3.6:** Relative Herzfrequenz 9 Tage alter *M. cornuarietis*-Embryonen. Zu den Bezeichnungen „alt“ und „neu“ vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40). Box mit Median = 25–75-Perzentil, Whiskers = 10–90-Perzentil.

$\text{Ag}^+$ -Exposition führte bei 10  $\mu\text{g/L}$  zu einer niedrigeren, jedoch nicht signifikant verringerten Netto-Herzfrequenz in Relation zur dazugehörigen  $\text{NO}_3^-$ -Kontrolle (Kruskal-Wallis-H-Test und Dunn's Post-hoc-Test). Die npAg „alt“-Expositionen hatten, bezogen auf die jeweiligen PVP-Kontrollen, bis zu einer

Konzentration von 100 µg/L keine signifikante Auswirkung auf den Pulsschlag. Bei Exposition mit 200 µg „altem“ npAg/L konnte anfänglich ein einziges Replikat ausgewertet werden, in acht nachfolgenden Replikaten ließ die hohe Mortalität der Schnecken keine weitere Auswertung zu. Der npAg „neu“-Ansatz der Konzentrationsstufe 10 µg/L hatte keinen Einfluss auf die Herzfrequenz. Bei Exposition mit 200 µg npAg „neu“/L war der Herzschlag hingegen signifikant verlangsamt.

# IV

## Diskussion

### 1 Stabilität der Silber-Nanopartikel

Die Bedingungen im Medium, die während der Expositionsversuche mit *Dreissena polymorpha* und *Marisa cornuarietis* geherrscht haben, können zur Veränderung des als Expositionssubstanz verwendeten nanopartikulären Silbers (npAg) geführt haben. Diese Veränderungen, die sich wiederum auf die Aufnahme und Toxizität des npAg auswirken, umfassen im Wesentlichen die Auflösung, Größenänderung und Aggregation der Partikel (Dobias & Bernier-Latmani 2013, Harmon *et al.* 2014, Kittler *et al.* 2010).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Luftkontakt in der npAg-Stammsuspension innerhalb weniger Tage zur Lösung von > 50 % in  $\text{Ag}^+$  und zu einer Verkleinerung der Partikel führt. Zudem wurde festgestellt, dass in rekonstituiertem Wasser, mit dem die Expositionsversuche durchgeführt wurden, der Großteil des hinzugefügten npAg wie auch des  $\text{Ag}^+$  in Agglomeraten von 0,45–1,2  $\mu\text{m}$  vorlag.

## 1.1 Einfluss von Luft

Der Vergleich des zeitabhängigen Auflösungsverhaltens von npAg durch Luft einfluss mit Ergebnissen anderer Studien stellt sich wegen abweichender Versuchsparameter wie der Partikelgröße und -funktionalisierung, der Temperatur und Beschaffenheit des Mediums als nahezu unmöglich dar (Loza *et al.* 2014). Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wird im Folgenden besonders auf die Publikationen von Kittler *et al.* (2010) und Loza *et al.* (2014) Bezug genommen, weil jene Autoren ihre Versuche mit npAg durchgeführt haben, welches mit denselben Methoden und Geräten synthetisiert wurde, wie sie auf das hier eingesetzte npAg zutreffen.

Der Kontakt zu Luft führt auch bei mehrmonatiger Exposition nicht zu einer vollständigen Auflösung von PVP-stabilisiertem npAg (Kittler *et al.* 2010, Loza *et al.* 2014), was die vorliegenden Ergebnisse ebenfalls dokumentieren. In den hier untersuchten npAg-Stammsuspensionen schien der Alterungsprozess bereits nach 6 Tagen abgeschlossen zu sein. Das Testsystem von Kittler *et al.* (2010) kommt durch die Versuchstemperatur von 5 °C, die npAg-Konzentration von 0,22 mg/L, die Immersion in Reinstwasser und durch den gegebenen Luftkontakt dem hier präsentierten npAg-Stammsuspensions-Auflösungsversuch sehr nahe (7 °C, ca. 0,5 mg/L, Reinstwasser, unregelmäßiger Luftkontakt). Kittler *et al.* (2010) geben die Auflösungs-Halbwertszeit von npAg allerdings mit 17 Tagen an – außerdem lösten sich nur maximal 9 %, im Vergleich zu bis zu 55 % in vorliegender Arbeit. Fast identische Halbwertszeiten (5,8 Tage) und Auflösungsraten (48 %) wurden bei Kittler *et al.* (2010) jedoch bei einer Temperatur von 25 statt 5 °C erzielt, bei ansonsten unveränderten Versuchsbedingungen.

Eine Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Kittler *et al.* (2010) ist hingegen in der Größenverteilung des gealterten npAg zu finden. Auch Kittler *et al.* (2010) stellten an 35 Tage gealtertem npAg fest, dass sich die Größenverteilungskurve im Diagramm der dynamischen Lichtstreuung (DLS) nach links verschoben hatte. Dies bedeutet, dass während des Alterungsprozesses eine Größenabnahme der Partikel stattfand. Erklären ließe sich diese Verkleinerung durch die Freisetzung von Ag<sup>+</sup> durch den gleichmäßigen Abtrag des Silbers von der npAg-Oberfläche. Allerdings kommen andere Studien auch zu gegenteiligen Erkenntnissen: Durch Alterung von npAg kann ebenso eine Vergrößerung (Peretyazhko *et al.* 2014) oder eine Änderung der Grundform eintreten (z. B. Dreieck, Kent & Vikesland

2012). Bei Kittler *et al.* (2010) wies eine Verbreiterung der DLS-Kurvenbasis auf eine größere Varianz der Größenverteilung hin, welches das in dieser Arbeit untersuchte npAg nicht zeigte. Stattdessen wurde durch die Alterung des npAg im DLS-Diagramm ein zweites Kurvenmaximum bei ca. 10–20  $\mu\text{m}$  sichtbar, was auf die Entstehung kleinerer Partikel hindeutet, möglicherweise durch Zerbrechen.

Der einmalige Luftkontakt des npAg, wie er im Zeitreihenversuch simuliert wurde, erbrachte zumindest während der ersten sieben Wochen keine Auflösungseffekte. Vergleichbar mit der Lagerung unter Argon-Atmosphäre (Loza *et al.* 2014) war ein konstanter Anteil gelösten Silbers von wenigen Prozent nachzuweisen.

Angenommen, dass durch die einmalige anfängliche Gefäß-Öffnung der npAg-Aliquote in der entsprechenden Testreihe (II.2.1, S. 16) ein vollständiger Austausch der Argon-Atmosphäre gegen Luft stattgefunden hätte, dann wäre während der anschließenden Lagerungszeit pro 1 Mol Ag etwa die fünffache Menge  $\text{O}_2$  inkubiert gewesen (Tab. IV.1.1).

**Tabelle IV.1.1:** Berechnung des  $\text{O}_2$ : npAg-Verhältnisses in den npAg-Aliquoten.

	$\text{O}_2$	npAg
Volumen (L)	$\geq 1,45 \cdot 10^{-3}{}^a$	$5 \cdot 10^{-5}{}^a$
Dichte (g/L)	$1,3{}^b$	$10,5 \cdot 10^3{}^b$
Verdünnungsfaktor	$0,2{}^c$	$1 \cdot 10^{-3}{}^d$
molare Masse (g)	$16{}^e$	$108{}^e$
Mol im Gefäß	$\geq 26 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$

<sup>a</sup> 1,5 mL-Reaktionsgefäß, befüllt mit 50  $\mu\text{L}$  npAg-Stammsuspension.

<sup>b</sup> Lautenschläger *et al.* (2005)

<sup>c</sup> trockene Luft besteht zu ca. 21 Volumen-% aus  $\text{O}_2$  (Warneck 1988, S. 11).

<sup>d</sup> beispielhafte Konzentration der npAg-Stammsuspension: 1 g npAg/L.

<sup>e</sup> International Union of Pure and Applied Chemistry (2013)

Dieser Überschuss war offenbar nicht ausreichend für einen Oxidationseffekt des npAg, zumindest während der ersten sieben Versuchswochen. Die ab der 7. Versuchswoche in einigen Suspensionen beobachtete verstärkte Auflösung von bis zu 25 % wird durch dieses Rechenexempel allerdings nicht erklärt.

Es liegen keine DLS-Analysen des in diesem Inkubationsversuch verwendeten npAg vor, weshalb über die Größenänderung des noch partikulär vorliegenden

npAg keine Aussage getroffen werden kann. Jedoch wurde durch Mikrofiltration gezeigt, dass ab der 7. Woche in einigen Aliquoten ein größerer Prozentsatz des npAg als zu Versuchsbeginn  $< 0,2 \mu\text{m}$ , also gelöst war. Somit kann nur vermutet werden, dass durch den einmaligen  $\text{O}_2$ -Eintrag ein Alterungsprozess initiiert wurde, der erst nach einigen Wochen zu Effekten führte, die mit den hier verwendeten Methoden nachzuweisen waren. Dieser Alterungsprozess könnte sukzessive zu einer Verkleinerung des npAg geführt haben, sodass erst nach mindestens sieben Wochen Partikel- (bzw. Agglomerat-) größen  $< 0,2 \mu\text{m}$  erreicht wurden.

## 1.2 Verhalten im Medium

Das Verhalten von npAg im wässrigen Medium ist weitaus komplexer als das von  $\text{Ag}^+$  (Teegarden *et al.* 2007). Die in der Wassersäule vorliegende npAg-Konzentration ist einerseits von der Beschaffenheit der Partikel selbst, z. B. von der Ausgangsgröße, -form und Oberfläche, welche wiederum die Aggregation und Sedimentation beeinflussen, abhängig (Harmon *et al.* 2014, Teegarden *et al.* 2007). Andererseits sind Charakteristika des Mediums wie Leitfähigkeit, Chloridgehalt und  $\text{O}_2$ -Anwesenheit (Chen *et al.* 2013, Harmon *et al.* 2014) ausschlaggebend für das Verhalten des npAg.

Für  $\text{Ag}^+$  können die im rekonstituierten Wasser vorhandenen Chlorid-Ionen zunächst als Ursache der teilweisen Ausfällung ausgemacht werden, welche direkt nach Versuchsbeginn (5 min) eintrat. Mit Hilfe der Lösungsgleichgewichts-Software Visual MINTEQ lässt sich für  $100 \mu\text{g Ag}^+/\text{L}$  enthaltendes rekonstituiertes Wasser bei  $15^\circ\text{C}$  und  $\text{pH} = 7,5$  berechnen, dass  $\text{Ag}^+$  ausschließlich mit  $\text{Cl}^-$  reagiert, dann zu ca. 96 % in Form von  $\text{AgCl}_3^{2-}$ , und zu ca. 4 % als  $\text{AgCl}_2^-$  vorliegt. Hieraus entstehendes  $\text{AgCl}$  ( $+\text{Cl}^-$ ) fällt daraufhin (zumindest theoretisch) aus. Loza *et al.* (2014) zeigten, dass diese Reaktion auch für npAg gilt. Hierdurch ließe sich erklären, dass beim ersten Beprobungszeitpunkt sowohl npAg als auch  $\text{Ag}^+$  in ähnlicher Konzentration im Medium nachzuweisen waren. Dass jedoch überhaupt und sogar noch nach mehreren Tagen Silber im Medium vorlag, könnte, wie aus der Mikrofiltration zu schließen wäre, auf sofortige Adsorption (in Form von  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{AgCl}_3^{2-}$  oder npAg) an Substanzen der Größenklasse  $0,45\text{--}1,2 \mu\text{m}$ , die Aggregation des npAg mit sich selbst und zum Teil auf die Komplexbildung durch gelöste Stoffe zurückzuführen sein.

Von der Qualität des verwendeten Mediums seinerseits waren gegensätzliche Effekte auf npAg zu erwarten: Die Anwesenheit von  $\text{Cl}^-$  beschleunigt die Auflösung, organische Substanzen hingegen verlangsamten den Auflösungsprozess (Chen *et al.* 2013, Thio *et al.* 2012). Durch die stetige Belüftung des Mediums könnte der Sedimentation der Nanopartikel entgegengewirkt worden sein – auf der anderen Seite ist eine durch die Turbulenzen begünstigte Agglomeration vorstellbar, die wiederum zu erhöhten Sedimentationsraten und verminderter Auflösung als  $\text{Ag}^+$  geführt haben könnte (Chen *et al.* 2013). Oder aber die Belüftung beschleunigte im Gegenteil die Oxidation der Partikel und damit verbundene Auflösung als  $\text{Ag}^+$  (Loza *et al.* 2014).

Welchen Komponenten im hier verwendeten Versuchsaufbau die wichtigste Rolle bei der Beeinflussung des npAg (und des  $\text{Ag}^+$ ) zukommt, bleibt aufgrund der Komplexität des Systems spekulativ. Zumindest ist jedoch von einer guten Übertragbarkeit der Ergebnisse zum Auflösungs-, Aggregations und Ausfällungsverhalten dieses Versuchs auf das eigentliche Expositionsexperiment mit *D. polymorpha* auszugehen: Die Messergebnisse der ersten Versuchsminuten des *D. polymorpha*-Expositionsversuchs, während derer das Medium höchstwahrscheinlich noch nicht einem maßgeblichen Einfluss der Muscheln ausgesetzt war, befinden sich bezüglich Wiederfindungsrate in guter Übereinstimmung mit den im npAg-Verhaltensexperiment ermittelten Daten.



## 2 Silberaufnahme in den Testorganismen

### 2.1 *Dreissena polymorpha*

#### 2.1.1 Anreicherungsvermögen

Die vorliegende Arbeit vergleicht die Aufnahme von nanopartikulärem Silber (npAg) durch *D. polymorpha* mit der Aufnahme von gelöstem Silber ( $\text{Ag}^+$ ). Zur Abschätzung potentieller Gefahren durch npAg ist Kenntnis darüber, ob diese Silberspezies überhaupt in den Körper der Muschel gelangen kann, wichtig.

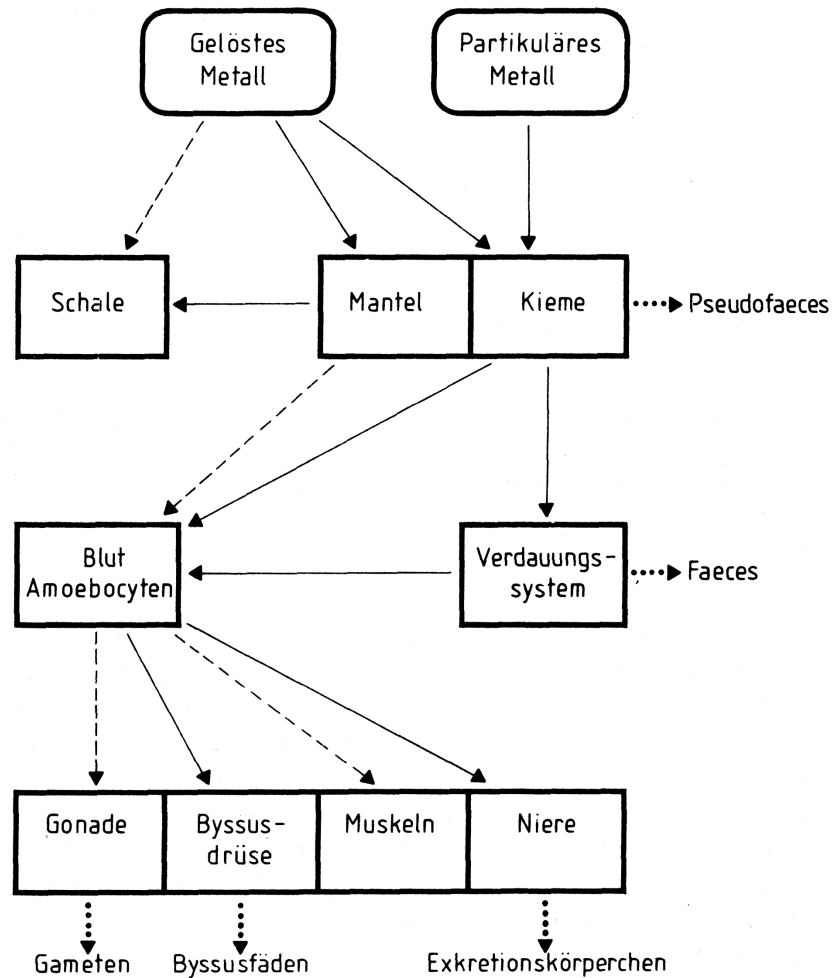
Der Biokonzentrationsfaktor (BCF) gibt an, wie stark sich eine Substanz in einem Organismus anreichert. Auf die Anreicherung von  $\text{Ag}^+$  im Gewebe von *D. polymorpha* bezogen betrug er 400, die Muscheln konzentrierten dargebotenes  $\text{Ag}^+$  also 400-fach auf. Der entsprechende Wert des  $\text{BCF}_{\text{npAg}}$  konnte nicht berechnet werden, da im Expositionsmedium der npAg-exponierten Muscheln kein Silber mehr nachweisbar war ( $< 0,005 \mu\text{g Ag/L}$ ). Bereits nach zwei Expositionstagen war das npAg durch die Anwesenheit von *D. polymorpha* komplett aus dem Medium entfernt worden (nominelle Expositionskonzentration  $100 \mu\text{g/L}$ ). Dass dieser Rückgang auf den Einfluss der Muscheln und nicht etwa auf Ausfällung zurückzuführen ist, zeigt der Vergleich mit dem unter II.2.2 (S. 17) beschriebenen Experiment, in dem die Versuchsparameter bis auf die Anwesenheit von Muscheln identisch waren. Unter diesen vom biogenen Einfluss durch *D. polymorpha* bereinigten Bedingungen blieb die Konzentration von npAg im Medium auf einem Niveau von mindestens  $20 \mu\text{g/L}$ .

Der BCF hängt hochgradig vom Versuchsdesign ab (statischer versus semi-statischer Aufbau, Expositionskonzentrationen, McGeer *et al.* 2003), sodass eine Aussage zum Anreicherungsverhalten im Freiland und der Vergleich mit anderen

Studien kaum möglich ist. Literaturangaben zum  $BCF_{Ag^+}$  reichen von 1 ( $0,1 \mu\text{g/L}$  Expositionskonzentration, statischer Versuch, Zimmermann *et al.* 2002) über 400 ( $400 \mu\text{g/L}$  Expositionskonzentration, täglicher Wasserwechsel, Berthet *et al.* 1992) bis hin zu  $> 1900$  ( $0,25 \mu\text{g/L}$  Expositionskonzentration, täglicher Wasserwechsel, Fraysse *et al.* 2002). Der hier ermittelte  $BCF_{Ag^+}$  bestätigt, dass *D. polymorpha* in der Lage ist,  $Ag^+$  anzureichern. Diese Anreicherung wurde wegen des statischen Versuchsaufbaus jedoch dadurch begrenzt, dass der Silber-Vorrat im Medium nach ca. zwei Tagen erschöpft war. Die Anreicherungs-kapazität von *D. polymorpha* liegt nachgewiesenermaßen deutlich höher als die hier beobachteten  $6 \mu\text{g Ag/g}$  Trockenmasse (bis zu  $400 \mu\text{g Ag/g TM}$ , Berthet *et al.* 1992). Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass durch die Beprobung der Muscheln dem gesamten Versuchssystem regelmäßig Silber entzogen wurde.

### 2.1.2 Organspezifische Aufnahmekinetik

Im Wasser suspendierte partikuläre Substanzen werden in Muscheln zunächst von den Kiemen zurückgehalten (Canesi *et al.* 2012, Morton 1971, vgl. Abb. IV.2.1, S. 75). Im Vergleich mit anderen filtrierenden Organismen weist *D. polymorpha* hierbei eine besonders hohe Effizienz auf und ist in der Lage, auch noch  $1 \mu\text{m}$  große Partikel zu  $90\%$  aus dem Wasser zu entfernen (Jørgensen *et al.* 1984). Sowohl npAg als auch  $Ag^+$  lagen im Medium des hier präsentierten Expositionsversuchs zum Großteil in Agglomeraten zwischen  $0,45$  und  $1,2 \mu\text{m}$  vor. Indem gezeigt werden konnte, dass der Konzentrationsrückgang des im Expositionsmedium vorliegenden npAg bis unter die Nachweisgrenze allein durch die Anwesenheit von *D. polymorpha* bedingt war, kann geschlussfolgert werden, dass *D. polymorpha* in der Lage war, sogar Partikel  $< 1,2 \mu\text{m}$  zu  $100\%$  aus dem Medium zu entfernen. Eine Filtrationsrate von  $150 \text{ mL/h}$  je Muschel angenommen (Kryger & Riisgård 1988, Morton 1971), hätten die anfangs eingesetzten  $400\text{--}450$  Muscheln das komplette Volumen des Versuchsaquariums innerhalb einer Viertelstunde filtriert. Von einer  $100\%$ -igen Rückhalte-Effizienz für Partikel der Größenklasse  $0,45\text{--}1,2 \mu\text{m}$  ausgegangen, hätte die npAg-Konzentration im Wasser also bereits zu diesem Zeitpunkt theoretisch nahe Null liegen müssen. Eine weitere Erklärung kann neben der Ineffizienz der Partikelrückhaltung in einer submaximalen Filtrationsleistung (Volumen/Zeit) zu suchen sein. Die Filtrationsleistung kann wegen Störungen, z. B. während der Messung der abiotischen Parameter, oder bei Nahrungsmangel, wie er im vorliegenden Experiment zutraf, abgesenkt sein



**Abbildung IV.2.1:** Metall-Aufnahmeschema in *Mytilus edulis*.  
Quelle: Schulz-Baldes (1982, S. 50).

(Roditi *et al.* 1996). Eine Einschränkung der Filtration wäre auch zu erwarten, wenn das Silber von den Muscheln als toxisch erkannt worden sein sollte (Buffet *et al.* 2013).

Nachdem die Partikel in den Kiemen abgefangen worden sind, werden sie mit Hilfe von Cilien dem Mund zugeführt, wo eine Selektion nach Größe, Masse und chemischer Beschaffenheit stattfindet (Baker *et al.* 1998, Morton 1969a, ten Winkel & Davids 1982). Hier aussortierte Partikel werden als Pseudofaeces ausgeschieden, die anderen gelangen ins Verdauungssystem (Abb. IV.2.1).

Die Komplexierung von  $\text{Ag}^+$  mit gelöster organischer Substanz führt in *D. polymorpha* zu einer verstärkten Silber-Aufnahme (Roditi *et al.* 2000), erklärbar dadurch, dass *D. polymorpha* imstande ist, sich von Detritus zu ernähren (Frischer *et al.* 2000, Garton *et al.* 2005) und die daran haftenden Metalle aufzunehmen.

Aus der mittels Mikrofiltration durchgeführten Größenklassifizierung des im Medium vorliegenden Silbers (0,45–1,2 µm) kann wiederum geschlossen werden, dass das Silber im hier durchgeführten Expositionsversuch im Medium an Detritus adsorbiert war und damit geeignet für die Aufnahme in *D. polymorpha* gewesen sein könnte.

Im Magen findet nochmals eine Auswahl nach Größe statt. Kleine Partikel gelangen zur weiteren Verdauung und Phagocytose in die Darmdivertikel, die übrigen werden direkt in den Mitteldarm weitergeleitet (Morton 1969a).

Nach der Aufnahme in den Körper wird das Silber über die Hämolymphe an andere Organe verteilt und kann von dort aus auf verschiedenen Wegen wieder ausgeschieden (Niere) oder eingelagert werden. Die Einlagerung erfolgt ins Gonadengewebe, in die Schale (Schulz-Baldes 1982, bei *Mytilus edulis*) oder auch in die Byssusdrüse bzw. -fäden (Gundacker 1999, Herwig *et al.* 1989). Die Byssusdrüse ging in vorliegender Arbeit bei der Beprobung der Muscheln in knapp 40 % der Fälle verloren und wurde deshalb keiner Silberbestimmung unterzogen. Die Silberkonzentration im Gonadengewebe wurde zwar untersucht, dort wurden jedoch im Vergleich zu den Organbereichen Mantel/Muskulatur und den Kiemen keine erhöhten Silberkonzentrationen festgestellt.

In der Miesmuschel (*Mytilus edulis*) ist der Verdauungstrakt der wichtigste Aufnahmeort für Gold-Nanopartikel, gefolgt von Kiemen und Mantel (Tedesco *et al.* 2010). Träfe diese Rangfolge auch auf *D. polymorpha* und Silber-Nanopartikel zu, wären nach npAg-Exposition im Organbereich Gonade/Verdauungstrakt die höchste, in den Kiemen die niedrigste Ag-Konzentration zu erwarten gewesen. Im Gegensatz dazu stellte sich die Ag-Konzentration im Gewebe aller Organbereiche npAg-exponierter *D. polymorpha* sehr ähnlich dar. Möglicherweise wird npAg in *D. polymorpha* in keinem speziellen Organ angereichert, sondern innerhalb kurzer Zeit von den Aufnahmeorten, seien es die Kiemen, der Darm oder gar der Mantel, auf den Organismus verteilt. Berücksichtigt werden muss die 24-stündige Reinigungsphase, die in dieser Arbeit der Tötung der Muscheln vorweg ging. Währenddessen könnte eine anfangs heterogene Silberverteilung im Organismus ausgeglichen worden sein.

Gelöstes Silber ( $\text{Ag}^+$ ) kann durch Adsorption und anschließendes Passieren der Zellmembran aus dem Wasser in *D. polymorpha* gelangen (Roditi & Fisher 1999). Hierbei kämen aufgrund des hohen Durchsatzes von Expositionsmedium die

Kiemen als wichtigste Eintrittspforte in Betracht (Marigómez *et al.* 2002). Allerdings wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass in den Kiemen bei  $\text{Ag}^+$ -Exposition im Vergleich zu den anderen Organen keine außergewöhnliche Ag-Anreicherung stattfand. Zudem lag im Medium der Expositionsversuche  $\text{Ag}^+$  zu einem großen Teil gar nicht gelöst, sondern in einer Größe von 0,45–1,2  $\mu\text{m}$  und somit vermutlich an partikuläre Substanzen adsorbiert vor. Dass das  $\text{Ag}^+$  in dieser adsorbierten Form und nicht in der gelösten Form von *D. polymorpha* aufgenommen worden sein könnte, wird von Untersuchungen von Roditi & Fisher (1999) gestützt. Die Autoren zeigten, dass die direkte  $\text{Ag}^+$ -Aufnahme über die Zellmembran mit einer um ein bis zwei Größenordnungen niedrigeren Effizienz vonstattengeht als die Aufnahme von  $\text{Ag}^+$ , welches an (Nahrungs-)Partikel gebunden ist. Schlussfolgernd müsste  $\text{Ag}^+$ , ähnlich wie  $\text{npAg}$ , in *D. polymorpha* vor allem im Darm bzw. dem Organbereich Gonade/Verdauungstrakt hohe Konzentrationen erreichen. Da diese Beobachtung nicht gemacht wurde, könnte, wie auch bei den Überlegungen zur  $\text{npAg}$ -Aufnahme, die 24-stündige Reinigungsphase für die Nivellierung möglicher Akkumulationsunterschiede verantwortlich sein.

### 2.1.3 Subzelluläre Verteilung

Die nach Wallace *et al.* (2003) durchgeführte Zellfraktionierung ermöglicht die Betrachtung der Silberverteilung auf Zellkompartiment-Ebene. Hierdurch können Rückschlüsse auf Eintrittswege des Metalls in die Zelle, seine Speicherung, sein toxisches Potential und seine Ausscheidung gezogen werden. Am 1. und 7. Expositionstag wurden von Muscheln der  $\text{npAg}$ - und  $\text{Ag}^+$ -Ansätze im Gesamt-Weichgewebe und in jedem der drei Organbereiche (Mantel/Muskulatur, Kiemen, Gonade/Verdauungstrakt) je fünf Fraktionen untersucht: Membranen + „Rest“, Kern/Lysosomen/Mitochondrien, Proteine, Metallothioneine und metallreiche Granula. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zellfraktionierung an *D. polymorpha* in der genannten Reihenfolge diskutiert.

**Membranen + „Rest“** Die Wiederfindung von Silber im Kompartiment Membranen + „Rest“ erlaubt aufgrund der Heterogenität dieser Zellfraktion keine eindeutigen Rückschlüsse auf Aufnahme-, Detoxifizierungs- und Ausscheidungswege. Die Ag-Konzentration in diesem Kompartiment kann durch im Darm-Lumen vorliegendes Silber verfälscht worden sein, weil die Muscheln

ohne 24-stündige Reinigungsphase beprobt wurden. Dann wären vor allem im Organbereich Gonade/Verdauungstrakt in diesem Kompartiment hohe Ag-Konzentrationen zu erwarten gewesen. Diese Annahme wurde jedoch nicht bestätigt, da im Membranen + „Rest“-Kompartiment der anderen Organbereiche ähnliche Ag-Konzentrationen ermittelt wurden.

Silber kann auch in der Basalmembran gespeichert werden, was George *et al.* (1986) an *Mytilus edulis* zeigte. Wenn hiervon die Basalmembranen aller Organbereiche gleichmäßig betroffen und die Ergebnisse auf *D. polymorpha* übertragbar wären, könnte dieser Speicherort die in allen Organbereichen ähnlich hohe Ag-Konzentration des Membranen + „Rest“-Kompartiments in *D. polymorpha* erklären. George *et al.* (1986) untersuchte jedoch nur die Basalmembran der Darmdivertikel und der Niere, sodass diese Überlegung spekulativ bleibt.

**Kern/Lysosomen/Mitochondrien** Laut Wallace *et al.* (2003) bezeichnet dieses Kompartiment Membran-umschlossene „Organellen“, genauer den Zellkern, die Lysosomen und die Mitochondrien. Beim Austausch partikulärer Substanzen in der Zelle spielen unter diesen Dreien jedoch nur die Lysosomen eine wesentliche Rolle (Alberts *et al.* 1999), weshalb im Folgenden mögliche Metall-Stoffwechselfunktionen des Zellkerns und der Mitochondrien nicht berücksichtigt werden und der Name des Kompartiments der Einfachheit halber zu „Lysosomen“ verkürzt wird.

Lysosomen dienen der intrazellulären Verdauung und sind mittels Transportvesikeln (auch Transportvakuolen genannt) mit der Zellmembran verbunden, wo durch Endo- und Exocytose partikuläre Substanzen aufgenommen oder nach außen abgegeben werden können (Alberts *et al.* 1999). Weiterhin können Lysosomen innerhalb der Zelle ihren Inhalt an Speichervesikel weitergeben (Brown 1982). Aus biologischer Sicht kann davon ausgegangen werden, dass sowohl Transport- als auch Speichervesikel der Lysosomen-Fraktion zuzuordnen sind, obwohl im Protokoll der Zellfraktionierung (Wallace *et al.* 2003) diese Vesikel nicht explizit genannt werden. In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass der Begriff „Lysosomen“ die Vesikel mit einschließt.

In *D. polymorpha* war am ersten Expositionstag bei npAg-Exposition der Großteil des im Organbereich Gonade/Verdauungstrakt aufgenommenen Silbers in den Lysosomen wiederzufinden. Diese Beobachtung wird bestätigt durch eine Studie

von Renault *et al.* (2008), welche in der Asiatischen Korbchenmuschel (*Corbicula fluminea*) die Lysosomen des Verdauungstrakts als Aufnahmeort für Gold-Nanopartikel identifizierten. In *Corbicula fluminea* wurden Gold-Nanopartikel zudem in den Lysosomen der Kiemen nachgewiesen (Renault *et al.* 2008). Die Kiemen von *D. polymorpha* dagegen zeigten keine Tendenz, npAg bevorzugt in Lysosomen aufzunehmen oder zu speichern.

Lysosomen weisen im Inneren einen pH-Wert von etwa 5 auf (Alberts *et al.* 1999). Ein derart saures Milieu könnte innerhalb einiger Tage die teilweise Lösung des anfänglich als Nanopartikel inkorporierten Silbers als  $\text{Ag}^+$  bewirkt haben (Peretyazhko *et al.* 2014). Davon ausgehend, dass Lysosomen per se nicht in der Lage sind, Silber zu detoxifizieren (Wallace *et al.* 2003 stufen sie als „Metall-sensitive“ Fraktion ein), müsste dass Silber nach der Auflösung in andere Zellkompartimente verschoben worden sein, um Zellschäden zu vermeiden. Liefere die hypothetisierte npAg-Auflösung ausreichend schnell ab, könnte bereits am 7. Expositionstag in der Lysosomenfraktion weniger Silber nachweisbar sein als an Tag 1. Die hier beobachtete relative Abnahme des Silber-Anteils in der Lysosomenfraktion im Organbereich Gonade/Verdauungstrakt vom 1. zum 7. Expositionstag bestätigt dies.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den npAg- und den  $\text{Ag}^+$ -exponierten Muscheln bestand darin, dass sich im Organbereich Gonade/Verdauungstrakt  $\text{Ag}^+$ -exponierter Muscheln der Anteil des in Lysosomen vorliegenden Silbers vom 1. zum 7. Expositionstag genau entgegengesetzt entwickelte, nämlich zunahm. Dieses Ergebnis lässt sich mit Beobachtungen von Domouhtsidou & Dimitriadis (2000) in Übereinstimmung bringen: Nach Langzeit-Exposition gegenüber  $\text{Ag}^+$  war Silber in Mittelmeer-Miesmuscheln (*Mytilus galloprovincialis*) vor allem in Lysosomen und Speichervesikeln der Verdauungszellen wiederzufinden. Auch die Silber-Einlagerung in Makrophagen des Bindegewebes, wie sie in  $\text{Ag}^+$ -exponierten *Mytilus edulis* nachgewiesen wurde (George *et al.* 1986) bestätigt die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, sofern von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse von einer Muschelart auf die andere ausgegangen werden kann. Makrophagen sind darauf spezialisiert, Partikel durch Endocytose aufzunehmen, was mit Hilfe von Vesikeln geschieht (Alberts *et al.* 1999). In den Vesikeln befindliches Silber wäre somit ebenfalls im Lysosomen-Kompartiment nachgewiesen worden.

In wieweit dieses Ergebnis mit der oben geäußerten Annahme, dass gelöstes Silber, also  $\text{Ag}^+$ , aus den Lysosomen vielmehr entfernt statt eingelagert werden

sollte, in Einklang zu bringen ist, wird im Absatz zu den „metallreichen Granula“ diskutiert werden.

**Proteine** Neben der Kern-/Lysosomen-/Mitochondrien-Fraktion gilt die Wiederfindung von Silber im Kompartiment der (hitzeempfindlichen) Proteine als Hinweis auf potentielle Toxizität (Wallace *et al.* 2003). In *D. polymorpha* war in dieser Zellfraktion, unabhängig von Silber-Expositionsspezies, Expositionstag und Organbereich eine äußerst geringe Menge des Silbers nachzuweisen (nahe oder unter der Bestimmungsgrenze von 0,016 µg Ag/L), was auf eine geringe Proteotoxizität schließen lässt.

**Metallothioneine** Ein Kompartiment, in welchem Silber in detoxifizierter Form vorliegt, ist jenes der Metallothioneine. Metallothioneine sind hitzestabile Proteine, die zu etwa 30 % aus der Aminosäure Cystein bestehen, Metalle reversibel binden können (Cherian & Goyer 1978) und als Puffer beim ersten Kontakt mit toxischem Metall interpretiert werden können. An ihnen gebundenes Silber ist detoxifiziert, für die Zelle also unschädlich (Wallace *et al.* 2003).

Die Zellfraktionierung dieser Arbeit zeigte, dass bei Ag<sup>+</sup>-Exposition der Anteil des an Metallothionein gebundenen Silbers am ersten Versuchstag in allen drei Organbereichen am größten war, was dafür spricht, dass Ag<sup>+</sup> in potentiell toxischer Form von allen Organen aufgenommen und sogleich detoxifiziert wurde.

Berthet *et al.* (1992) zeigten am Gesamt-Weichgewebe von Ag<sup>+</sup>-exponierten *D. polymorpha*, dass 77 % des aufgenommenen Silbers in unlöslicher Form vorlagen (Ag<sub>2</sub>S) und die übrigen 23 % einer Thiol- (S–H) reichen Fraktion zuzuordnen waren. Diese Thiol-reiche Fraktion könnten Metallothioneine gewesen sein, weil diese teilweise aus der Aminosäure Cystein bestehen, welches eine solche Thiol-Gruppe enthält. Zudem repräsentierte die Metallothionein-Fraktion in der Gesamt-Weichgewebe-Probe dieser Arbeit einen ähnlichen Prozentsatz des aufgenommenen Silbers wie die von Berthet *et al.* (1992) genannten 23 %: Hier lagen 34 % (1. Tag) bzw. 19 % (7. Tag) des Silbers an Metallothionein gebunden vor. Dass der übrige Silberanteil, der nicht an die Metallothioneine gebunden war, wie bei Berthet *et al.* (1992) unlöslich gewesen sein könnte, erklärt der folgende Absatz.



**Metallreiche Granula** Metallreiche Granula (im Folgenden nur „Granula“ genannt) sind kristalline, einige Mikrometer große Strukturen, die in der Lage sind,  $\text{Ag}^+$  (und andere Metalle) durch irreversible Bindung zu detoxifizieren. Granula können, im Gegensatz zu Metallothioneinen, ausgeschieden werden (Brown 1982).

Durch ihre Eigenschaft, innerhalb membranbegrenzter Strukturen (Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Reticulum, welche durch Zellfraktionierung dem Kompartiment Membranen + „Rest“ zuzuordnen sind), in den Mitochondrien und in Vesikeln aufzutreten (Brown 1982), ergeben sich Überschneidungen mit zwei anderen Zellkompartimenten, nämlich der Membranen + „Rest“- und der Kern-/Lysosomen-/Mitochondrien- (= Lysosomen-) Fraktion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Vergleich mit anderen Studien legen die Vermutung nahe, dass die Zellfraktionierung die Lysosomen nicht von ihrem Inhalt zu trennen vermochte. Dieses Bedenken äußerte der Autor des Protokolls selbst (Wallace *et al.* 2003).

Der Logik der Detoxifizierungsmechanismen der Zelle folgend, wäre zumindest nach  $\text{Ag}^+$ -Exposition zu erwarten, dass ein Teil des Silbers an den Granula gebunden wiederzufinden wäre. Bestätigt wird diese Annahme von Berthet *et al.* (1992), die zeigten, dass nach  $\text{Ag}^+$ -Exposition in *D. polymorpha* 77 % des Silbers im Gewebe in unlöslicher Form vorlag, was gleichbedeutend ist mit der Detoxifizierung durch die Bindung an Granula. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit jedoch nicht gemacht werden. Auch nach npAg-Exposition und der vermuteten Freisetzung von  $\text{Ag}^+$  in den Lysosomen befand sich kaum Silber im Kompartiment der Granula. Dieser Widerspruch könnte durch die Annahme aufgelöst werden, dass die Bindung des Silbers an metallreiche Granula, die in andere Kompartimente integriert wurden, maskiert wurde. Die Methodik der Zellfraktionierung hat diese Integrierung möglicherweise nicht aufheben können, sodass das wiedergefundene Silber „falschen“ Kompartimenten zugeordnet und nicht in der Granula-Fraktion nachgewiesen werden konnte.

Als Kompartiment, in dem das Silber maskiert vorgelegen haben könnte, käme zum Einen das Kompartiment der Lysosomen in Frage, was die Ergebnisse von Domouhtsidou & Dimitriadis (2000) bestätigen würden. Die Autoren fanden Silber nach  $\text{Ag}^+$ -Exposition in den Lysosomen wieder, obgleich es in der Metallothionein- oder Granula-Fraktion zu erwarten gewesen wäre. Dasselbe

trifft auf die Studie von George *et al.* (1986) zu, in der Silber in *Mytilus edulis* nach  $\text{Ag}^+$ -Exposition in den Makrophagen bzw. in deren Vesikeln (= Lysosomen) wiederzufinden war. Die Ergebnisse von Berthet *et al.* (1992), die nach  $\text{Ag}^+$ -Exposition in *D. polymorpha* Silber in der Basalmembran (= in der Membranen + „Rest“- Fraktion) nachwiesen, lassen den Schluss zu, dass die Granula nicht nur in der Lysosomen-, sondern auch in der „Membranen + Rest“-Fraktion versteckt vorlagen.

Den „Maskierungs-Effekt“ berücksichtigend, bestätigen die hier dargestellten Ergebnisse zur subzellulären Silberverteilung in *D. polymorpha* die von Marigómez *et al.* (2002) aus verschiedensten Studien zusammengetragenen Erkenntnisse zu Aufnahme-, Verteilungs- und Einlagerungsprozessen in Muscheln. Die Silberaufnahme in *D. polymorpha* ließe sich nun durch folgendes Schema für npAg und  $\text{Ag}^+$  beschreiben:

$$\text{npAg} \longrightarrow \text{Lysosomen} \xrightarrow{\text{Auflösung}} \text{Granula} \longrightarrow \text{Lysosomen/Membranen}$$

$$\text{Ag}^+ \longrightarrow \text{Metallothioneine} \longrightarrow \text{Granula} \longrightarrow \text{Lysosomen/Membranen}$$

Sowohl npAg als auch  $\text{Ag}^+$  würden nach Aufnahme durch die Muschel innerhalb der Zellen letztlich an Granula gebunden und, in maskierter Form, entweder in der Lysosomen-Fraktion oder, nach Einlagerung in die Basalmembran, in Membranen + „Rest“- Fraktion nachzuweisen sein.

## 2.2 *Marisa cornuarietis*

Silber- (Ag) Aufnahme oder -Anreicherung ist an *M. cornuarietis*-Embryonen oder adulten Individuen dieser Art noch nicht untersucht worden. Die vorliegende Arbeit präsentiert somit erste Ergebnisse zu dieser Thematik. Ein Vergleich mit anderen Studien ist hierbei stets unter Vorbehalt anzustellen, da entweder die Expositionssubstanz, die Schneckenart oder das Entwicklungsstadium (oder eine Kombination dieser drei) nicht mit den hier gegebenen Parametern übereinstimmen.

Von Silber ist bekannt, aus dem Medium von adulten *Lymnaea stagnalis*-Schnecken aufgenommen werden zu können (Croteau *et al.* 2011). Einen Vergleich mit den in jener Studie angegebenen Biokonzentrationsfaktoren (BCF) ist wegen der stark abweichenden Versuchsbedingungen jedoch nicht sinnvoll (McGeer *et al.* 2003). Über Ag-Aufnahme in Schnecken-Embryonen ist kaum etwas bekannt. Croteau *et al.* (2014) konnten eine Abhängigkeit zwischen der Größe der *Lymnaea stagnalis*-Schnecken und der Ag-Aufnahmerate identifizieren: Je kleiner die Schnecken, desto höher die Aufnahmerate. Hieraus ließe sich auf eine im Vergleich zu adulten Tieren besonders starke Silberaufnahme in Embryonen schließen.

Dass  $\text{Ag}^+$  die Eihülle durchdringen kann, wurde von Conrad & Wells (1998) anhand der Meeresschnecke *Ilyanassa obsoleta* dargelegt. In vorliegender Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass  $\text{Ag}^+$  in die Eier von *M. cornuarietis* gelangt und dort eine Konzentration von 220  $\mu\text{g Ag/g TM}$  erreicht. Auch npAg wird von den Schnecken aufgenommen, erreicht jedoch geringere Gewebekonzentrationen (160  $\mu\text{g Ag/g TM}$ ), obgleich die npAg-Expositionskonzentration etwa 8-fach höher war als diejenige des  $\text{Ag}^+$ -Ansatzes (tatsächliche Expositionskonzentrationen ca. 52 versus 6  $\mu\text{g Ag/L}$ ).

Die Diskrepanz zwischen npAg- und  $\text{Ag}^+$ -Anreicherung könnte auf die Größe des angebotenen Silbers zurückzuführen sein. Weil die Eihülle zur Aufrechterhaltung des embryonalen Stoffwechsels semi-permeabel sein muss, d. h. durchlässig für Gase, aber gleichzeitig undurchlässig gegenüber höhermolekularen Stoffen, um einer Diffusion von Speicherstoffen aus dem Ei hinaus vorzubeugen, könnten die Poren gerade groß genug beschaffen sein, um  $\text{Ag}^+$  passieren zu lassen, npAg hingegen vom Eintritt ins Ei abzuhalten. Dieser Effekt geringerer Anreicherung in Embryonen tritt selbst bei von *Marisa cornuarietis* phylogenetisch weit

entfernten Gruppen wie dem Zebrafisch *Danio rerio* auf (AshaRani *et al.* 2011, López-Serrano *et al.* 2014).

Auch die Ergebnisse zur Aufnahme von „altem“ npAg untermauern die Hypothese der Größenabhängigkeit. Zu erwarten gewesen wäre bei Exposition mit 10 µg „altem“ npAg/L (tatsächliche Expositionskonzentration 5,5 µg Ag/L), wenn von keinem Größenunterschied zwischen npAg und Ag<sup>+</sup> ausgegangen wird, dass solcherart exponierte Schnecken die gleiche Menge Silber aufnehmen wie die des entsprechend konzentrierten Ag<sup>+</sup>-Ansatzes (10 µg/L nominell, tatsächliche Expositionskonzentration 6 µg Ag/L). Dies war nicht der Fall, sondern die Embryonen nahmen weniger „altes“ npAg auf als Ag<sup>+</sup>. Rund 50 % des „alten“ npAg lag agglomeriert vor, die übrigen 50 % lagen gelöst, also als Ag<sup>+</sup> vor. Es wird vermutet, dass es nur dieser gelöste Silber-Anteil war, der in die Schnecken gelangte.

Diese Unterstellung würde bedeuten, dass mit npAg „neu“ exponierte Schnecken gar kein Silber aufgenommen haben dürften. Trotzdem war im npAg „neu“-Ansatz Silber im Gewebe nachzuweisen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in frisch synthetisiertem (= „neuem“) npAg zu einem geringen Prozentsatz Ag<sup>+</sup> vorliegt. Ein weiterer Grund liegt im Versuchsablauf, der zwar täglichen Wasserwechsel vorsah, nicht jedoch verhindern konnte, dass das npAg während der dazwischenliegenden 24 h altern, d. h. Ag<sup>+</sup> freisetzen konnte (Kittler *et al.* 2010). Zum Dritten kann in der Beprobungsmethodik der geschlüpften Schnecken eine Eintragsquelle von Silber zu suchen sein, waren die Embryonen nach dem Schlupf doch bis zur Entfernung aus dem Wasser maximal 24 h ohne Eihülle dem Expositionsmedium ausgesetzt.

Das Anreicherungsvermögen von npAg und Ag<sup>+</sup> lässt sich auf Grundlage des Biokonzentrationsfaktors (BCF) mit anderen Studien vergleichen. Voraussetzungen sind jedoch identische Versuchsbedingungen wie die Häufigkeit des Wasserwechsels und die Expositionskonzentration. Andere Publikationen zum *Marisa* Embryo Toxicity Test (*MariETT*), in denen Versuchsaufbau und -ablauf (täglicher Wasserwechsel, Exposition in Petrischalen) mit vorliegender Studien übereinstimmen, berücksichtigten lediglich die durch Metall-Exposition veränderten embryotoxischen Parameter, nicht aber die Aufnahme der Expositionssubstanz (z. B. Sawasdee & Köhler 2010, Schirling *et al.* 2006). Eine gute Vergleichbarkeit der Anreicherungsfähigkeit von *M. cornuarietis*-Embryonen ergibt sich jedoch mit dem von Osterauer *et al.* (2009) mit Platin-Exposition durchgeführten *MariETT*.

Der Versuchsaufbau stimmte überein, ausgenommen die chemische Wasserzusammensetzung. In dieser Studie wurde rekonstituiertes Wasser verwendet, eine auf deionisiertem Wasser basierende Salzlösung, Osterauer *et al.* (2009) nutzten Leitungswasser. Bei 3,6 µg Platin (Pt)/L tatsächlicher Expositions-Konzentration wurde von Osterauer *et al.* (2009) für *M. cornuarietis* ein Biokonzentrationsfaktor (BCF) von ca. 500 ermittelt. In dieser Arbeit sind mit jener Expositions-konzentration am ehesten die niedrigst-konzentrierten npAg „alt“- und Ag<sup>+</sup>-Ansätze zu vergleichen (nominell 10 µg/L, tatsächlich 5,5 bzw. 6 µg Ag/L): „Altes“ npAg wurde von *M. cornuarietis* stärker als Platin angereichert, nämlich 1200-fach. Eine noch stärkere Anreicherung erfuhr Ag<sup>+</sup>, für welches ein BCF von 3700 ermittelt wurde.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nanopartikulär vorliegendes Silber von *M. cornuarietis*-Embryonen in deutlich geringerem Umfang aufgenommen wird als Ag<sup>+</sup>, weil es vermutlich nicht durch die Eihülle zum Embryo vordringen kann. Erst die Lösung von npAg in Ag<sup>+</sup>, wie sie im „alten“ npAg anzutreffen war, ermöglicht die Aufnahme von Silber im (ursprünglich) npAg-exponierten Embryo. Im Vergleich mit anderen Metallen wird Ag<sup>+</sup> von *M. cornuarietis*-Embryonen rund siebenmal stärker angereichert als Pt<sup>2+</sup>.

### 3 Auswirkungen in den Testorganismen

Die Untersuchung der Akkumulation von npAg in den Testorganismen *Dreissena polymorpha* und *Marisa cornuarietis* lässt nur indirekte Rückschlüsse darauf zu, in wieweit die Tiere hierdurch Schädigungen erfahren haben (Berthet *et al.* 1992, Vijver *et al.* 2004). Der Zusammenhang zwischen Aufnahme von Silber und toxischen Effekten lässt sich nach Rainbow (2002) folgendermaßen beschreiben (Abb. IV.3.1): Aufgenommenes Silber ist zunächst noch metabolisch verfügbar und wird reversibel detoxifiziert (an Metallothioneinen, Wallace *et al.* 2003), später irreversibel gebunden und im Körper gespeichert (z. B. in metallreichen Granula, Brown 1982) und letztlich exkretiert, ohne dass der Organismus geschädigt wird.

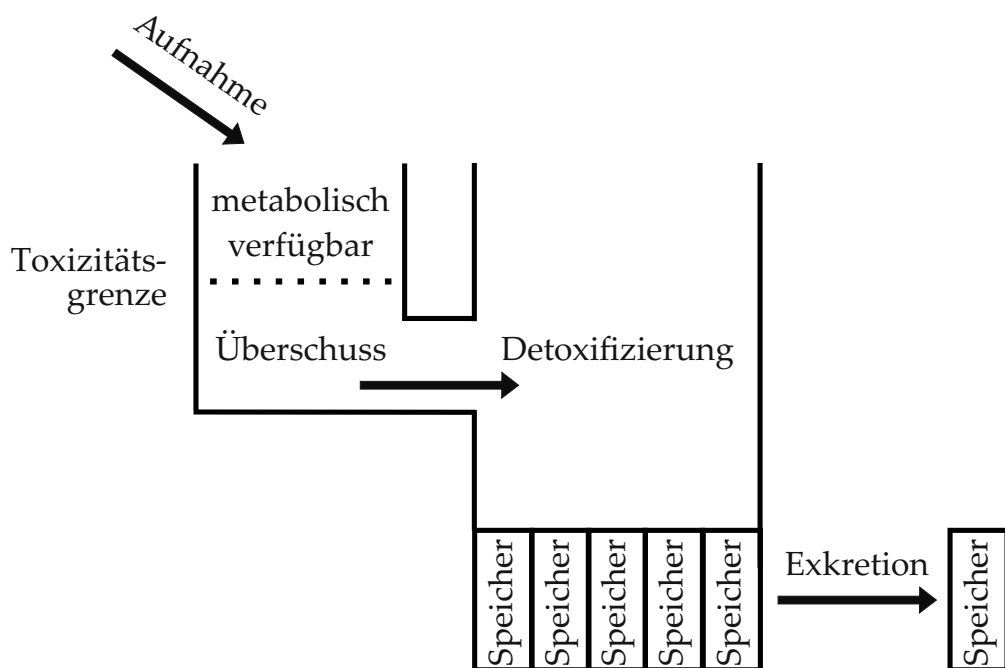


Abbildung IV.3.1: Silber-Detoxifizierungswege in Organismen. Nach Rainbow (2002).

Wenn bei weiterer Silberaufnahme die Detoxifizierungs-, Speicher- und Exkretionsfähigkeit erschöpft ist, entsteht ein Silber-Überschuss, durch den Silber in Kontakt mit sensitiven Zellbestandteilen gerät, z. B. dem Protein-Kompartiment (nach Wallace *et al.* 2003). Diese Interaktion führt ab Überschreiten einer bestimmten Grenze zu toxischen Effekten. Erst der Nachweis und die Quantifizierung dieser Effekte erlauben stichhaltige Aussagen zu den ökotoxikologischen Folgen von npAg-Exposition und -Aufnahme. Dieser Nachweis kann mit Hilfe der Untersuchung von Biomarkern gelingen.

Biomarker sind qualitativ und/oder quantitativ analysierbare Eigenschaften von Organismen, die das Ausmaß von Stress widerspiegeln. In *D. polymorpha* wurden ein morphologischer und drei molekulare Biomarker untersucht, in *M. cornuarietis* vier Biomarkerantworten auf Ebene der Embryonalentwicklung.

### 3.1 *Dreissena polymorpha*

#### 3.1.1 Fitness-Index

Fitness-Indizes (FI) können durch die Berechnung des Massen-, Längen- oder Volumen-Verhältnisses verschiedener Körperteile zueinander als Maß für die allgemeine Fitness von *D. polymorpha* genutzt werden (Rahnama *et al.* 2011, Singer *et al.* 2005, Sprung & Borchering 1991).

Der in vorliegender Arbeit aus dem Quotienten von Weichgewebe- und Schalenmasse berechnete FI nach Schäfer (2012) veränderte sich während des gesamten Expositionszeitraums von bis zu drei Wochen in keinem der Versuchsansätze. Diese Konstanz kann darauf zurückzuführen sein, dass die Muscheln vor Versuchsbeginn mehr als drei Monate lang ohne Fütterung im Labor gehalten wurden. Während einer solchen Zeitspanne verringert sich die Weichgewebemasse in *D. polymorpha* etwa um die Hälfte, wobei die Massenabnahme am Anfang schneller abläuft als nach drei Monaten (Frischer *et al.* 2000). Durch den langandauernden Nahrungsmangel könnte der FI zum Zeitpunkt des Expositionsversuchs bereits auf ein Minimum abgesunken sein, welches durch die im Verhältnis kurze, dreiwöchige Silber-Exposition nicht mehr beeinflusst werden konnte. Allerdings führten mehrwöchige Expositionen gegenüber Metallen, bei denen die Muscheln vor Versuchsbeginn nur bis zu zwei Wochen im Labor

verbrachten, ebenfalls zu keiner Änderungen des FI (Kiany 2010, Rahnama *et al.* 2011, Singer *et al.* 2005). Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung von Voets *et al.* (2009), dass Fitness-Indizes nicht mit der Menge akkumulierter Schadstoffe korrelieren. Sie spiegeln vielmehr Ernährungszustand, Reproduktionszyklus und das Temperaturregime wider (Borcherding 1992a, Schneider 1992).

### 3.1.2 Proteotoxizität

Auf molekularer Ebene ist die Ausprägung von Hitzeschockproteinen der Molekülgewichtsklasse 70 kDa = HSP 70 als unspezifischer Biomarker für Proteotoxizität bekannt (Snyder *et al.* 2001). In Süßwassermuscheln kann npAg-Exposition die Konzentration von HSP 70 beeinflussen (Gagné *et al.* 2013).

Die Silber-Expositionsversuche dieser Arbeit hatten jedoch keine Auswirkung auf die HSP 70-Konzentration in *D. polymorpha*, was allerdings nicht zwangsläufig bedeutet, dass die HSP 70 in diesem Organismus überhaupt nicht auf Ag<sup>+</sup>- bzw. npAg-Exposition reagieren.

Dass die Silber-Exposition in *D. polymorpha* keinerlei Reaktion auf HSP 70-Ebene hervorrief, lässt sich anhand der subzellulären Verteilung des akkumulierten Silbers, welche durch die Methode der Zellfraktionierung (II.3.2.4, S. 25) nach Wallace *et al.* (2003) aufgedeckt werden konnte, nachvollziehen. Dadurch, dass kaum Silber im Metall-sensitiven Proteinkompartiment vorlag, war eine Interaktion zwischen diesen Proteinen und Silber gar nicht erst möglich. Die Zellfraktionierung zeigte vielmehr, dass Silber im Gewebe in detoxifizierter Form an Metallothioneine, metallreiche Granula oder (vermutlich) bereits in Speichervesikeln gebunden war. Entsprechend war der Bedarf der Zellen an HSP 70 zur Reparatur beschädigter Proteine nicht über das Normalmaß (= Kontrolle) hinaus erhöht. Eine HSP 70-Induktion kann jedoch in zeitlich sehr eingegrenztem Umfang vonstatten gehen (Singer *et al.* 2005), sodass durch zu weite Beprobungsintervalle oder zu kurze Versuchsdauer ein Effekt auf die HSP 70 nicht erfasst worden sein könnte. Bei den 70 Tage währenden Versuchen von Singer *et al.* (2005) mit Platingruppenelement- und Schwermetall-Exposition beschränkte sich die Erhöhung der HSP 70-Konzentration in *D. polymorpha* auf ein Zeitfenster zwischen Tag 25 und 40. Auch die Beobachtung, dass in allen Organbereichen ungefähr dieselbe HSP 70-Konzentration vorlag, ist nicht selbstverständlich. Die Kiemen, aufgrund des Wasserdurchflusses Schadstoffen besonders ausgesetzte



Organe, können im Vergleich zu anderen Organbereichen entweder eine raschere (Exposition mit  $\text{Cu}^{2+}$ , Navarro *et al.* 2011) oder verzögerte HSP 70-Induktion zeigen (Exposition mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, Châtel *et al.* 2012), sodass sich zwischen den Organbereichen ein heterogenes Bild bieten kann.

### 3.1.3 Oxidativer Stress

Ein weiterer Indikator toxischer Belastung ist das Ausmaß oxidativen Stresses. Exposition mit npAg führt (nicht nur) in Muscheln zu ebendiesem Stress (Buffet *et al.* 2013, Gagné *et al.* 2013, McCarthy *et al.* 2013, Navarro *et al.* 2011). Daraufhin werden Schutz- und Detoxifizierungsmechanismen initiiert, die beispielsweise durch Glutathion-S-Transferasen (GST) Katalase katalysiert werden (Armstrong 1997, Burmester *et al.* 2012, Navarro *et al.* 2011, Parolini & Binelli 2014).

Die Aktivität keines dieser beiden Enzyme wurde in *D. polymorpha* durch die Silber-Exposition beeinflusst. Als Erklärung kann wiederum die erfolgreiche Detoxifizierung des aufgenommenen Metalls vermutet werden, auf welche die Zellfraktionierung Hinweise gab. Die im Vergleich mit anderen Mollusken sehr hohe Toleranz von *D. polymorpha* gegenüber akkumuliertem Silber (Gewebekonzentrationen von  $400 \mu\text{g Ag/g TM}$ , Berthet *et al.* 1992) spricht für ein effizientes Detoxifizierungs- und Speichervermögen von Silber, welches oxidativen Stress von Anfang an verhindert.

Dass in vielen Mollusken GST und Katalase auf npAg-Exposition mit uneinheitlichen, teils genau entgegengesetzten oder gar keinen Aktivitätsmustern reagieren (Ali *et al.* 2014, Buffet *et al.* 2013, McCarthy *et al.* 2013), spricht dafür, dass die antioxidative Abwehr in Mollusken auf weit mehr als GST und Katalase beruht; einem komplexen Geflecht mehrerer Enzyme, deren Zusammenspiel noch nicht verstanden ist. In *D. polymorpha* werden bei oxidativem Stress weitere Enzyme wie z. B. Superoxid-Dismutase oder Glutathion-Peroxidase aktiv (Contardo-Jara *et al.* 2009, Parolini & Binelli 2014). Der Nachweis der Aktivität einzelner Bestandteile dieses Netzwerks lässt keinen Rückschluss auf die Wirksamkeit bzw. Aktivität des Gesamtsystems zu.

In vorliegender Arbeit gelang durch die Betrachtung zweier dieser Enzyme in *D. polymorpha* der Nachweis, dass GST und Katalase weder nach einem noch nach sieben Expositionstagen in  $100 \mu\text{g npAg/L}$  in potentielle antioxidative

Schutzmechanismen involviert waren. Auch wenn durch die Zellfraktionierung gezeigt wurde, dass npAg in Partikelform in die Zellen gelangt, konnten Befürchtungen, die Nanopartikeln eine Wirkungsweise gleich eines Trojanischen Pferdes (Limbach *et al.* 2007, bei Cobalt- und Manganoxid-Nanopartikeln in menschlichen Lungenzellen) unterstellen, entkräftet werden. *Dreissena polymorpha* scheint in der Lage zu sein, unter den hier gegebenen Expositionsbedingungen das aufgenommene Silber, unabhängig davon, ob als npAg oder  $\text{Ag}^+$  angeboten, vollständig zu detoxifizieren.

## 3.2 *Marisa cornuarietis*

Der in dieser Arbeit durchgeführte *Marisa* Embryo Toxicity Test, angelehnt an das Protokoll von Schirling *et al.* (2006), verglich an den noch im Ei befindlichen Schnecken durch npAg-Exposition aufgetretene embryotoxische Effekte mit den Effekten, die durch  $\text{Ag}^+$ -Exposition und Exposition mit gealtertem npAg auftraten.

### 3.2.1 Embryotoxizität

Auf Silber-Exposition reagierte *M. cornuarietis* mit erhöhter Mortalität, reduzierter Entwicklungsdauer, geringfügig vermindertem Körpergewicht und verlangsamter Herzfrequenz. npAg wirkte am wenigsten toxisch, gefolgt von „altem“ npAg und  $\text{Ag}^+$ . Auch die Exposition mit anderen Metall-Ionen beeinflusst, sofern untersucht, die Entwicklungsdauer, das Körpergewicht und die Herzfrequenz von *M. cornuarietis*-Embryonen in beschriebener Weise. Exposition mit Platin (Osterauer *et al.* 2009), Palladium, Kupfer, Lithium, (Sawasdee & Köhler 2010) und Cadmium (Schirling *et al.* 2006) überlebten *M. cornuarietis*-Embryonen allerdings trotz höherer Metall-Konzentrationen, als sie in dieser Arbeit ( $30 \mu\text{g Ag}^+/\text{L} = 100\%$  Mortalität) eingesetzt wurden. Zu Nickel und Zink gibt es widersprüchliche Konzentrationsangaben (Sawasdee & Köhler 2009).

Exposition mit npAg erhöhte die Mortalität von *M. cornuarietis*-Embryonen erst bei Konzentrationen von  $200 \mu\text{g npAg}/\text{L}$ . Exposition mit „altem“ npAg führte zu einem intermediären Effekt, d. h. die durch „altes“ npAg hervorgerufene Mortalität war zwischen derjenigen der entsprechend konzentrierten npAg- und der  $\text{Ag}^+$ -Exposition einzustufen.

Die letalen Auswirkungen von npAg-Exposition in adulten *M. cornuarietis* sind bislang nicht untersucht worden. Um die Sensitivität von *M. cornuarietis*-Embryonen im Vergleich mit anderen Schneckenarten abschätzen zu können, wären Studien zur npAg-Exposition von Embryonen anderer Spezies hilfreich. npAg-Exposition wurde in anderen Schnecken allerdings nur an Adulten untersucht. Adulte Individuen der Art *Lymnaea luteola* zeigen nach viertägiger Exposition mit ca.  $50 \mu\text{g npAg}/\text{L}$  eine 50 %-ige Mortalität (Ali *et al.* 2014). Empfindlicher ist die Spitze Blasenschnecke (*Physa acuta*), deren Adulte bereits bei einer Expositionskonzentration von rund  $2 \mu\text{g npAg}/\text{L}$  eine Sterblichkeit von

50 % aufweisen und bei 0,01  $\mu\text{g npAg/L}$  erhöhte Kriechgeschwindigkeit und Reproduktionseinbußen zeigen (Bernot & Brandenburg 2013). In vorliegender Arbeit führten solche npAg-Konzentrationen in den *M. cornuarietis*-Embryonen noch zu keinen Veränderungen der untersuchten Endpunkte Mortalität, Entwicklungsdauer, Schlupfgewicht und Herzfrequenz. Diese Ergebnisse zeigen, dass andere Schnecken-Arten eine größere Empfindlichkeit gegenüber Silber-Exposition aufweisen können als *M. cornuarietis*-Embryonen. Adulte aquatische Schnecken reagieren in der Regel weniger empfindlich auf Metall-Exposition als Embryonen derselben Art (Gomot 1998), sodass von adulten *M. cornuarietis* eine noch höhere npAg-Toleranz zu erwarten wäre, als sie in dieser Arbeit an den Embryonen beobachtet wurde.

Die Toxizität von npAg-Exposition in *M. cornuarietis*-Embryonen war mit der Menge aufgenommenen Silbers verknüpft. Mit 200  $\mu\text{g npAg/g}$  exponierte Embryonen nahmen weniger Silber auf als 10  $\mu\text{g Ag}^+/\text{L}$ -exponierte Embryonen und zeigten eine schwächere bzw. gar keine Reaktion der toxikologischen Endpunkte. Die Versuchsansätze mit „altem“ npAg, welches zum Teil als  $\text{Ag}^+$  vorlag, gaben einen weiteren Hinweis darauf, dass in *M. cornuarietis* nur  $\text{Ag}^+$ -Ionen für die Silberaufnahme und Toxizität verantwortlich waren.

### 3.2.2 Abschirmungsfunktion der Eihülle

Die von den *M. cornuarietis*-Embryonen aufgenommene Silbermenge wiederum hing mit der Größe des vorliegenden Silbers zusammen: npAg drang nicht bis ins Ei zu den Embryonen vor. In  $\text{Ag}^+$ -exponierten Embryonen hingegen waren weitaus höhere Ag-Konzentrationen im Gewebe nachzuweisen. Hinweise auf eine Schutzfunktion der Eihülle gibt es bei Zebrafisch-Embryonen: Osborne *et al.* (2013) beobachteten eine höhere Toxizität von npAg in den Fisch-Embryonen, je kleiner die Partikel waren. Dass in jenem Experiment selbst Silber-Partikel einer Größe von  $> 600 \text{ nm}$  toxische Effekte hervorriefen, dürfte eher dem Versuchsdesign des Zebrafisch-Embryo-Tests geschuldet sein. Während der viertägigen Expositionszeit ist dabei kein Wasserwechsel vorgesehen (International Organization for Standardization 2007), was bei 26 °C bereits zu einer Freisetzung von  $\text{Ag}^+$  führt (Kittler *et al.* 2010). Dieses  $\text{Ag}^+$  wiederum hätte die Eihülle durchdringen und der Auslöser der dokumentierten Toxizität sein können. Für die abschirmende Funktion der Eihülle spricht auch eine Beobachtung von Sawas-

dee & Köhler (2010). Mit  $\text{Cu}^{2+}$  exponierte *M. cornuarietis*-Embryonen überlebten, solange sie sich innerhalb des Eies befanden, eine Expositions-konzentration im Medium von bis zu  $250 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$ . Direkt nach dem Schlupf jedoch, außerhalb der Eihülle, führten bereits  $100 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{L}$  im Medium zum Tod aller Schnecken.

Die Silber-Akkumulationsuntersuchung an *M. cornuarietis* legte den Verdacht nahe, dass nur  $\text{Ag}^+$  die Eihülle passieren, sich im Embryo anreichern und dort toxische Effekte hervorrufen kann, nicht jedoch npAg. Somit wäre die Ursache der Toxizität von npAg allein in der Freisetzung von  $\text{Ag}^+$  zu suchen. Diese Hypothese wurde bereits von Smetana *et al.* (2008) und Boenigk *et al.* (2014) formuliert.

## 4 Ausblick

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben weiterführende Fragen aufgeworfen, die in diesem Abschnitt als Empfehlungen für zukünftige Forschungsansätze formuliert werden.

- Durch unsachgemäße Handhabung von npAg-Stammsuspensionen (Luftkontakt) können Alterungsprozesse der Partikel in Gang gesetzt werden, welche starken Einfluss auf die Toxizität des npAg haben. Der Zustand der Stammsuspension sollte direkt vor der Verwendung überprüft werden.
- Selbst die Kontrolle möglichst vieler Versuchsparameter erlaubt keine exakte Prognose zum Verhalten des npAg im Medium. Die Eigenschaften des npAg sollten daher stets *in situ* untersucht werden, z. B. die Größe der Aggregate und der Anteil gelösten Silbers im Expositionsmedium, wie hier geschehen. Viele Detektionsmethoden (z. B. dynamische Lichtstreuung, Rasterelektronenmikroskopie) sind im  $\mu\text{g/L}$ -Konzentrationsbereich allerdings nicht anwendbar.
- Statische und semistatische Versuche bergen die Gefahr der Lösung des npAg in  $\text{Ag}^+$  und sind nur bedingt dazu geeignet, die reine „Nano“-Wirkung von derjenigen teilweise gelösten npAg zu unterscheiden. Den Veränderungen des npAg während Expositionsversuchen sollte z. B. mit Durchfluss-Systemen begegnet werden, die die Qualität des npAg im Medium über längere Zeit konstant halten können.
- Die 24-stündige Reinigungsphase, die der Untersuchung der organspezifischen Silber-Akkumulation in *D. polymorpha* voranging, könnte Effekte einer anfangs heterogenen Silberverteilung in den Organbereichen „verwischt“ haben. Für solche Untersuchungen wäre daher empfehlenswert, diese Reinigungsphase auszulassen. Fehlerquellen durch noch im Darm

vorhandenes Silber müssten dafür in Kauf genommen werden. Im Gegenzug ließe sich die Silberkonzentration im Gewebe exakt zum Zeitpunkt der Beprobung darstellen.

- Bei der Beprobung des Gesamtgewebes von *D. polymorpha* geht wertvolle Information über organspezifische Unterschiede verloren. Die detaillierte Aufspaltung des gesamten Weichgewebes von *D. polymorpha* in drei Organbereiche ist zwar mit hohem Arbeitsaufwand verbunden, aber unerlässlich für eine realistische Bewertung der Anreicherung bzw. Toxizität von npAg (und anderen Metallen).
- Zellfraktionierungs-Untersuchungen an *D. polymorpha* mit einer zeitlich engmaschigeren Betrachtung wären lohnenswert. Zur Aufklärung der Spezierung des Silbers innerhalb des Muschelgewebes ließe sich ergänzend eine erst kürzlich speziell hierfür entwickelte Methode heranziehen, die im Gewebe mit Feststoff-Atomabsorptionsspektrometrie nicht nur npAg von  $\text{Ag}^+$  unterscheiden, sondern auch auf die Größe der Nanopartikel rückschließen kann (Feichtmeier & Leopold 2014).
- Genauere Untersuchungen der *M. cornuarietis*-Eihülle könnten Aufschluss darüber bringen, auf welchen Mechanismen der beobachtete Abschirmungseffekt beruht.
- An Adulten von *M. cornuarietis* sollte überprüft werden, ob diese empfindlicher auf npAg-Exposition reagieren als die durch die Eihülle geschützten Embryonen.

# Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit vergleicht die Auswirkungen von Silber-Nanopartikeln (npAg) mit denjenigen von Silber-Ionen ( $\text{Ag}^+$ ) in der Süßwassermuschel *Dreissena polymorpha* und der Süßwasserschnecke *Marisa cornuarietis*.

Mittels eines statischen, dreiwöchigen Expositionsversuchs mit nomineller Expositions-konzentration von  $100 \mu\text{g Ag/L}$  wurde gezeigt, dass npAg in gleichem Ausmaß wie  $\text{Ag}^+$  in *D. polymorpha* aufgenommen wird. In den drei Organbereichen Mantel/Muskulatur, Kiemen und Gonade/Verdauungstrakt wurden keine Akkumulationsunterschiede festgestellt. Ab dem ersten Expositionstag wurde eine gleichbleibende Gewebekonzentration von rund  $6 \mu\text{g Ag/g}$  Trockenmasse erreicht. Im Expositionsmedium zeigten beide Silberspezies ein ähnliches Verhalten und lagen beide teils agglomeriert bzw. an Partikel adsorbiert vor.

Untersuchungen zur Silberaufnahme in verschiedenen Zellfraktionen des Muschelweichgewebes ergaben bei der Exposition mit npAg eine verstärkte Silberakkumulation in der Lysosomen-Fraktion, was durch Endocytose des npAg erklärt werden könnte. Es gab Hinweise darauf, dass sich npAg innerhalb der Lysosomen auflöst und dass anschließend dieselben Detoxifizierungsmechanismen greifen wie für  $\text{Ag}^+$ . Diese Mechanismen könnten vor allem in der Einlagerung in metallreichen Granula und deren Speicherung in unterschiedlichen Zellkompartimenten bestehen.

Die in *D. polymorpha* untersuchten toxikologischen Endpunkte (Fitness-Index, Glutathion-S-Transferasen, Katalase, Hitzeschockproteine) reagierten weder auf npAg- noch auf  $\text{Ag}^+$ -Exposition.

Silber-Nanopartikel wurden von *M. cornuarietis*-Embryonen in geringerem Ausmaß akkumuliert als Silber-Ionen. Es wird vermutet, dass nur  $\text{Ag}^+$  durch die Eihülle bis zum Embryo vordringt. Entsprechend reagierten die Schneckenembryonen deutlich empfindlicher auf  $\text{Ag}^+$ - als auf npAg-Exposition. Letztere erhöhte bei einer Expositions-konzentration von  $200 \mu\text{g Ag/L}$  die Mortalität nur geringfügig, während  $\text{Ag}^+$ -Exposition bereits bei  $30 \mu\text{g Ag/L}$  zu 100 % Mortalität führte. Auch die anderen im *Marisa* Embryo Toxicity Test untersuchten



toxikologischen Endpunkte zeigten Reaktionsmuster, die bei  $\text{Ag}^+$ -Exposition stets deutlicher ausgeprägt waren als bei npAg-Exposition: Die Entwicklungsdauer wurde verkürzt, das Schlupfgewicht wurde reduziert, ebenso wie die Herzschlagrate.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass in *Dreissena polymorpha* sowohl npAg- als auch  $\text{Ag}^+$ -Exposition zu gleich starker Silberanreicherung im Gewebe, aber jeweils nicht zu toxischen Effekten führen. Der Grund dafür ist vermutlich im Entgiftungsvermögen der Muschel zu suchen. In *Marisa cornuarietis*-Embryonen hingegen wurde npAg in deutlich geringerem Ausmaß als  $\text{Ag}^+$  aufgenommen. Außerdem hatte npAg-Exposition im Gegensatz zu  $\text{Ag}^+$ -Exposition kaum toxische Auswirkungen in den Embryonen. Es gibt Hinweise darauf, dass npAg die Eihülle nicht zu durchdringen vermag, somit vom Embryo nicht aufgenommen wird und deshalb keine Toxizität entfalten kann. Die Tauglichkeit von *M. cornuarietis*-Embryonen für Toxizitätstests mit partikulären Substanzen ist hierdurch in Frage gestellt.

# Summary

This study compared the effects of silver nanoparticles (npAg) with those of silver ions ( $\text{Ag}^+$ ) in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* and in the freshwater snail *Marisa cornuarietis*.

A three-week static exposure with a nominal exposure concentration of 100  $\mu\text{g Ag/L}$  demonstrated that npAg and  $\text{Ag}^+$  accumulate to the same extent in *D. polymorpha*. No differences in accumulation could be detected between the three body parts mantle/muscle, gills and gonad/digestive tract. After the first day of exposure, a constant tissue concentration of approximately 6  $\mu\text{g Ag/g}$  dry weight was reached. Both silver species exhibited a similar behaviour in the medium and were partly present as agglomerates and adsorbed to particles, respectively.

Studies of silver uptake in various cell fractions of the mussels' soft tissue revealed that silver accumulation in the lysosomal fraction was enhanced due to npAg exposition, which might be explained by endocytosis of npAg. There were indications that npAg dissolves within the lysosomes and afterwards the same detoxification mechanisms apply as for  $\text{Ag}^+$ . These mechanisms might mainly consist of incorporation in metal-rich granules which were stored in different cell compartments.

The examined toxicological endpoints in *D. polymorpha* (fitness index, Glutathione-S-transferases, catalase, heat shock proteins) did not respond to either npAg- or  $\text{Ag}^+$  exposure.

Silver nanoparticles were taken up to a lesser extent by *M. cornuarietis* embryos than silver ions. There are hints that only  $\text{Ag}^+$  may penetrate the egg membrane and reach the embryo. Accordingly, the snail embryos responded more sensitively to  $\text{Ag}^+$  than to npAg exposure. The latter only slightly elevated mortality at an exposure concentration of 200  $\mu\text{g Ag/L}$ , while  $\text{Ag}^+$  exposure resulted in 100 % mortality at 30  $\mu\text{g Ag/L}$ . The other toxicological endpoints examined in the *Marisa* Embryo Toxicity Test showed patterns that were always more pronounced

in Ag<sup>+</sup> exposures than in npAg exposure: developmental time was shortened, hatching weight was reduced and heart rate was lowered.

The results of this study show that both npAg- and Ag<sup>+</sup> exposure result in similar silver accumulation in of *Dreissena polymorpha*, but do not lead to toxic effects. A probable reason might be the mussels' detoxification capacity. However, in *Marisa cornuarietis* embryos, npAg was taken up to a much lesser extent than Ag<sup>+</sup>. Moreover, in contrast to Ag<sup>+</sup> exposure, npAg exposure had hardly any toxic effects. There are indications that npAg cannot penetrate the egg membrane. It is thus not absorbed by the embryo and does not cause toxicity. The suitability of *M. cornuarietis* embryos for toxicity tests with particulate substances might be questioned.

# V

## Verzeichnisse

### 1 Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P., 1999. *Der "kleine" Alberts - Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Wiley, Weinheim, 1. Auflage, 799 Seiten. ISBN: 3527311602 [zitiert auf S. 25, 78, 79]
- Alexander, J. W., 2009. History of the Medical Use of Silver. *Surgical Infections*, 10 (3), Seite 289–292. doi: 10.1089/sur2008.9941 [zitiert auf S. 6]
- Ali, D., Yadav, P. G., Kumar, S., Ali, H., Alarifi, S. & Harrath, A. H., 2014. Sensitivity of freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L., to silver nanoparticles. *Chemosphere*, 104, Seite 134–140. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.081 [zitiert auf S. 9, 89, 91]
- Arias, A. & Torraba-Burrial, A., 2014. First European record of the giant ramshorn snail *Marisa comuarietis* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda: Ampullariidae) from northern Spain. *Limnetica*, 33 (1), Seite 65–71 [zitiert auf S. 31]
- Armstrong, R. N., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10 (1), Seite 2–18. doi: 10.1021/tx960072x [zitiert auf S. 29, 89]
- AshaRani, P. V., Lianwu, Y., Gong, Z. & Valiyaveetil, S., 2011. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology*, 5 (1), Seite 43–54. doi: 10.3109/17435390.2010.489207 [zitiert auf S. 84]
- Bai, J. G., Creehan, K. D. & Kuhn, H. A., 2007. Inkjet printable nanosilver suspensions for enhanced sintering quality in rapid manufacturing. *Nanotechnology*, 18 (18), Seite 185701. doi: 10.1088/0957-4484/18/18/185701 [zitiert auf S. 7]
- Baker, S. M., Levinton, J. S., Kurdziel, J. P. & Shumway, S. E., 1998. Selective feeding and biodeposition by zebra mussels and their relation to changes in phytoplankton composition and seston load. *Journal of Shellfish Research*, 17 (4), Seite 1207–1213 [zitiert auf S. 75]

- Baker, T. J., Tyler, C. R. & Galloway, T. S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*, 186, Seite 257–271. doi: 10.1016/j.envpol.2013.11.014 [zitiert auf S. 8]
- Baun, A. D., Hartmann, N. B., Grieger, K. & Kusk, K. O., 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*, 17 (5), Seite 387–395. doi: 10.1007/s10646-008-0208-y [zitiert auf S. 8]
- Benn, T. M. & Westerhoff, P., 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science and Technology*, 42 (11), Seite 4133–4139 [zitiert auf S. 7]
- Bernot, R. J. & Brandenburg, M., 2013. Freshwater snail vital rates affected by non-lethal concentrations of silver nanoparticles. *Hydrobiologia*, 714 (1), Seite 25–34. doi: 10.1007/s10750-013-1509-6 [zitiert auf S. 9, 92]
- Berthet, B., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Martoja, M. & Jeantet, A., 1992. Bioaccumulation, toxicity and physico-chemical speciation of silver in bivalve molluscs: ecotoxicological and health consequences. *Science of The Total Environment*, 125, Seite 97–122. doi: 10.1016/0048-9697(92)90385-6 [zitiert auf S. 9, 10, 19, 74, 80, 81, 82, 86, 89]
- Blackwell, B. D., Driscoll, C. T., Spada, M. E., Todorova, S. G. & Montesdeoca, M. R., 2013. Evaluation of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as biomonitors of mercury contamination in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32 (3), Seite 638–643. doi: 10.1002/etc.2100 [zitiert auf S. 9]
- Boenigk, J., Beisser, D., Zimmermann, S., Bock, C., Jakobi, J., Grabner, D., Großmann, L., Rahmann, S., Barcikowski, S. & Sures, B., 2014. Effects of silver nitrate and silver nanoparticles on a planktonic community: general trends after short-term exposure. *PloS one*, 9 (4), Seite e95340. doi: 10.1371/journal.pone.0107092.s002 [zitiert auf S. 93]
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M. & Kahru, A., 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of Toxicology*, 87 (7), Seite 1181–1200. doi: 10.1007/s00204-013-1079-4 [zitiert auf S. 8]
- Borcherding, J., 1991. The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in lakes. *Oecologia*, 87 (2), Seite 208–218. doi: 10.1007/BF00325258 [zitiert auf S. 10]
- Borcherding, J., 1992a. Morphometric changes in relation to the annual reproductive cycle in *Dreissena polymorpha* - a prerequisite for biomonitoring studies with zebra mussels. In: Neumann, D. & Jenner, H. A. (Hrsg.), *Limnologie aktuell: The zebra mussel *Dreissena polymorpha*: ecology, biological monitoring and first applications in the water quality management*, Band 4, Seite 87–99. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 262 Seiten. ISBN: 3437306898 [zitiert auf S. 88]

- Borcherding, J., 1992b. Another early warning system for the detection of toxic discharges in the aquatic environment based on valve movements of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. In: Neumann, D. & Jenner, H. A. (Hrsg.), *Limnologie aktuell: The zebra mussel Dreissena polymorpha: ecology, biological monitoring and first applications in the water quality management*, Band 4, Seite 127–146. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 262 Seiten. ISBN: 3437306898 [zitiert auf S. 19]
- Bragg, P. D. & Rainnie, D. J., 1974. The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 20, Seite 883–889 [zitiert auf S. 6]
- Brown, B. E., 1982. The form and function of metal-containing "granules" in invertebrate tissues. *Biological Reviews*, 57 (4), Seite 621–667. doi: 10.1111/j.1469-185X.1982.tb00375.x [zitiert auf S. 78, 81, 86]
- Brown, D. S., 1994. *Freshwater snails of Africa and their Medical Importance*. Taylor & Francis, London, 2. Auflage, 608 Seiten. ISBN: 9780748400263 [zitiert auf S. 31]
- Buffet, P.-E., Pan, J.-F., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Gaudin, P., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E. & Mouneyrac, C., 2013. Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89, Seite 117–124. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.11.019 [zitiert auf S. 8, 10, 29, 75, 89]
- Buffet, P.-E., Pan, J.-F., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Gaudin, P., Risso-de Faverney, C., Guibbolini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E. & Mouneyrac, C., 2014. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: The ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Science of The Total Environment*, 89, Seite 117–124 [zitiert auf S. 8, 10, 29]
- Burmester, V., Nimptsch, J. & Wiegand, C., 2012. Adaptation of freshwater mussels to cyanobacterial toxins: response of the biotransformation and antioxidant enzymes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, Seite 296–309. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.11.037 [zitiert auf S. 10, 30, 89]
- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G. & Gallo, G., 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research*, 76, Seite 16–21. doi: 10.1016/j.marenvres.2011.06.005 [zitiert auf S. 74]
- Cason, J. S., Jackson, D. M., Lowbury, E. J. & Ricketts, C. R., 1966. Antiseptic and aseptic prophylaxis for burns: use of silver nitrate and of isolators. *British Medical Journal*, 2 (5525), Seite 1288–1294. doi: 10.1136/bmj.2.5525.1288 [zitiert auf S. 6]

- Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Perret, M., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Pfohl-Leszkowicz, A. & Vincent-Hubert, F., 2012. Genotoxicity assessment and detoxification induction in *Dreissena polymorpha* exposed to benzo[a]pyrene. *Mutagenesis*, 27 (6), Seite 703–711. doi: 10.1093/mutage/ges036 [zitiert auf S. 89]
- Chen, S.-F., Zhang, H. & Lin, Q.-Y., 2013. Effect of different water conditions on dissolution of nanosilver. *Water Science and Technology*, 68 (8), Seite 1745–1750. doi: 10.2166/wst.2013.421 [zitiert auf S. 71, 72]
- Chen, X. & Schluesener, H. J., 2008. Nanosilver: A nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters*, 176 (1), Seite 1–12. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.10.004 [zitiert auf S. 7]
- Cherian, M. G. & Goyer, R. A., 1978. Metallothioneins and their role in metabolism and toxicity of metals. *Life Sciences*, 23 (1), Seite 1–9 [zitiert auf S. 80]
- Choi, O. & Hu, Z., 2008. Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria. *Environmental Science & Technology*, 42 (12), Seite 4583–4588. doi: 10.1021/es703238h [zitiert auf S. 8, 10]
- Conrad, G. W. & Wells, D. C., 1998. Effects of silver ion (Ag<sup>+</sup>) on a cellular shape change in the absence of microtubules in fertilized eggs of *Ilyanassa obsoleta*. *Bulletin of the Mount Desert Island Biological Laboratory*, 37, Seite 4–5 [zitiert auf S. 83]
- Contardo-Jara, V., Krueger, A., Exner, H.-J. & Wiegand, C., 2009. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Dreissena polymorpha* for detection of site impact in watercourses of Berlin. *Journal of Environmental Monitoring*, 11 (6), Seite 1147–1156. doi: 10.1039/b820734h [zitiert auf S. 89]
- Cox, G. W., 1999. *Alien species in North America and Hawaii: Impacts on natural ecosystems*. Island Press, Washington D.C., 344 Seiten. ISBN: 1559636807 [zitiert auf S. 18]
- Croteau, M.-N., Misra, S. K., Luoma, S. N. & Valsami-Jones, E., 2011. Silver bioaccumulation dynamics in a freshwater invertebrate after aqueous and dietary exposures to nanosized and ionic Ag. *Environmental Science and Technology*, 45 (15), Seite 6600–6607. doi: 10.1021/es200880c [zitiert auf S. 9, 83]
- Croteau, M.-N., Dybowska, A. D., Luoma, S. N., Misra, S. K. & Valsami-Jones, E., 2014. Isotopically modified silver nanoparticles to assess nanosilver bioavailability and toxicity at environmentally relevant exposures. *Environmental Chemistry*, 11 (3), Seite 247. doi: 10.1071/EN13141 [zitiert auf S. 9, 83]
- Custer, C. M. & Custer, T. W., 1996. Food habits of diving ducks in the Great Lakes after the zebra mussel invasion. *Journal of Field Ornithology*, 67 (1), Seite 86–99 [zitiert auf S. 8]

- Demian, E. S. & Yousif, F., 1973. Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda: Ampullariidae). I. General outlines of development. *International Journal of Malacologia*, 12 (1), Seite 123–150 [zitiert auf S. 31, 60]
- Diendorf, J., 2012. Silber-Nanopartikel - Synthese, Stabilität und biologische Wirkungen. Dissertation, Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, 255 Seiten [zitiert auf S. 125]
- Dobias, J. & Bernier-Latmani, R., 2013. Silver release from silver nanoparticles in natural waters. *Environmental Science and Technology*, 47 (9), Seite 4140–4146. doi: 10.1021/es304023p [zitiert auf S. 68]
- Domouhtsidou, G. P. & Dimitriadis, V. K., 2000. Ultrastructural Localization of Heavy Metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in Gills and Digestive Gland of Mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38 (4), Seite 472–478. doi: 10.1007/s002449910062 [zitiert auf S. 79, 81]
- Doudoroff, P. & Katz, M., 1953. Critical Review of Literature on the Toxicity of Industrial Wastes and Their Components to Fish: II. The Metals, as Salts. *Sewage and Industrial Wastes*, 25 (7), Seite 802–839 [zitiert auf S. 6]
- Edwards-Jones, V., 2009. The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. *Letters in Applied Microbiology*, 49 (2), Seite 147–152. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02648.x [zitiert auf S. 6, 7]
- Elder, J. F. & Collins, J. J., 1991. Freshwater Molluscs as Indicators of Bioavailability and Toxicity of Metals in Surface-Water Systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 122, Seite 37–79 [zitiert auf S. 19, 24, 48, 60, 120]
- Feichtmeier, N. S. & Leopold, K., 2014. Detection of silver nanoparticles in parsley by solid sampling high-resolution-continuum source atomic absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (16), Seite 3887–3894. doi: 10.1007/s00216-013-7510-0 [zitiert auf S. 95]
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N. & Kim, J. O., 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 52 (4), Seite 662–668 [zitiert auf S. 6]
- Ferry, J. L., Craig, P., Hexel, C., Sisco, P., Frey, R., Pennington, P. L., Fulton, M. H., Scott, I. G., Decho, A. W., Kashiwada, S., Murphy, C. J. & Shaw, T. J., 2009. Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nature Nanotechnology*, 4, Seite 441–444. doi: 10.1038/NNANO.2009.157 [zitiert auf S. 8]
- Forster, S. P., Oliveira, S. & Seeger, S., 2012. Nanotechnology in the market: promises and realities. *International Journal of Nanotechnology*, 8 (6-7), Seite 592–613 [zitiert auf S. 8]



- Fraysse, B., Baudin, J.-P., Garnier-Laplace, J., Adam, C. & Boudou, A., 2002. Effects of Cd and Zn waterborne exposure on the uptake and depuration of  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{110}\text{mAg}$  and  $^{134}\text{Cs}$  by the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)—whole organism study. *Environmental Pollution*, 118 (3), Seite 297–306. doi: 10.1016/S0269-7491(01)00305-0 [zitiert auf S. 74]
- Frischer, M. E., Nierzwicki-Bauer, S. A., Parsons, R. H., Vathanodorn, K. & Waitkus, K. R., 2000. Interactions between zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and microbial communities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57 (3), Seite 591–599. doi: 10.1139/cjfas-57-3-591 [zitiert auf S. 75, 87]
- Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P. & Gagnon, C., 2013. Sublethal effects of silver nanoparticles and dissolved silver in freshwater mussels. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76 (8), Seite 479–490. doi: 10.1080/15287394.2013.779561 [zitiert auf S. 9, 10, 29, 88, 89]
- Garton, D. W., Payne, C. D. & Montoya, J. P., 2005. Flexible diet and trophic position of dreissenid mussels as inferred from stable isotopes of carbon and nitrogen. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62 (5), Seite 1119–1129. doi: 10.1139/f05-025 [zitiert auf S. 75]
- George, S. G., Pirie, B. J. S., Calabrese, a. & Nelson, D., 1986. Biochemical and ultrastructural observations of long-term silver accumulation in the mussel, *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 18 (4), Seite 255–265. doi: 10.1016/0141-1136(86)90025-5 [zitiert auf S. 78, 79, 82]
- Gergs, R., Rinke, K. & Rothhaupt, K.-O., 2009. Zebra mussels mediate benthic-pelagic coupling by biodeposition and changing detrital stoichiometry. *Freshwater Biology*, 54 (7), Seite 1379–1391. doi: 10.1111/j.1365-2427.2009.02188.x [zitiert auf S. 8]
- Gomot, A., 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41 (3), Seite 288–297. doi: 10.1006/eesa.1998.1711 [zitiert auf S. 9, 92]
- Götting, K.-J., 1974. *Malakozoologie - Grundriß der Weichtierkunde*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 320 Seiten. ISBN: 3437301748 [zitiert auf S. 18]
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W. & Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials ( $\text{TiO}_2$ , ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science and Technology*, 43 (24), Seite 9216–9222. doi: 10.1021/es9015553 [zitiert auf S. 7]
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9), Seite 1972–1978. doi: 10.1897/08-002.1 [zitiert auf S. 8]

- Guang, X.-Y., Wang, J.-J., He, Z.-G., Chen, G.-X., Ding, L., Dai, J.-J. & Yang, X.-H., 2013. Molluscicidal effects of nano-silver biological molluscicide and niclosamide. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 25 (5), Seite 503–505 [zitiert auf S. 9]
- Gundacker, C., 1999. Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha pallas*. *Chemosphere*, 38 (14), Seite 3339–3356 [zitiert auf S. 19, 76]
- Hansen, S. F., Maynard, A. D., Baun, A. D., Tickner, J. A. & Bowman, D. M., 2008. Nanotechnology - early lessons from early warnings. In: European Environment Agency (Hrsg.), *Late lessons from early warnings: Science, precaution, innovation*, Band 1, Seite 530–559. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 760 Seiten. ISBN: 9789292133566. doi: 10.2800/73322 [zitiert auf S. 8]
- Harmon, A. R., Kennedy, A. J., Poda, A. R., Bednar, A. J., Chappell, M. A. & Stevens, J. A., 2014. Determination of nanosilver dissolution kinetics and toxicity in an environmentally relevant aqueous medium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33 (8), Seite 1783–1791. doi: 10.1002/etc.2616 [zitiert auf S. 68, 71]
- Hayes, J. D. & McLellan, L. I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31 (4), Seite 273–300. doi: 10.1080/10715769900300851 [zitiert auf S. 10, 29]
- Henglein, A., 1993. Physicochemical properties of small metal particles in solution: „microelectrode“ reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. *The Journal of Physical Chemistry*, 97 (21), Seite 5457–5471. doi: 10.1021/j100123a004 [zitiert auf S. 6]
- Herbert, P. N. & Muncaster, B. W., 1989. Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): A new mollusc in the Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46, Seite 1587–1591 [zitiert auf S. 18]
- Hermel, H. & Ravelmann, R., 1966. Über den Mechanismus der Katalase-Wasserstoffperoxid-Reaktion II. Die Aktivitätszentren der Katalase und ihre Wirkungsweise. *Biochimica et Biophysica Acta*, 128, Seite 283–295 [zitiert auf S. 30]
- Herwig, H. J., Brands, F., Kruitwagen, E. & Zandee, D. I., 1989. Bioaccumulation and histochemical localization of cadmium in *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium chloride. *Aquatic Toxicology*, 15 (3), Seite 269–285. doi: 10.1016/0166-445X(89)90040-4 [zitiert auf S. 76]
- International Organization for Standardization, 2007. Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). *Norm Nr. 15088:2007* [zitiert auf S. 92]
- International Organization for Standardization, 2008. Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. *Norm Nr. ISO/TS 27687:2008* [zitiert auf S. 6]

- International Union of Pure and Applied Chemistry, 2013. Atomic weights of the elements 2011 (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85 (5), Seite 1047–1078. doi: 10.1351/PAC-REP-13-03-02 [zitiert auf S. 70]
- Jørgensen, C. B., Kørboe, T., Møhlenberg, F. & Riisgård, H. U., 1984. Ciliary and mucus-net filter feeding, with special reference to fluid mechanical characteristics. *Marine Ecology Progress Series*, 15, Seite 283–292. doi: 10.3354/meps015283 [zitiert auf S. 74]
- Justice, J. R. & Bernot, R. J., 2014. Nanosilver Inhibits Freshwater Gastropod (*Physa acuta*) Ability to Assess Predation Risk. *American Midland Naturalist*, 171 (2), Seite 340–349 [zitiert auf S. 9]
- Kahru, A. & Dubourguier, H.-C., 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269 (2–3), Seite 105–119. doi: 10.1016/j.tox.2009.08.016 [zitiert auf S. 8]
- Kent, R. D. & Vikesland, P. J., 2012. Controlled evaluation of silver nanoparticle dissolution using atomic force microscopy. *Environmental Science and Technology*, 46 (13), Seite 6977–6984. doi: 10.1021/es203475a [zitiert auf S. 69]
- Khargarot, B. S. & Ray, P. K., 1988. Sensitivity of freshwater pulmonate snails, *Lymnaea luteola* L., to heavy metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41 (2), Seite 208–213. doi: 10.1007/BF01705432 [zitiert auf S. 9]
- Kiany, P., 2010. Vergleich der Aufnahme und Verteilung von Silbernitrat und Silbernanopartikeln in unterschiedlichen Zellkompartimenten am Beispiel der Dreikantmuschel (*Dreissena polymorpha*). Diplomarbeit, Institut für Landschaftsökologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 102 Seiten [zitiert auf S. 51, 88]
- Kilgour, B. W. & Baker, M. A., 1994. Effects of season, stock, and laboratory protocols on survival of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27 (1), Seite 29–35. doi: 10.1007/BF00203884 [zitiert auf S. 22]
- Kim, B., Park, C.-S., Murayama, M. & Hochella, M. F., 2010. Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products. *Environmental Science and Technology*, 44 (19), Seite 7509–7514. doi: 10.1021/es101565j [zitiert auf S. 7]
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D. H. & Cho, M.-H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3 (1), Seite 95–101. doi: 10.1016/j.nano.2006.12.001 [zitiert auf S. 8]
- Kinzelbach, R., 1992. The main features of the phylogeny and dispersal of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. In: Neumann, D. & Jenner, H. A. (Hrsg.), *Limnologie aktuell: The zebra mussel Dreissena polymorpha: ecology, biological monitoring and first applications in the water quality management*, Band 4, Seite 5–17.

- Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 262 Seiten. ISBN: 3437306898 [zitiert auf S. 18]
- Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M. & Epple, M., 2010. Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. *Chemistry of Materials*, 22 (16), Seite 4548–4554. doi: 10.1021/cm100023p [zitiert auf S. 10, 68, 69, 70, 84, 92]
- Klasen, H. J., 2000. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, 26 (2), Seite 117–130. doi: 10.1016/S0305-4179(99)00108-4 [zitiert auf S. 6]
- Kryger, J. & Riisgård, H. U., 1988. Filtration rate capacities in 6 species of European freshwater bivalves. *Oecologia*, 77 (1), Seite 34–38. doi: 10.1007/BF00380921 [zitiert auf S. 74]
- Lautenschläger, K.-H., Schröter, W. & Wanninger, A., 2005. *Taschenbuch der Chemie*. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, 20. überarbeitete und erweiterte Auflage, 890 Seiten. ISBN: 3817117612 [zitiert auf S. 70]
- Lee, Y.-J., Kim, J., Oh, J., Bae, S., Lee, S., Hong, I. S. & Kim, S.-H., 2012. Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (1), Seite 155–159. doi: 10.1002/etc.717 [zitiert auf S. 17]
- LePlage, W. L., 1993. The impact of *Dreissena polymorpha* on waterworks operations at Monroe, Michigan: A case history. In: Nalepa, T. F. & Schloesser, D. W. (Hrsg.), *Zebra Mussels: Biology, Impacts, and Control*, Seite 333–358. Lewis Publishers, 832 Seiten. ISBN: 0873716965 [zitiert auf S. 18]
- Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V. & Brown Jr., Gordon E., 2012. Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environmental Science and Technology*, 46, Seite 6900–6914. doi: 10.1021/es2037405 [zitiert auf S. 7]
- Limbach, L. K., Wick, P., Manser, P., Grass, R. N., Bruinink, A. & Stark, W. J., 2007. Exposure of Engineered Nanoparticles to Human Lung Epithelial Cells: Influence of Chemical Composition and Catalytic Activity on Oxidative Stress. *Environmental Science and Technology*, 41 (11), Seite 4158–4163. doi: 10.1021/es062629t [zitiert auf S. 90]
- Liu, T., Koene, J. M., Dong, X. & Fu, R., 2013. Sensitivity of isolated eggs of pond snails: a new method for toxicity assays and risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (5), Seite 4183–4190. doi: 10.1007/s10661-012-2860-1 [zitiert auf S. 9]
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P. K.-H., Chiu, J.-F. & Che, C.-M., 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12 (4), Seite 527–534. doi: 10.1007/s00775-007-0208-z [zitiert auf S. 8]

- López-Serrano, A., Muñoz-Olivas, R., Sanz-Landaluze, J., Olasagasti, M., Rainieri, S. & Cámara, C., 2014. Comparison of bioconcentration of ionic silver and silver nanoparticles in zebrafish eleutheroembryos. *Environmental Pollution*, 191, Seite 207–214. doi: 10.1016/j.envpol.2014.04.020 [zitiert auf S. 84]
- Loza, K., Diendorf, J., Sengstock, C., Ruiz-Gonzalez, L., Gonzalez-Calbet, J. M., Vallet-Regi, M., Köller, M. & Epple, M., 2014. The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (12), Seite 1634–1643. doi: 10.1039/c3tb21569e [zitiert auf S. 8, 10, 69, 70, 71, 72]
- Marambio-Jones, C. & Hoek, Eric M. V., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12 (5), Seite 1531–1551. doi: 10.1007/s11051-010-9900-y [zitiert auf S. 7]
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E. & Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*, 56 (5), Seite 358–392. doi: 10.1002/jemt.10040 [zitiert auf S. 77, 82]
- Markowska, K., Grudniak, A. M. & Wolska, K. I., 2013. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochimica Polonica*, 60 (4), Seite 523–530 [zitiert auf S. 7]
- van Martens, E., 1865. Eine eingewanderte Muschel. *Der Zoologische Garten - Zeitschrift für Beobachtung, Pflege und Zucht der Thiere*, 6 (2), Seite 50–59 und 89–97 [zitiert auf S. 18]
- McCarthy, M. P., Carroll, D. L. & Ringwood, A. H., 2013. Tissue specific responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to silver nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, 138, Seite 123–128. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.04.015 [zitiert auf S. 8, 10, 29, 89]
- McGeer, J. C., Brix, K. V., Skeaff, J. M., DeForest, D. K., Brigham, S. I., Adams, W. J. & Green, A., 2003. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: Implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (5), Seite 1017–1037. doi: 10.1002/etc.5620220509 [zitiert auf S. 10, 73, 83]
- McShan, D., Ray, P. C. & Yu, H., 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22 (1), Seite 116–127. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.010 [zitiert auf S. 8, 17]
- Moore, M. N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32 (8), Seite 967–976. doi: 10.1016/j.envint.2006.06.014 [zitiert auf S. 8]
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T. & Yacaman, M. J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16 (10), Seite 2346–2353. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059 [zitiert auf S. 8]

- Morton, B., 1969a. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* PALL.: I. General anatomy and morphology. *Journal of Molluscan Studies*, 38 (4), Seite 301–322 [zitiert auf S. 75, 76]
- Morton, B., 1969b. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* PALL.: III. Population dynamics. *Journal of Molluscan Studies*, 38 (6), Seite 471–482 [zitiert auf S. 20]
- Morton, B., 1971. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* PALL.: V. Some aspects of filter-feeding and the effect of micro-organisms on the rate of filtration. *Journal of Molluscan Studies*, 39 (4), Seite 289–301 [zitiert auf S. 74]
- Mueller, N. C. & Nowack, B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science and Technology*, 42 (12), Seite 4447–4453 [zitiert auf S. 7]
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C. & Piña, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environmental Pollution*, 159 (1), Seite 100–107. doi: 10.1016/j.envpol.2010.09.018 [zitiert auf S. 10, 29, 30, 89]
- Navarro, E., Baun, A. D., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi, P. H. & Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17 (5), Seite 372–386. doi: 10.1007/s10646-008-0214-0 [zitiert auf S. 7]
- van Nes, E. H., Noordhuis, R., Lammens, E. H., Portielje, R., Reeze, B. & Peeters, E. T., 2008. Modelling the effects of diving ducks on zebra mussels *Dreissena polymorpha* in lakes. *Ecological Modelling*, 211 (3-4), Seite 481–490. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2007.10.001 [zitiert auf S. 8]
- Nowack, B., 2010. Nanosilver revisited downstream. *Science*, 330 (6007), Seite 1054–1055. doi: 10.1126/science.1198074 [zitiert auf S. 7]
- O'Brien, N. & Cummins, E., 2010. Ranking initial environmental and human health risk resulting from environmentally relevant nanomaterials. *Journal of Environmental Science and Health*, 45, Seite 992–1007 [zitiert auf S. 7]
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M. & Markert, B., 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*, 9 (6), Seite 383–397. doi: 10.1023/A:1008972518019 [zitiert auf S. 9, 31]
- Oliver, A. L.-S., Croteau, M.-N., Stoiber, T. L., Tejamaya, M., Römer, I., Lead, J. R. & Luoma, S. N., 2014. Does water chemistry affect the dietary uptake and toxicity of silver nanoparticles by the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*? *Environmental Pollution*, 189, Seite 87–91. doi: 10.1016/j.envpol.2014.02.010 [zitiert auf S. 9]
- Osborne, O. J., Johnston, B. D., Moger, J., Balousha, M., Lead, J. R., Kudoh, T. & Tyler, C. R., 2013. Effects of particle size and coating on nanoscale Ag and

- TiO<sub>2</sub> exposure in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Nanotoxicology*, 7 (8), Seite 1315–1324. doi: 10.3109/17435390.2012.737484 [zitiert auf S. 92]
- Osterauer, R., Haus, N., Sures, B. & Köhler, H.-R., 2009. Uptake of platinum by zebrafish (*Danio rerio*) and ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and resulting effects on early embryogenesis. *Chemosphere*, 77 (7), Seite 975–982. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.08.033 [zitiert auf S. 9, 11, 32, 84, 85, 91]
- Osterauer, R., Fassbender, C., Braunbeck, T. & Köhler, H.-R., 2011. Genotoxicity of platinum in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*). *The Science of The Total Environment*, 409 (11), Seite 2114–2119. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.01.060 [zitiert auf S. 32]
- Palos Ladeiro, M., Aubert, D., Villena, I., Geffard, A. & Bigot, A., 2014. Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): interest for water biomonitoring. *Water Research*, 48, Seite 148–155. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.017 [zitiert auf S. 9]
- Parolini, M. & Binelli, A., 2014. Oxidative and genetic responses induced by Delta-9-tetrahydrocannabinol (Delta-9-THC) to *Dreissena polymorpha*. *The Science of The Total Environment*, 468, Seite 68–76. doi: 10.1007/s11356-014-3094-2 [zitiert auf S. 10, 30, 89]
- Paschen, H., Coenen, C., Fleischer, T., Grünwald, R., Oertel, D. & Revermann, C., 2004. *Nanotechnologie - Forschung, Entwicklung, Anwendung*. Springer-Verlag, Berlin, 366 Seiten. ISBN: 3540210687 [zitiert auf S. 8]
- PEN, (Project on Emerging Nanotechnologies), 2014. Consumer Products Inventory. URL <http://www.nanotechproject.org/cpi/browse/nanomaterials/silver-nanoparticle/>, Zugriff 12.11.2014 [zitiert auf S. 7]
- Peretyazhko, T. S., Zhang, Q. & Colvin, V. L., 2014. Size-Controlled Dissolution of Silver Nanoparticles at Neutral and Acidic pH Conditions: Kinetics and Size Changes. *Environmental Science and Technology*, 48 (20), Seite 11954–11961. doi: 10.1021/es5023202 [zitiert auf S. 69, 79]
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S. & Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14 (9). doi: 10.1007/s11051-012-1109-9 [zitiert auf S. 7]
- Rahnama, R., Javanshir, A. & Machinshian, A., 2011. The Effect of Lead Bioaccumulation on Condition Indices of Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) From Anzali Wetland-Caspian Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11 (4), Seite 561–568 [zitiert auf S. 87, 88]
- Rai, M., Birla, S., Ingle, A. P., Gupta, I., Gade, A., Abd-Elsalam, K., Marcato, P. D. & Duran, N., 2014. Nanosilver: an inorganic nanoparticle with myriad potential applications. *Nanotechnology Reviews*, 3 (3). doi: 10.1515/ntrev-2014-0001 [zitiert auf S. 7]

- Rainbow, P., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, 120 (3), Seite 497–507. doi: 10.1016/S0269-7491(02)00238-5 [zitiert auf S. 86]
- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K. & Lynch, I., 2013. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials*, 6 (6), Seite 2295–2350. doi: 10.3390/ma6062295 [zitiert auf S. 8]
- Renault, S., Baudrimont, M., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Mornet, S. & Brisson, A., 2008. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). *Gold Bulletin*, 41 (2), Seite 116–126 [zitiert auf S. 79]
- Roditi, H. A. & Fisher, N. S., 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. *Limnology and Oceanography*, 44 (7), Seite 1730–1749. doi: 10.4319/lo.1999.44.7.1730 [zitiert auf S. 19, 76, 77]
- Roditi, H. A., Caraco, N. F., Cole, J. J. & Strayer, D. L., 1996. Filtration of Hudson River Water by the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). *Estuaries*, 19 (4), Seite 824. doi: 10.2307/1352300 [zitiert auf S. 75]
- Roditi, H. A., Fisher, N. S. & Sañudo-Wilhelmy, S. A., 2000. Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature*, 407 (9), Seite 78–80. doi: 10.1038/35024069 [zitiert auf S. 9, 75]
- Sanders, B., 1993. Stress Proteins in Aquatic Organisms: An Environmental Perspective. *Critical Reviews in Toxicology*, 23 (1), Seite 49–75 [zitiert auf S. 10, 27]
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A. N. & Sarker, S., 2006. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15 (4), Seite 333–340. doi: 10.1007/s10646-006-0069-1 [zitiert auf S. 10]
- Sawasdee, B. & Köhler, H.-R., 2009. Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). *Chemosphere*, 75 (11), Seite 1539–1547. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.085 [zitiert auf S. 9, 32, 91]
- Sawasdee, B. & Köhler, H.-R., 2010. Metal sensitivity of the embryonic development of the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). *Ecotoxicology*, 19 (8), Seite 1487–1495. doi: 10.1007/s10646-010-0534-8 [zitiert auf S. 9, 11, 32, 84, 91, 92]
- Schaefer, M. & Brohmer, P., 2002. *Fauna von Deutschland - Ein Bestimmungsbuch unserer heimischen Tierwelt*. Quelle & Meyer, Wiebelsheim, 21. Auflage, 809 Seiten. ISBN: 3494014728 [zitiert auf S. 18]



- Schäfer, S., 2012. Comparison of Bioaccumulation and Biomarker Responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* After Exposure to Resuspended Sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Seite 614–627. doi: 10.1007/s00244-011-9735-2 [zitiert auf S. 10, 27, 54, 87]
- Schirling, M., Bowen, A., Triebkorn, R. & Köhler, H.-R., 2006. An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors. *Chemosphere*, (64), Seite 1730–1738 [zitiert auf S. 9, 11, 31, 34, 84, 91]
- Schmid, G., 1992. Large clusters and colloids. Metals in the embryonic state. *Chemical Reviews*, 92 (8), Seite 1709–1727. doi: 10.1021/cr00016a002 [zitiert auf S. 6]
- Schneider, D. W., 1992. A Bioenergetics Model of Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, Growth in the Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49 (7), Seite 1406–1416. doi: 10.1139/f92-156 [zitiert auf S. 88]
- Schreurs, W. J. A. & Rosenberg, H., 1982. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 152 (1), Seite 7–13 [zitiert auf S. 6]
- Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., Oehlmann, J., Watermann, B. & Scherf, S., 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xenoandrogen. *Ecotoxicology*, 9 (6), Seite 399–412. doi: 10.1023/A:1008924602089 [zitiert auf S. 9, 31]
- Schulz-Baldes, M., 1982. Tiere als Monitoringorganismen für Schwermetalle im Meer: Ein Überblick. In: Bick, H. & Neumann, D. (Hrsg.), *Bioindikatoren. Ergebnisse des Symposiums "Tiere als Indikatoren für Umweltbelastungen"*, 8.–11. 3. 1981 in Köln, Band 26, Seite 43–54. Decheniana-Beihefte, Bonn, 198 Seiten [zitiert auf S. 75, 76, 118]
- Shenashen, M. A., El-Safty, S. A. & Elshehy, E. A., 2014. Synthesis, Morphological Control, and Properties of Silver Nanoparticles in Potential Applications. *Particle & Particle Systems Characterization*, 31 (3), Seite 293–316. doi: 10.1002/ppsc.201300181 [zitiert auf S. 7]
- Sies, H., 1989. Zur Biochemie der Thiolgruppe: Bedeutung des Glutathions. *Naturwissenschaften*, 76 (2), Seite 57–64. doi: 10.1007/BF00396705 [zitiert auf S. 29]
- Singer, C., Zimmermann, S. & Sures, B., 2005. Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): comparison with lead and cadmium exposures. *Aquatic Toxicology*, 75 (1), Seite 65–75. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.07.004 [zitiert auf S. 87, 88]

- Sluyts, H., van Hoof, F., Cornet, A. & Paulussen, J., 1996. A dynamic new alarm system for use in biological early warning systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (8), Seite 1317–1323. doi: 10.1002/etc.5620150809 [zitiert auf S. 9, 19]
- Smetana, A. B., Klabunde, K. J., Marchin, G. R. & Sorensen, C. M., 2008. Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir*, 24 (14), Seite 7457–7464. doi: 10.1021/la800091y [zitiert auf S. 7, 93]
- Snyder, M. J., Girvetz, E. & Mulder, E. P., 2001. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41 (1), Seite 22–29. doi: 10.1007/s002440010217 [zitiert auf S. 88]
- Sprung, M. & Borchherding, J., 1991. Physiological and morphometric changes in *Dreissena polymorpha* (Mollusca, Bivalvia) during a starvation period. *Malacologia*, 33 (1-2), Seite 179–191 [zitiert auf S. 87]
- Tania, Y.-T. & Wang, W.-X., 2004. Detoxification and effects of Ag, Cd, and Zn pre-exposure on metal uptake kinetics in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Ecology Progress Series*, 268, Seite 161–172. doi: 10.3354/meps268161 [zitiert auf S. 19]
- Taniguchi, N., 1974. On the basic concept of ‚Nano-Technology‘. *Proceedings of the International Conference on Production Engineering: Tokyo*, (2), Seite 18–23 [zitiert auf S. 6]
- Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G. & Sheehan, D., 2010. Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology & Pharmacology*, 151 (2), Seite 167–174. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.10.002 [zitiert auf S. 8, 76]
- Teeguarden, J. G., Hinderliter, P. M., Orr, G., Thrall, B. D. & Pounds, J. G., 2007. Particokinetics *In Vitro*: Dosimetry Considerations for *In Vitro* Nanoparticle Toxicology Assessments. *Toxicological Sciences*, 97 (2), Seite 300–312. doi: 10.1093/toxsci/kfm097 [zitiert auf S. 71]
- Thienemann, A., 1950. Verbreitungsgeschichte der Süßwassertierwelt Europas: Versuch einer historischen Tiergeographie der europäischen Binnengewässer. In: Thienemann, A. (Hrsg.), *Die Binnengewässer: Einzeldarstellungen aus der Limnologie und ihren Nachbargebieten*, Band 18. Schweizerbart, Stuttgart, 809 Seiten [zitiert auf S. 18]
- Thio, B. J. R., Montes, M. O., Mahmoud, M. A., Lee, D.-W., Zhou, D. & Keller, A. A., 2012. Mobility of capped silver nanoparticles under environmentally relevant conditions. *Environmental Science and Technology*, 46 (13), Seite 6985–6991. doi: 10.1021/es203596w [zitiert auf S. 72]
- Umweltprobenbank des Bundes, 2013. Lagerbestand. URL: [http://www.umweltprobenbank.de/pb\\_static/fck/download/Lagerbestand\\_UPB\\_Umweltproben.pdf](http://www.umweltprobenbank.de/pb_static/fck/download/Lagerbestand_UPB_Umweltproben.pdf). Zugriff 27.2.2014. Seite 39–45 [zitiert auf S. 19]

- Varner, K. E., El-Badawy, A., Feldhake, D. & Venkatapathy, R., 2010. *State-Of-The-Science Review Nr. EPA/600/R-10/084: Everything NanoSilver and More*. Washington D.C., 365 Seiten [zitiert auf S. 6]
- Vijver, M. G., van Gestel, Cornelis A. M., Lanno, R. P., van Straalen, Nico M. & Peijnenburg, Willie J. G. M., 2004. Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance: A Review. *Environmental Science & Technology*, 38 (18), Seite 4705–4712. doi: 10.1021/es040354g [zitiert auf S. 10, 86]
- Voets, J., Redeker, E. S., Blust, R. & Bervoets, L., 2009. Differences in metal sequestration between zebra mussels from clean and polluted field locations. *Aquatic Toxicology*, 93 (1), Seite 53–60. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.03.006 [zitiert auf S. 10, 88]
- Völker, C., Gräf, T., Schneider, I., Oetken, M. & Oehlmann, J., 2014. Combined effects of silver nanoparticles and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21 (18), Seite 10661–10670. doi: 10.1007/s11356-014-3067-5 [zitiert auf S. 9]
- Wallace, W. G., Lee, B. G. & Luoma, S. N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series*, 249, Seite 183–197. doi: 10.3354/meps249183 [zitiert auf S. 10, 25, 26, 50, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 87, 88, 117]
- Walters, C. R., Pool, E. J. & Somerset, V. S., 2014. Ecotoxicity of silver nanomaterials in the aquatic environment: a review of literature and gaps in nanotoxicological research. *Journal of Environmental Science and Health*, 49 (13), Seite 1588–1601. doi: 10.1080/10934529.2014.938536 [zitiert auf S. 8]
- Wang, H., Qiao, X., Chen, J., Wang, X. & Ding, S., 2005. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 94 (2-3), Seite 449–453. doi: 10.1016/j.matchemphys.2005.05.005 [zitiert auf S. 20]
- Warneck, P. (Hrsg.), 1988. *Chemistry of the Natural Atmosphere*, Band 41 aus *International Geophysics Series*. Academic Press, San Diego, 757 Seiten. ISBN: 9780127356303 [zitiert auf S. 70]
- Wigginton, N. S., Haus, K. L. & Hochella, M. F., 2007. Aquatic environmental nanoparticles. *Journal of Environmental Monitoring*, 9 (12), Seite 1306–1316. doi: 10.1039/b712709j [zitiert auf S. 6]
- ten Winkel, E. H. & Davids, C., 1982. Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (Mollusca: Bivalvia). *Freshwater Biology*, 12 (6), Seite 553–558. doi: 10.1111/j.1365-2427.1982.tb00647.x [zitiert auf S. 75]
- Winston, G. W. & Di Giulio, R. T. D., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19 (2), Seite 137–161. doi: 10.1016/0166-445X(91)90033-6 [zitiert auf S. 29]

- 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. *Nano Letters*, 12 (8), Seite 4271–4275. doi: 10.1021/nl301934w [zitiert auf S. 8]
- Yang, W., Liu, C., Zhang, Z., Liu, Y. & Nie, S., 2013. Paper-based nanosilver conductive ink. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 24 (2), Seite 628–634. doi: 10.1007/s10854-012-0777-7 [zitiert auf S. 7]
- Yeager-Armstead, M. & Yeager, J. L., 2007. In Situ Toxicity Testing of Unionids. In: Farris, J. L. & van Hassel, J. (Hrsg.), *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*, Seite 135–149. CRC Press, Boca Raton, 375 Seiten. ISBN: 142004284X [zitiert auf S. 9, 19]
- Zimmermann, S., Menzel, C. M., Berner, Z., Eckhardt, J.-D., Stüben, D., Alt, F., Messerschmidt, J., Taraschewski, H. & Sures, B., 2001. Trace analysis of platinum in biological samples: a comparison between sector field ICP-MS and adsorptive cathodic stripping voltammetry following different digestion procedures. *Analytica Chimica Acta*, 439 (2), Seite 203–209. doi: 10.1016/S0003-2670(01)01041-8 [zitiert auf S. 14]
- Zimmermann, S., Alt, F., von Bohlen, A., Taraschewski, H. & Sures, B., 2002. Biological availability of traffic-related platinum-group elements (palladium, platinum, and rhodium) and other metals to the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in water containing road dust. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 (12), Seite 2713–2718 [zitiert auf S. 9, 74]
- Zimmermann, S., Messerschmidt, J., von Bohlen, A. & Sures, B., 2005. Uptake and bioaccumulation of platinum group metals (Pd, Pt, Rh) from automobile catalytic converter materials by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Research*, 98 (2), Seite 203–209. doi: 10.1016/j.envres.2004.08.005 [zitiert auf S. 22]
- Zuykov, M., Pelletier, E., Belzile, C. & Demers, S., 2011. Alteration of shell nacre micromorphology in blue mussel *Mytilus edulis* after exposure to free-ionic silver and silver nanoparticles. *Chemosphere*, 84 (5), Seite 701–706. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.03.021 [zitiert auf S. 8]
- de Zwart, D., Kramer, K. J. M. & Jenner, H. A., 1995. Practical experiences with the biological early warning system „mosselmonitor“. *Environmental Toxicology & Water Quality*, 10 (4), Seite 237–247. doi: 10.1002/tox.2530100403 [zitiert auf S. 19]

## 2 Abbildungen

II.1.1	Übersicht der Untersuchungen dieser Arbeit . . . . .	13
II.3.1	Sektion und morphometrische Messungen an <i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	23
II.3.2	Schematischer Zellaufbau . . . . .	25
II.3.3	Zellfraktionierung nach Wallace <i>et al.</i> (2003) . . . . .	26
II.3.4	Auswertung der Hitzeschockprotein-Banden . . . . .	28
II.4.1	Foto eines 14 Tage alten <i>Marisa cornuarietis</i> -Embryos im Ei . . . . .	31
III.1.1	Anteil gelösten Silbers in „altem“ und „neuem“ nanopartikulärem Silber . . . . .	41
III.1.2	Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuungs-Analyse gealterter Nanosilber-Stamm suspensionen. Quelle: AG Prof. Dr. Epple, Universität Duisburg-Essen . . . . .	42
III.1.3	Auflösung von nanopartikulärem Silber nach einmaligem Sauerstoffkontakt . . . . .	43
III.1.4	Ausfällung und Aggregation von nanopartikulärem Silber in rekonstituiertem Wasser . . . . .	45
III.2.1	Silberkonzentrationen im <i>Dreissena polymorpha</i> -Expositionsmedium . . . . .	47
III.2.2	Organspezifische Ag-Akkumulation in <i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	49
III.2.3	Subzelluläre Silberverteilung in <i>Dreissena polymorpha</i> : Säulen-Diagramme . . . . .	52
III.2.4	Subzelluläre Silberverteilung in <i>Dreissena polymorpha</i> : Kreis-Diagramme . . . . .	53
III.2.5	Fitness-Index von <i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	54
III.2.6	Hitzeschockprotein 70-Konzentration in <i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	55
III.2.7	Glutation-S-Transferasen-Aktivität in <i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	56
III.2.8	Katalase-Aktivität in <i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	57

---

III.3.1	Wasserproben des <i>Marisa</i> Embry Toxicity Tests . . . . .	58
III.3.2	Silberaufnahme in <i>Marisa cornuarietis</i> -Embryonen . . . . .	59
III.3.3	Netto-Mortalität von <i>Marisa cornuarietis</i> -Embryonen . . . . .	61
III.3.4	Netto-Entwicklungsdauer von <i>Marisa cornuarietis</i> -Embryonen .	63
III.3.5	Trockenmassen geschlüpfter <i>Marisa cornuarietis</i> -Embryonen . .	65
III.3.6	Herzfrequenz von <i>Marisa cornuarietis</i> -Embryonen . . . . .	66
IV.2.1	Metall-Aufnahmeschema in <i>Mytilus edulis</i> . Quelle: Schulz-Baldes (1982) . . . . .	75
IV.3.1	Schematische Darstellung der Silber-Detoxifizierung in Orga- nismen . . . . .	86
VI.1.1	Molekularstruktur von Polyvinylpyrrolidon . . . . .	128
VI.1.2	Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme von PVP-ummanteltem nanopartikulärem Silber. Quelle: AG Prof. Dr. Epple, Universi- tät Duisburg-Essen . . . . .	128
VI.1.3	DLS-Diagramm der Größenverteilung von nanopartikulärem Silber. Quelle: AG Prof. Dr. Epple, Universität Duisburg-Essen	128

### 3 Tabellen

II.1.1	Mikrowellenaufschluss-Programm . . . . .	14
II.1.2	Atomabsorptionsspektrometer-Programm . . . . .	15
II.3.1	Parameter des <i>Dreissena polymorpha</i> -Expositionsversuchs . . . .	21
II.4.1	Versuchsansätze des <i>Marisa</i> Embryo Toxicity Tests . . . . .	33
IV.1.1	Berechnung des O <sub>2</sub> : Nanosilber-Verhältnisses in den Nanosilber- Aliquoten . . . . .	70
VI.5.1	Wasserparameter des Versuchs zum Verhalten von nanoparti- kulärem Silber im Expositionsmedium . . . . .	134
VI.5.2	Beprobungszeitpunkte des <i>Dreissena polymorpha</i> -Expositions- mediums . . . . .	134
VI.5.3	Biotische Parameter des <i>Dreissena polymorpha</i> -Expositionsver- suchs . . . . .	135
VI.5.4	Abiotische Wasserparameter des <i>Marisa</i> Embryo Toxicity Tests	136
VI.5.5	Weichgewebe-Daten von <i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	136
VI.5.6	Absolute Mortalität von <i>Marisa cornuarietis</i> -Embryonen . . . .	137
VI.5.7	Absolute Entwicklungsdauer von <i>Marisa cornuarietis</i> -Embryonen	138
VI.5.8	Absolute Herzfrequenz von <i>Marisa cornuarietis</i> -Embryonen . .	139

## 4 Formeln

II.3.1	Biokonzentrationsfaktor nach Elder & Collins (1991) . . . . .	24
II.3.2	Fitness-Index von <i>Dreissena polymorpha</i> . . . . .	27
II.3.3	Glutation-S-Transferasen-vermittelte Reaktion . . . . .	29
II.3.4	Berechnung der Glutathion-S-Transferasen-Aktivität . . . . .	29
II.3.5	Katalase-vermittelte Reaktion . . . . .	30
II.3.6	Berechnung der Extinktionsänderung in den <i>Dreissena polymorpha</i> -Proben bei 240 nm . . . . .	30
II.3.7	Berechnung der Katalase-Aktivität . . . . .	30
II.4.1	Netto-Mortalität von <i>Marisa cornuarietis</i> . . . . .	35
II.4.2	Netto-Entwicklungsdauer von <i>Marisa cornuarietis</i> . . . . .	35
II.4.3	Netto-Herzfrequenz von <i>Marisa cornuarietis</i> . . . . .	36
III.2.1	Biokonzentrationsfaktor von <i>Dreissena polymorpha</i> , mit 10 µg Ag <sup>+</sup> /L exponiert . . . . .	48
III.3.1	Biokonzentrationsfaktor von <i>Marisa cornuarietis</i> , mit 200 µg „neuem“ npAg/L exponiert . . . . .	60
III.3.2	Biokonzentrationsfaktor von <i>Marisa cornuarietis</i> , mit 10 µg „altem“ npAg/L exponiert . . . . .	60
III.3.3	Biokonzentrationsfaktor von <i>Marisa cornuarietis</i> , mit 10 µg Ag <sup>+</sup> /L exponiert . . . . .	60

Mittelwert: 
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Standardabweichung: 
$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$



## 5 Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
BCF	Biokonzentrationsfaktor; englisch: bioconcentration factor
DLS	dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure; englisch: deoxyribonucleic acid
dpi	Bildpunkte pro Zoll; englisch: dots per inch
ED	Entwicklungdauer
FI	Fitness-Index, FI, = Weichkörpermasse / Schalenmasse von <i>D. polymorpha</i>
FM	Feuchtmasse
GST	Glutathion-S-Transferasen
HF	Herzfrequenz
HSP 70	Hitzeschockproteine mit einer Masse von 70 kDa
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma; englisch: inductively coupled plasma
kDa	Kilo-Dalton, Maßeinheit für molekulare Masse. $1 \text{ Da} = \frac{1}{12}$ der Masse des Kohlenstoffisotops $^{12}\text{C}$
<i>Mari</i> ETT	<i>Marisa</i> Embryo Toxicity Test
NED	Netto-Entwicklungsdauer
NHF	Netto-Herzfrequenz
NM	Netto-Mortalität
npAg	nanopartikuläres Silber
PVP	Polyvinylpyrrolidon, das Hüllpolymer des verwendeten npAg
SD	Standardabweichung; englisch: standard deviation
TM	Trockenmasse
U	Umdrehungen / Maß für die Substrat-Umsatzaktivität eines Enzyms
UV	ultraviolette Strahlung mit Wellenlängen $< 400 \text{ nm}$

# VI

## Anhang

### 1 Chemikalien (alphabetisch)

**Absättigungs-** TBS : Pferdeserum im Verhältnis 1 : 1  
**lösung**

**Acrylamid** Rotiphorese® Gel 30, wässrige Lösung mit  
Acrylamid : Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1, Carl Roth  
GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. 3029.2

**Ag<sup>+</sup>** Wässrige ICP-Stadardlösung, Bernd Kraft GmbH, Duisburg,  
Artikel-Nr. 03957, 1 g Ag/L als Ag<sup>+</sup> in 0,5 mol HNO<sub>3</sub>/L.

**APS** Ammoniumperoxodisulfat, ≥ 98 %, Merck KGaA, Darmstadt,  
Artikel-Nr. 1012010100

**Bromphenol-** Merck KGaA, Darmstadt, Artikel-Nr. 1081220005  
**blau**

**CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O** Calciumchlorid-Dihydrat, ≥ 99,5 %, analysenrein, AppliChem  
GmbH, Darmstadt, Artikel-Nr. A3587

**CDNB** 4-Chlor-1,3-dinitrobenzol, ≥ 97%, Sigma-Aldrich® Chemie  
GmbH, München, Artikel-Nr. 138630

**Chloro-** 4-Chloro-1-naphthol, ≥ 99%, Sigma-Aldrich® Chemie GmbH,  
**naphthol** München, Artikel-Nr. 25328 Fluka

	Substanz	Menge (g)
<b>Elektroden-</b> <b>Puffer</b>	Glycin	14,3
	TRIS	3,03
	SDS	1

Mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen.

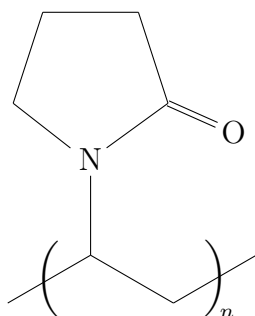
	Substanz	Konzentration	Menge
<b>Elektrophorese-Gel 1: Sammelgel</b>	Reinstwasser		2,47 mL
	Sammelgel-Puffer		1,13 mL
	Acrylamid	30 %	0,9 mL
	APS	10 %	27 µL
	TEMED		3,15 µL
	Ausreichend für zwei 0,75 mm dicke Gele. Nach dem Gießen mindestens 40 min aushärten lassen.		
<b>Elektrophorese-Gel 2: Trenngel</b>	Reinstwasser		2,8 mL
	Acrylamid	30 %	3,2 mL
	Trenngel-Puffer		2 mL
	APS	10 %	48 µL
	TEMED		5,6 µL
	Ausreichend für zwei 0,75 mm dicke Gele. Nach dem Gießen mit Methanol überschichten und 20 min aushärten lassen.		
<b>Ethanol</b>	Rotipuran <sup>®</sup> , ≥ 99,8 %, analysenrein, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. 9065.4		
<b>Färbelösung</b>	Substanz	Konzentration	Menge
	TBS		27 mL
	Ethanol	96 %	3 mL
	Chloronaphtol		9 mg
	Direkt vor der bis zu 10 min dauernden Reaktion 60 µL 30 %-ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung hinzugeben, Färbvorgang in Reinstwasser beenden.		
<b>Glutathion</b>	L-Glutathione reduced, ≥ 98%, Sigma-Aldrich <sup>®</sup> Chemie GmbH, München, Artikel-Nr. G4251-G1		
<b>Glycerin</b>	Rotipuran <sup>®</sup> , ≥ 99 %, analysenrein, wasserfrei, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. 3783.1		
<b>Glycin</b>	Pufferan <sup>®</sup> , ≥ 99 %, analysenrein, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. 3908.2		
<b>GST-Reaktionslösung</b>	980 µL Phosphatpuffer + 10 µL 200 mM Glutathion + 10 µL 100 mM CDNB		
<b>HCl</b>	Salzsäure, 30 %, suprapur <sup>®</sup> , Merck KGaA, Darmstadt, Artikel-Nr. 1003181000		

<b>HEPES</b>	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure, Pufferan <sup>®</sup> , $\geq 99,5\%$ , Zellkulturqualität, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. HN77.3	
<b>HNO<sub>3</sub></b>	65 %, analysenrein, zusätzlich destilliert, Bernd Kraft GmbH, Duisburg, Artikel-Nr. 05119.4100	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid, 30 %, suprapur <sup>®</sup> , Merck KGaA, Darmstadt, Artikel-Nr. 1072981000 (für die Silber-Analytik) bzw. analysenrein, AppliChem GmbH, Darmstadt, Artikel-Nr. A1134,1000 (für Katalase-Aktivität)	
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid, $\geq 99\%$ , reinst, AppliChem GmbH, Darmstadt, Artikel-Nr. A1362	
<b>Laemmli-Puffer</b>	Substanz	Menge
	Glycerin	20 mL
	Mercaptoethanol	300 $\mu$ L
	SDS	3 g
	TRIS-hydrochlorid	140 mg
	TRIS	20 mg
	Bromphenolblau	5 mg
	Mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen.	
<b>Mercaptoethanol</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Artikel-Nr. 1154330100	
<b>Methanol</b>	analysenrein, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA, Artikel-Nr. A412-1	
<b>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</b>	Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\geq 99\%$ , reinst, AppliChem GmbH, Darmstadt, Artikel-Nr. A1368	
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid, $\geq 99\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. P029.2 und $\geq 99,5\%$ , VWR International GmbH, Darmstadt, Artikel-Nr. 27810.295	
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat, $\geq 99\%$ , AppliChem GmbH, Darmstadt, Artikel-Nr. A1353	
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	Natriumnitrat, $\geq 99\%$ , Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. 8601.2	
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid, $\geq 98\%$ , in Plätzchen, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. P031.3, mit Reinstwasser eine Lösung herstellen	

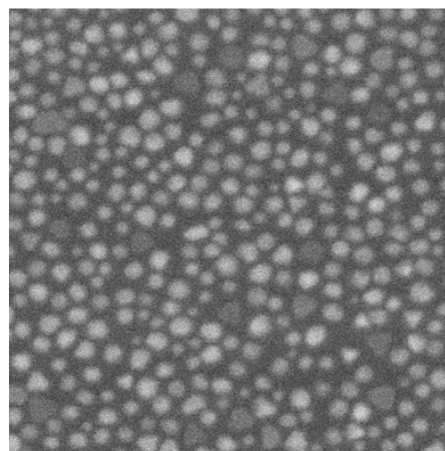
<b>npAg (nanopartikuläres Silber)</b>	Die Synthese erfolgte durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Epple, Universität Duisburg-Essen, Abteilung Anorganische Chemie, entsprechend dem von Diendorf (2012) beschriebenen Protokoll durch Reduktion mit Glukose in Anwesenheit von Polyvinylpyrrolidon (PVP). Das in Reinstwasser suspendierte npAg wurde zur Vorbeugung oxidativer Prozesse unter einer Argon-Gasatmosphäre abgefüllt. Die Silberkonzentration dieser Stammlösung wurde durch die AG Prof. Dr. Epple, Universität Duisburg-Essen, per Atom-Absorptionsspektrometrie (AAS) ermittelt (ca. 1 g/L). Das Zetapotential betrug ca. -25 mV. Der Durchmesser des Metallkerns war im Mittel 70 nm (bestimmt durch Rasterelektronenmikroskopie, Abb. VI.1.2, S. 128, AG Prof. Dr. Epple). Der mittlere hydrodynamische Durchmesser schwankte zwischen 100 und 140 nm und der Polydispersitätsindex überstieg nie einen Wert von 0,3 (beides durch die AG Prof. Dr. Epple mit dynamischer Lichtstreuung [DLS] bestimmt). Die Stammsuspension wurde in 1,5 mL-Eppendorf®-Reaktionsgefäßen, deren Verschlüsse zusätzlich mit Parafilm® umwickelt waren, bei 7 °C im Kühlschrank gelagert.												
<b>Pferdeserum</b>	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, München, Artikel-Nr. H1138												
<b>Phosphatpuffer</b>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Substanz</th> <th style="text-align: center;">Konzentration</th> <th style="text-align: center;">Menge (mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></td> <td style="text-align: center;">0,5 M</td> <td style="text-align: center;">154,8</td> </tr> <tr> <td>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></td> <td style="text-align: center;">1 M</td> <td style="text-align: center;">22,6</td> </tr> <tr> <td>KCl</td> <td style="text-align: center;">1 M</td> <td style="text-align: center;">100</td> </tr> </tbody> </table> <p>Mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen. pH = 7,4. Für die Muschelpräparation wurde ein Proteasehemmer (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, München, Artikel-Nr. P8340) mit einer Endkonzentration von 5 Volumen-% hinzugefügt.</p>	Substanz	Konzentration	Menge (mL)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 M	154,8	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 M	22,6	KCl	1 M	100
Substanz	Konzentration	Menge (mL)											
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 M	154,8											
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 M	22,6											
KCl	1 M	100											
<b>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</b>	Thermo Scientific, Inc., USA, Artikel-Nr. 23225 (für Proteinbestimmung)												
<b>Primärantikörper</b>	Maus-Anti-HSP 70, antibodies-online GmbH, Aachen, Artikel-Nr. ABIN361738												
<b>Primärantikörper-Suspension</b>	je Membran 4,5 mL TBS + 0,5 mL Pferdeserum + 1 µL Primärantikörper												
<b>Proteasehemmer</b>	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, München, Artikel-Nr. P8340												

<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidon, mittlere Molmasse 40 kDa, Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, München, Artikel-Nr. 02286, Strukturformel s. Abb. VI.1.1, S. 128. Vor der Verwendung in Expositionsversuchen wurde mit Reinstwasser eine Stammsuspension mit einer Konzentration von ca. 0,1 g PVP/L hergestellt.	
<b>Referenzmaterial</b>	Gefriergetrocknetes Standard Reference Material 1566b oyster tissue des National Institute of Standards and Technology, U. S. Department of Commerce	
<b>Reinstwasser</b>	Mit deionisiertem Wasser beschicktes Q-Gard 2 Purification Pack, Merck Millipore, USA, ausgerüstet mit einem 0,22 µm-Milipak® Express-Membranfilter	
<b>Rekonstituiertes Wasser</b>	Substanz	Menge (mg)
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	446,8
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	187,3
	NaHCO <sub>3</sub>	98,4
	KCl	17,3
	NaCl	0,4
	Mit deionisiertem Wasser auf 1 L auffüllen.	
<b>Sammelgel-Puffer</b>	Substanz	Menge (g)
	TRIS	1,68
	TRIS-hydrochlorid	17,5
	SDS	2
	Mit Reinstwasser auf 0,5 L auffüllen und mit HCl bzw. NaOH auf pH = 6,8 einstellen.	
<b>SDS</b>	Dodecylsulfat-Natriumsalz, analysenrein, SERVA Electrophoresis GmbH, Artikel-Nr. 20763.01	
<b>Sekundärantikörper</b>	Ziegen-Anti-Maus-Immunglobulin-Suspension, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Artikel-Nr. P0447	
<b>Sekundärantikörper-Suspension</b>	je Membran 4,5 mL TBS + 0,5 mL Pferdeserum + 5 µL Sekundär-Antikörper	

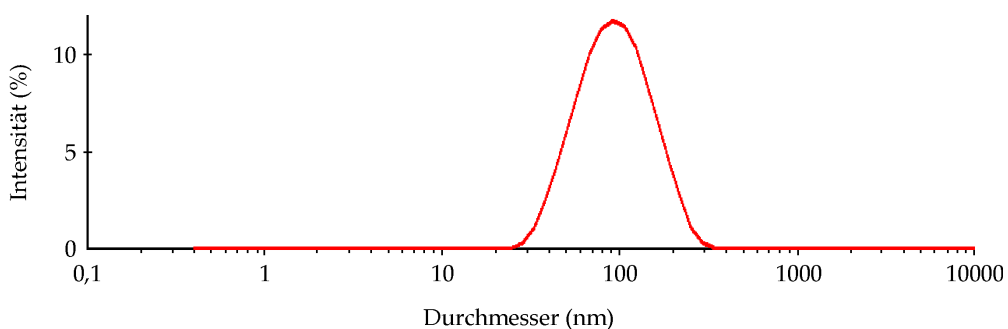
	Substanz	Menge (g)
<b>TBS</b>	NaCl	8,8
	TRIS-hydrochlorid	6,35
	TRIS	1,18
	Mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen und mit HCl bzw. NaOH auf pH = 7,5 einstellen.	
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin, 99 %, analysenrein, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. 2367.3	
<b>TetraMin<sup>®</sup> Flocken- futter</b>	Tetra GmbH, Melle, Artikel-Nr. 201272	
	Substanz	Menge
<b>Transfer- Puffer</b>	Methanol	200 mL
	TRIS	5,072 g
	Glycin	2,904 g
	TRIS-hydrochlorid	760 mg
	SDS	368 mg
	Mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen.	
	Substanz	Menge (g)
<b>Trenngel- Puffer</b>	TRIS	76,95
	TRIS-hydrochlorid	18,5
	SDS	2
	Mit Reinstwasser auf 0,5 L auffüllen und mit HCl bzw. NaOH auf pH = 8,8 einstellen.	
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Pufferan <sup>®</sup> , ≥ 99,3 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. AE15.2	
<b>TRIS- hydrochlorid</b>	Pufferan <sup>®</sup> , ≥ 99 %, analysenrein, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Artikel-Nr. 9090.2	



**Abbildung VI.1.1:**  
Molekularstruktur von Polyvinylpyrrolidon (PVP), dem Hüll-Polymer von npAg.  
Nach: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/pvp40?>, Zugriff 23.11.2014.



**Abbildung VI.1.2:**  
Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme von PVP-ummanteltem npAg. Das Bild entspricht einem Ausschnitt von  $1 \times 1 \mu\text{m}$ .  
Quelle: AG Prof. Dr. Epple, Universität Duisburg-Essen.



**Abbildung VI.1.3:** Beispielhafte Größenverteilung von frisch hergestelltem npAg, gemessen mit dynamischer Lichtstreuung.  
Quelle: AG Prof. Dr. Epple, Universität Duisburg-Essen.



## 2 Materialien

<b>AAS-Probengefäß</b>	Polystyrol, 1,5 mL, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Artikel-Nr. 73.641
<b>Filtrationsvorsatz</b>	Polycarbonat, Sartorius AG, Göttingen, Artikel-Nr. 16517
<b>Eppendorf®-Reaktionsgefäß</b>	Polypropylen, Eppendorf Tube® 3810X, 1,5 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Artikel-Nr. 0030125150 (Aufbewahrung der npAg-Stammsuspension)
<b>Mikropistill</b>	Eppendorf®-Mikropistill, Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, München, Artikel-Nr. Z317314
<b>Mikrotiterplatte</b>	96-er, BRANDplates® pure Grade™, Brand GmbH & CO. KG, Wertheim, Artikel-Nr. 781602 (normal-transparent) und Artikel-Nr. 781614 (UV-durchlässig)
<b>Mikrowellengefäß</b>	100 mL, Körper und Deckel aus Teflon PFA®, CEM Corporation, USA, Artikel-Nr. 600214
<b>Nitrocellulosemembran I</b>	Whatman GmbH, Dassel, Artikel-Nr. 10404006 (0,45 µm Porengröße), bzw. ehemals Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Artikel-Nr. 400112 (8 µm), Artikel-Nr. 403010 (1,2 µm) und Artikel-Nr. 401712 (0,2 µm Porengröße, für Filtration der Wasserproben und npAg-Verdünnungen)
<b>Nitrocellulosemembran II</b>	0,2 µm Porengröße, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA, Artikel-Nr. 162-0112 (für Western Blot)
<b>Petrischale</b>	Polystyrol, Ø 9,4 cm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Artikel-Nr. 632102
<b>Plastiksieb</b>	Polypropylen, Fackelmann GmbH & Co. KG, Hersbruck, Artikel-Nr. 49240 (Ø 6 cm) und Artikel-Nr. 49241 (Ø 9 cm)

---

<b>Probengefäß</b>	15 mL-Zentrifugationsröhre mit Schraubverschluss, Polypropylen, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Artikel-Nr. 62.554.001 (für Wasserproben und Gewebeaufschlüsse)
<b>Spritze</b>	HSW SOFT-JECT®-Einmal-Plastikpritze, max. 60 mL, dreiteilig mit Luer-Lock-Ansatz, Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen (für Wasserproben)
<b>Sprudelstein</b>	Tetra GmbH, Melle, Modell AS 40
<b>Versuchsaquarium</b>	Polystyrol, Savic®, Belgien, Artikel-Nr. 001240000 (22 L, Muschelexposition) und Artikel-Nr. 01250125 (30 L, npAg-Verhalten im Medium)

### 3 Geräte

<b>Analysenwaage I</b>	Sartorius AG, Göttingen, Modell M-Power AZ313 (für Chemikalien-Einwaage)
<b>Analysenwaage II</b>	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Modell Libror AEG-220 und Faust Laborbedarf AG, Schweiz, Modell FA 110-4i (für Gewebe-Einwaagen)
<b>Atomabsorptionsspektrometer (AAS) I</b>	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometer mit Zeeman-Untergrundkorrektur, PerkinElmer, Inc., USA, Modell 4100ZL (verwendet für die Silberbestimmung sämtlicher biologischer Proben und Wasserproben)
<b>AAS II</b>	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometer mit Zeeman-Untergrundkorrektur, PerkinElmer, Inc., USA, Modell AAnalyst 600 (verwendet für die Silberbestimmung verdünnter npAg-Stamm-suspensionen)
<b>AAS III</b>	Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometer mit Zeeman-Untergrundkorrektur, PerkinElmer, Inc., USA, Modell 4110ZL (verwendet von der AG Prof. Dr. Epple, Universität Duisburg-Essen, für die Silberbestimmung unverdünnter npAg-Stamm-suspensionen)
<b>Gefriertrocknung</b>	Thermo Fisher Scientific, Inc., USA, Modell Heto PowerDry <sup>®</sup> LL3000 + Drehschieber-Vakuumpumpe, vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Modell RZ 2.5
<b>Gelelektrophoresekammer (+ Zubehör)</b>	Mini-PROTEAN <sup>®</sup> Tetra System, Bio-Rad Laboratories Inc., USA, Artikel-Nr. 165-8000
<b>Gewebe-Homogenisierer I</b>	Dispergierstab mit rotierenden Klingen, ULTRA-TURRAX <sup>®</sup> , IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Modell T25
<b>Gewebe-Homogenisierer II</b>	Ultraschall-Dispergierstab, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Modell GM 2070
<b>Konduktometer</b>	WTW GmbH, Weinheim, Modell Cond 3210 mit Elektrode TetraCon <sup>®</sup> 325

---

<b>Mikrowelle</b>	CEM Corporation, USA, Modell Mars 5 <sup>TM</sup>
<b>Oxymeter</b>	WTW GmbH, Weinheim, Modell Oxi3210 mit OxiCal <sup>®</sup> -SL-Sonde
<b>pH-Meter</b>	WTW GmbH, Weinheim, Modell pH 3210 mit pH-Elektrode SenTix 41
<b>Photometer</b>	TECAN Group Ltd., Schweiz, Modell Infinite <sup>TM</sup> 200 PRO
<b>Scanner</b>	Canon, Inc., Japan, Modell CanoScan LiDE 700F
<b>Spannungsgeber</b>	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA, Modell PowerPac <sup>TM</sup> 200
<b>Stereomikroskop</b>	Olympus Corporation, Japan, Modell SZ51
<b>Ultrazentrifuge</b>	Beckman Coulter <sup>®</sup> , Inc., USA, Modell Optima <sup>TM</sup> Max-XP (für > 20000 g)
<b>Western-Blot-Kammer</b>	Trans-Blot <sup>TM</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
<b>Zentrifuge</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Modell 5810 R (für bis zu 20000 g)
<b>Zetasizer</b>	Malvern Zetasizer Nano ZS ZEN 3600, Malvern Instruments Ltd., England (verwendet von der AG Prof. Dr. Epple, Universität Duisburg-Essen, für DLS und Bestimmung des npAg-Zeta-Potentials)

## 4 Software

Canon MP Navigator EX, Version 2.1 (Einscannen der HSP-Banden)

Corel® PHOTO-PAINT™ X6, Version 16 1.0.843 (Bildbearbeitung)

GraphPad Prism®, Version 5.04 (Statistik)

ImageJ, Version 1.45s (HSP-Banden-Auswertung)

Microsoft Excel® 2010, Version 14.0.7128.5000, 32-Bit (Datenaufbereitung)

SigmaPlot™, Versionen 12.0 und 12.5 (Graphische Darstellung)

STATISTICA, Version 12.5 (Statistik)

Tecan i-control, Version 1.2 (Photometer)

Visual MINTEQ, Version 3.0 (Lösungsgleichgewichts-Berechnung)

## 5 Zusätzliche Daten

### Zu II.2.2: Untersuchungen zur Stabilität der Nanopartikel/ Verhalten im Expositionsmedium

**Tabelle VI.5.1:** Wasserparameter des Versuchs zum Verhalten von npAg im Expositionsmedium, im Vergleich zu Ag<sup>+</sup>. Die Angaben entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  SD) von 15 Messwerten im Zeitraum von 5 min bis 14 d nach Versuchsbeginn.

	Ag <sup>+</sup>	npAg
Temperatur (°C)	14,8 (0,1)	15 (0,1)
pH	7,7 (0,4)	7,7 (0,3)
Leitfähigkeit ( $\mu$ S/cm)	1033 (8)	1051 (4)

### Zu II.3.2.2: Expositionsversuch mit *Dreissena polymorpha* Expositionsmedium

**Tabelle VI.5.2:** Beprobungszeitpunkte der *Dreissena polymorpha*-Expositionsmedien nach Versuchsbeginn. Versuchsansätze: Kontrolle (rekonstituiertes Wasser), PVP, npAg und Ag<sup>+</sup>, jeweils nominell 100  $\mu$ g/L.

	0	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	12 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	7 d	14 d	21 d
Langzeitversuch	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x
Kurzzeitversuch	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							

### Zu II.3.2.2: Expositionsversuch mit *Dreissena polymorpha* Biotische Parameter

**Tabelle VI.5.3:** Biotische Parameter des *Dreissena polymorpha*-Expositionsversuchs. Nominelle Expositions-konzentration: 100 µg/L. Die Angaben entsprechen Mittelwerten ( $\pm$  SD).

	Langzeit-Exposition			Kurzzeit-Exposition			
	Kontrolle	PVP	Ag <sup>+</sup>	Kontrolle	PVP	Ag <sup>+</sup>	npAg
Probenahme-zeitpunkte		Tag 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21			Tag 0, 1 Stunde 1, 3, 6, 12		
Schalenbreite (cm, n $\geq$ 76)	1,2 (0,2)	1,2 (0,2)	1,2 (0,2)	1,1 (0,2)	1,1 (0,2)	1,1 (0,2)	1,1 (0,2)
Schalenhöhe (cm, n $\geq$ 78)	1,1 (0,2)	1,1 (0,1)	1,1 (0,1)	1,1 (0,1)	1,1 (0,1)	1,1 (0,1)	1,1 (0,1)
Schalenmasse (mg, n $\geq$ 72)	620 (285)	631 (280)	608 (267)	548 (229)	532 (233)	564 (250)	517 (213)
Weichkörper- masse (mg, n $\geq$ 72)	342 (143)	340 (130)	329 (134)	337 (132)	310 (113)	332 (136)	322 (125)

## Zu II.4: Wasserparameter des *MariETT*

**Tabelle VI.5.4:** Abiotische Wasserparameter im *Marisa* Embryo Toxicity Test. Die Messungen wurden jeweils nach 24-stündiger Verwendung des Expositionsmediums durchgeführt. Die Angaben entsprechen Mittelwerten. n = 1–2.

	Kontrolle	PVP	Ag <sup>+</sup>		npAg „alt“*	
Nominalkonzentration (µg/L)	0	200	10	30	30	50
pH	7,8	7,6	7,6	7,7	7,6	7,6
Leitfähigkeit (µS/cm)	934	956	966	966	964	941

\* vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40)

## Zu III.2.2.1: Expositionsversuch mit *Dreissena polymorpha* organspezifische Daten

**Tabelle VI.5.5:** Weichgewebe-Daten (± SD) von *Dreissena polymorpha* über alle Expositionen hinweg. Schalenlänge der Muscheln: 1,8–2,8 mm.

	gesamtes Weichgewebe	Mantel/ Muskulatur	Kiemen	Gonade/ Verdauungstrakt
FM (mg)	333 (134)	129 (54)	53 (33)	81 (37)
			n > 1984 Muscheln	
Wassergehalt (%)	91,1 (1)	90,5 (0,8)	92,9 (1)	91,2 (1,1)
	n = 14 * 7 Muscheln		n = 46 * > 34 Muscheln	



Zu III.3.3.1: Mortalität von *Marisa cornuarietis*Tabelle VI.5.6: Absolute Mortalität der *M. cornuarietis*-Embryonen im MariETT.

	Kontrolle			PVP			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			Ag <sup>+</sup>			npAg „alt“*			npAg „neu“*										
	0	10	22	48	50	100	200	10	17	45	85	100	30	50	100	200	10	30	50	100	200	10	30	50	100	200
Expositions- konzentration (µg/L)	0	10	22	48	50	100	200	10	17	45	85	100	30	50	100	200	10	30	50	100	200	10	30	50	100	200
Mortalität (%)																										
SD	37	6	8	19	34	5	39	25	0	16	24	24	42	0	38	33										
n	60	6	7	5	19	7	18	20	28	5	8	5	8	9	6	10	20	20	28	5	8	5	8	9	6	10

\* vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40)

Zu III.3.3.2: Entwicklungsdauer von *Marisa cornuarietis*Tabelle VI.5.7: Absolute Entwicklungsdauer der *Marisa cornuarietis*-Embryonen im MariETT.

Kontrolle	PVP			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			Ag <sup>+</sup>			npAg „alt“*			npAg „neu“*	
	0	10	50	100	200	10	50	10	30	50	100	200	10	200
Expositions- konzentration (µg/L)														
Entwicklungsdauer (d)	14,4	12,9	13,3	12,7	14,7	12,6	15	12,6	12,7	15,4	11,7	10,5	15,9	15,8
SD	2,3	1	0,6	0,7	2,3	0,7	2,2	0,5	1,3	3,4	3,9	4,3	1,5	1,4
n	50	6	7	5	7	7	14	7	8	3	8	6	4	11

\* vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40)

### Zu III.3.3.4: Herzfrequenz von *Marisa cornuarietis*

**Tabelle VI.5.8:** Absolute Herzfrequenz der *Marisa cornuarietis*-Embryonen am 9. Expositionstag des MariETT.

	Kontrolle		PVP		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		Ag <sup>+</sup>		npAg „alt“*			npAg „neu“*				
	0	10	50	100	200	10	50	10	30	50	100	200	10	200		
Expositions- konzentration (µg/L)																
Herzfrequenz (Schläge/20 s)	20,7	20,4	19,9	20,1	18,1	18,5	19,3	15,4	+	21,4	18,7	19,8	19,9	18,3	18,5	15,3
SD	4,3	3,5	1,4	2,5	3,7	1,7	3,3	5,3	+	3,9	3,3	3,6	1,8	-	4	4,6
n	78	7	8	7	23	7	21	23	+	11	5	11	8	1	12	17

\* vgl. II.2.1 (S. 16) und III.1 (S. 40)

## Danksagung

Für tatkräftige Entlastung im Aquarienkeller und bei der Salzeinwaage danke ich Jessica Schwelm und Norina Schulz, die ebenso wie Arlena Rimkus, Jana Menz, Tobias Eßer und Patrick Pergens beim Muschelsammeln im kalt-schlammigen Fluss mithalf. Bei Nanopartikelbestellungen konnte ich mich stets an Dr. Jörg Diendorf und Kateryna Loza wenden. Jörg Kaminski war selbst bei den abstrusesten handwerklichen Problemen nie um eine Idee verlegen. Dr. Nadine Ruchter, Dr. Milen Nachev, Manoochehr Bahmani und Mark Schumann waren meine zuverlässigen und hilfsbereiten Ansprechpartner rund ums Labor. Dr. Daniel Grabner half darüber hinaus bei der Bewältigung kniffliger statistischer Probleme. Dr. Sonja Zimmermann war die wertvollste Ratgeberin bei allen Fragen zu Analytik, Auswertung und zu guter Letzt dem Verfassen der Dissertation. Die Arbeitsgruppe der Aquatischen Ökologie sorgte dafür, dass ich an der Uni einerseits inspirierende Atmosphäre schnuppern durfte, mich andererseits aber auch menschlich gut aufgehoben fühlte. Ich danke allen Freunden und Bekannten, meinem Mann und meiner Familie für die stetige Unterstützung und Ermunterung und die Geduld, auch meine Tiefphasen zu ertragen. Zum Schluss möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Bernd Sures danken, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation an der Uni Duisburg-Essen durchzuführen, und der nie müde wurde, meine Arbeit in ein positives Licht zu rücken.

Die Finanzierung wurde durch das Evangelische Studienwerk e. V. Villigst und die Universität Duisburg-Essen sichergestellt.

## **Lebenslauf**

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf in der elektronischen Fassung nicht enthalten.

## Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Auswirkungen von Silber-Nanopartikeln auf die Süßwassermollusken *Marisa cornuarietis* und *Dreissena polymorpha*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Henrike Hamer befürworte.

Essen, den 9.12.2014 Prof. Dr. Bernd Sures

Name des wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen	Unterschrift des wissenschaftlichen Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen
---	--

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 9.12.2014

Unterschrift der Doktorandin

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 9.12.2014

Unterschrift der Doktorandin