

# MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Unterschiede im Löslichkeitsverhalten und in der akuten Toxizität von ionischem Silber und Silbernanopartikeln gegenüber der Süßwassergarnele *Neocaridina davidi*: ein Mesokosmenversuch

verfasst von | submitted by

Philipp Torben Hugger BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Master of Science (MSc)

Wien | Vienna, 2025

Studienkennzahl lt. Studienblatt |  
Degree programme code as it appears on the  
student record sheet:

UA 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree pro-  
gramme as it appears on the student record  
sheet:

Masterstudium Chemie

Betreut von | Supervisor:

Mag. Dr. Franz Jirsa Privatdoz.



## **Danksagung**

Zuallererst möchte ich mich sehr herzlich bei Franz Jirsa bedanken, der von Anfang an Vertrauen in mich hatte, der mir diese spannende Forschungsmöglichkeit angeboten hat und mich nicht besser hätte anleiten können. Er hatte auf alle Fragen eine Antwort und ich habe auch weit über meine eigene Arbeit hinaus sehr viel gelernt. Es war mir eine Ehre und große Freude in der Forschungsgruppe mitwirken zu können.

Mein Dank gilt natürlich auch Andreas Gradwohl für all die praktische Hilfe mit den Instrumenten, für die Unterstützung bei den zeitlich perfekt abgestimmten Nanopowder-Versuchen sowie für die vielen Ausflüge zum Aquaristik-Fachhandel, die wir gemeinsam unternommen haben.

In Maxim Helm hatte ich nicht nur einen ausgezeichneten Garnelenfänger für meine Versuche, sondern auch einen großartigen Laborpartner an meiner Seite, mit dem mir nie langweilig geworden ist und durch den ich viel Neues gelernt habe.

Weiters muss ich unbedingt Leon Koppandi nennen, der mir eine große Hilfe und immer zur Stelle war. Hätte er mir nicht im Laufe der vielen Messungen hunderte Probenröhrchen aufgeschraubt und gereicht, wäre meine Masterarbeit vermutlich immer noch nicht fertig.

Auch meine Familie ist mir schon seit Studienbeginn eine enorme Hilfe gewesen. Sie hat mich im Hintergrund immer in allem unterstützt, motiviert und auch für die kleinsten Details meiner Versuche Interesse gezeigt. Ohne sie wäre das alles nicht möglich gewesen.

Damit verbleibt nur noch Sophie Rühle, die es immer schafft, das Beste aus mir herauszuholen. Sie war nach langen Arbeitstagen, frustrierenden Misserfolgen und besonders meinen anfänglichen Unsicherheiten für mich da und hat mich immer wieder aufgebaut.



# Inhaltsverzeichnis

|       |                                                    |    |
|-------|----------------------------------------------------|----|
| 1     | Einleitung .....                                   | 1  |
| 1.1   | Nanopartikel .....                                 | 1  |
| 1.2   | Silber in der Umwelt .....                         | 5  |
| 1.3   | Toxizität von Silberspezies .....                  | 9  |
| 1.4   | Ökotoxikologische Tests .....                      | 14 |
| 2     | Ziel der Arbeit .....                              | 16 |
| 3     | Material und Methoden .....                        | 17 |
| 3.1   | Verwendete Reagenzien .....                        | 17 |
| 3.2   | Künstliches Donauwasser als Versuchsmedium .....   | 18 |
| 3.3   | Versuchsorganismus <i>Neocaridina davidi</i> ..... | 19 |
| 3.4   | Silbernanopartikel .....                           | 20 |
| 3.5   | Charakterisierung der Nanopartikel .....           | 22 |
| 3.6   | Experimenteller Ablauf .....                       | 24 |
| 3.6.1 | Herstellung des künstlichen Donauwassers .....     | 24 |
| 3.6.2 | Versuchsaufbau .....                               | 25 |
| 3.6.3 | Versuchsablauf .....                               | 25 |
| 3.6.4 | Probennahmen .....                                 | 26 |
| 3.7   | Probenvorbereitung .....                           | 27 |
| 3.8   | Analysemethoden .....                              | 28 |
| 3.8.1 | Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie .....     | 28 |
| 3.8.2 | Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie .....         | 29 |
| 3.8.3 | Ionenchromatografie .....                          | 30 |
| 3.8.4 | TOC und DOC .....                                  | 30 |
| 3.8.5 | Zusätzliche Messungen .....                        | 31 |
| 3.9   | Software .....                                     | 32 |
| 4     | Ergebnisse .....                                   | 33 |

|       |                                             |    |
|-------|---------------------------------------------|----|
| 4.1   | Löslichkeit und Verhalten im Wasser.....    | 33 |
| 4.2   | Akute Toxizität über 24 Stunden .....       | 41 |
| 4.3   | Akute Toxizität über 48 und 72 Stunden..... | 43 |
| 4.4   | Silberakkumulation in den Garnelen.....     | 44 |
| 4.4.1 | Gesamte Akkumulation.....                   | 44 |
| 4.4.2 | Biokonzentration .....                      | 48 |
| 5     | Diskussion .....                            | 50 |
| 5.1   | Toxizität und Löslichkeitsverhalten.....    | 50 |
| 5.2   | Silberakkumulation .....                    | 53 |
| 6     | Conclusio.....                              | 55 |
| 7     | Literaturverzeichnis .....                  | 57 |
|       | Appendix.....                               | 69 |
|       | Abstract .....                              | 70 |
|       | Zusammenfassung .....                       | 71 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Nanopartikel

Als Nanopartikel (NP) gelten alle Partikel, die im Größenbereich zwischen 1 nm und 100 nm liegen (The European Commission, 2011; Vert et al., 2012). NP haben besondere chemische und physikalische Eigenschaften, die sie von den Charakteristiken eines Festkörpers mit derselben Zusammensetzung unterscheiden. Sie haben wegen ihrer geringen Größe eine besonders hohe spezifische Oberfläche, die ihre chemische Reaktivität und katalytische Wirkung beeinflusst (I. Lee et al., 2008; Sajanlal et al., 2011). Da in NP 40 – 50 % aller enthaltenen Atome an der Oberfläche des Partikels liegen, kann insgesamt ein viel größerer Anteil der Atome an Reaktionen teilnehmen als bei einem vergleichbaren Feststoff (Farré et al., 2009).

Nanopartikel werden in verschiedene Klassen eingeteilt. Darunter fallen kohlenstoff-basierte NP wie carbon nanotubes, metallische NP, Quantenpunkte, Dendrimere und Komposite (Chávez-Hernández et al., 2024). Aufgrund der Relevanz zur vorliegenden Arbeit wird im Folgenden aber nur auf die Klasse der Metallnanopartikel näher eingegangen.

Die Form von NP variiert stark. Sphärische NP sind am weitesten verbreitet, je nach Einsatzgebiet werden aber auch nicht-sphärische Formen wie Stäbchen (Vigderman et al., 2012), Nadeln (An et al., 2019), Prismen (O'Brien et al., 2014) oder Würfel (Ma et al., 2022) wegen ihrer formspezifischen Eigenschaften wie beispielsweise einer besonderen Lichtstreuung verwendet. Dementsprechend liegt bei der Synthese von NP ein besonderer Fokus auf der Kontrolle von Größe, Monodispersität, Form und Coatings (O'Brien et al., 2014; Rosi & Mirkin, 2005). Die Modifikation der Oberfläche von NP erreicht man, indem bestimmte Coatings auf die Oberfläche der NP aufgebracht werden. Die Adsorption an die Oberfläche gelingt mittels Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen oder kovalenten Bindungen. Durch diese Coatings kann auch die Stabilität der NP verbessert werden. Wegen des speziellen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses bei NP haben Oberflächenladungen sowie Van-der-Waals-Wechselwirkungen eine

größere Bedeutung (Rosi & Mirkin, 2005). Die Agglomeration der NP wird durch elektrostatische Abstoßung der einzelnen NP oder sterische Hinderung reduziert, welche man durch das Anbringen von geladenen oder sperrigen Gruppen erreicht (Cartwright et al., 2020). Das Verhalten in Lösungen wird dadurch beeinflusst. Ist die elektrostatische Abstoßung zwischen den NP größer als die attraktiven Van-der-Waals-Kräfte, liegen die Partikel als sogenannte stabile Lösung vor, was bedeutet, dass die NP annähernd gleichmäßig dispergiert sind. Überwiegt die Anziehung durch die Van-der-Waals-Kräfte, bilden die NP größere Cluster. Man unterscheidet Aggregation, bei der NP durch starke Wechselwirkungen irreversible Verbände eingehen, und Agglomeration, bei der durch schwache Wechselwirkungen reversible Cluster gebildet werden. Diese beiden Ausdrücke werden aber oft gleichbedeutend verwendet (Y. Y. Bai et al., 2023; Zare, 2016). Agglomeration kann die Eigenschaften des Systems deutlich verändern, da die Zahl der einzelnen Partikel sinkt, die Gesamtoberfläche stark abnimmt und der Durchmesser der Cluster um ein Vielfaches größer ist als der eines einzelnen NP (Kätelhön et al., 2017; nanoComposix, 2024).

Coatings können neben der reinen Trennung der NP aber noch auf viele weitere Faktoren Einfluss haben. Funktionelle Gruppen wie Citrat, Carbonat, Aminosäuren oder Ascorbinsäure sorgen für Ladungen auf der Oberfläche von NP (Ameh et al., 2023; Kim et al., 2014; nanoComposix, 2024). Citrat wird häufig bei der Synthese von NP, beispielsweise von Silbernanopartikeln (AgNP), als Reduktionsmittel eingesetzt und unverbrauchte Reste binden dann an die Oberfläche der NP (Cartwright et al., 2020). Polymere wie Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyvinyl Alkohol (PVA), Polystyrol (PS) aber auch Dodecanthiol können NP stabilisieren (Cartwright et al., 2020; nanoComposix, 2024). Für landwirtschaftliche Anwendungen werden natürliche organische Stoffe, oft als natural organic matter (NOM) bezeichnet, als umweltverträgliche Coatings verwendet. Hier spielen unter anderem Huminsäuren eine wichtige Rolle (Cartwright et al., 2020). Chitosan, PEG oder zwitterionische Siloxane führen zu verbesserten physikochemischen Eigenschaften, einer kontrollierten Wirkstoffausschüttung und verbesserten Bioverfügbarkeit in biomedizinischen Anwendungen (Cartwright et al., 2020; Estephan et al., 2011; Frank et al., 2020).

Die breitere Anwendung von NP hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Sie finden Verwendung in Kunststoffen, Solarzellen, Katalysatoren, Textilien, Farben und Lacken. Weitere wichtige Anwendungsgebiete sind die Halbleitertechnologie, die Datenspeicherung, Elektronik, Pharmazie und Kosmetik (Farré et al., 2009; Walters et al., 2014). Schätzungen zur Gesamtproduktionsmenge von Nanopartikeln in der Literatur variieren stark. Keller et al. (2013) berechneten eine gesamte Produktionsmenge an Nanopartikeln von etwa 300.000 Tonnen für das Jahr 2010. Hiervon entfallen etwa 450 Tonnen auf AgNP, was einem Anteil von nur 0,15 % entspricht. Die Produktion von SiO<sub>2</sub>- und TiO<sub>2</sub>-NP in diesem Jahr war beispielsweise um etwa das 200-fache größer als die von AgNP. Pulit-Prociak & Banach (2016) schätzten die Gesamtproduktion an Nanopartikeln für das Jahr 2014 auf 300.000 – 1,6 Millionen Tonnen und die hergestellte Menge an Silbernanopartikel auf 135 – 420 Tonnen mit einer Prognose von 400 – 800 Tonnen für das Jahr 2025. Die meisten Schätzungen in der Literatur geben Werte für Silber von bis zu 500 Tonnen/Jahr an (Giese et al., 2018). Im Jahr 2021 lag die geschätzte Gesamtproduktion von Nanopartikeln schon deutlich höher bei 11 Millionen Tonnen (EUON, 2021).

AgNP gehören mit etwa 400 Tonnen/Jahr zu den „low volume productions“. Trotz ihres geringeren Anteils an der Gesamtproduktion machen Silbernanopartikel mit 13,5 % Marktanteil in 2020 einen großen Teil der kommerziell erhältlichen NP-basierten Konsumgüter aus (EUON, 2021). Konsumgüter („consumer products“) sind in diesem Fall Produkte, die keine industrielle Anwendung finden, sondern direkt von privaten Endverbrauchern genutzt werden.

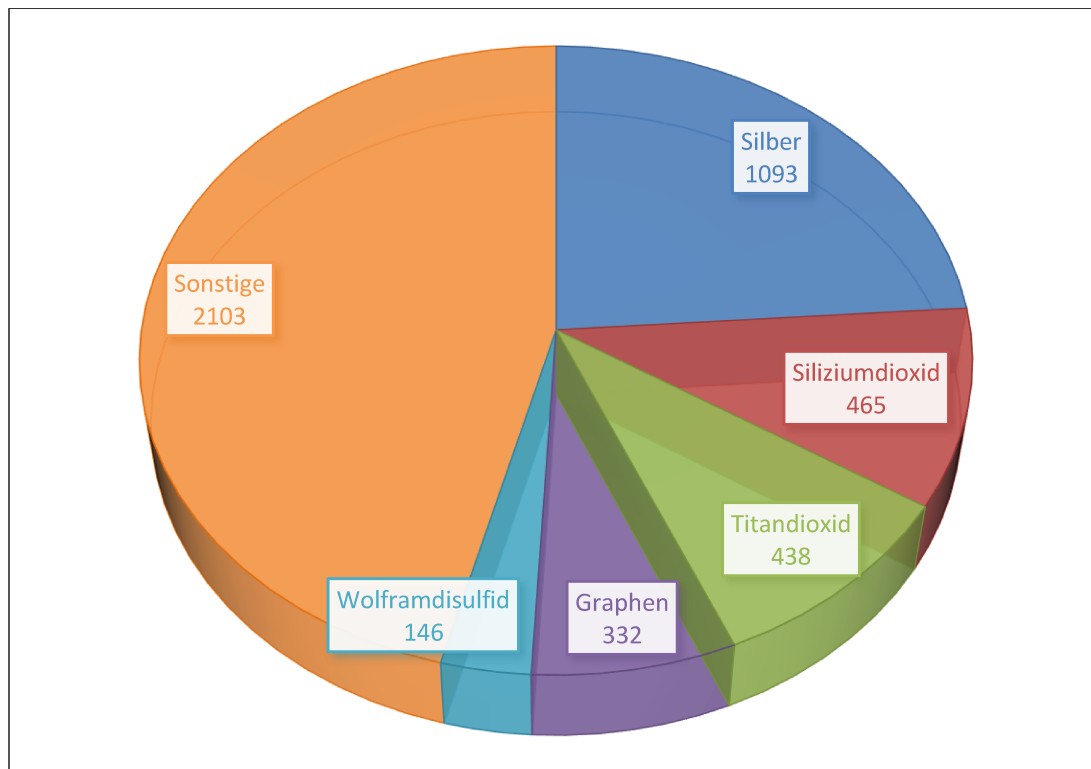


Abbildung 1: Weltweite absolute Zahlen von nanobasierten Konsumgütern nach dem Material (nach Nanotechnology Products Database vom 2.9.2024)

Abbildung 1 zeigt alle Konsumgüter, die Nanopartikel enthalten und aktuell kommerziell erhältlich sind, nach der Art von NP gestaffelt (nach Nanotechnology Products Database vom 2.9.2024). Von den 4577 Produkten machen AgNP mit 1093 Waren den größten Teil aus, gefolgt von Siliziumdioxid (465 Produkte) und Titandioxid (438 Produkte).

AgNP werden besonders aufgrund ihrer antibakteriellen und antimykotischen Eigenschaften in vielen Bereichen eingesetzt (Sharma et al., 2014). Deshalb werden im Medizinsektor unter anderem Wundverbände, Implantate, chirurgische Instrumente aber auch Wasserfilter und Wandfarben genutzt, die AgNP enthalten. Aufgrund dieser speziellen Eigenschaften werden sie auch in Alltagsprodukten wie beispielsweise Mobiltelefonen, Zahnbürsten, Kosmetikprodukten und auch Lebensmittelverpackungen eingesetzt (Sharma et al., 2014; Yu et al., 2013). Ein weiteres großes Verwendungsgebiet machen Sportbekleidung, Unterwäsche und Socken aus. Hier werden AgNP in den Stoff eingebracht, um mikrobielles Wachstum zu mindern und so unangenehme Gerüche oder Flecken zu vermeiden (Allehyani, 2022; Yu et al., 2013). Zusätzlich hat Silber eine hohe thermische und elektrische Leitfähigkeit und

einen niedrigen Kontaktwiderstand. Deshalb werden AgNP häufig in Elektronik verbaut, beispielsweise für das Bedrucken von Platinen (Yu et al., 2013). Wegen ihrer besonderen optischen Eigenschaften wird daran gearbeitet, AgNP in Solarzellen zu integrieren um deren Effizienz zu verbessern (Bastianini et al., 2024; Shamaeizadeh et al., 2024).

## **1.2 Silber in der Umwelt**

Silber kommt in der Natur gediegen und in Mineralen vor allem sulfidisch gebunden vor und kann durch die Verwitterung von Gestein oder den Bergbau in die Umwelt freigesetzt werden. Besonders unter sauren Bedingungen kann Silber in oberflächen-nahen Schichten sehr mobil sein. Da die meisten Silberminerale aber eine hohe Stabilität aufweisen, ist der Eintrag in die Umwelt durch diese pH-abhängige Mobilität von Silberionen aber eher gering. Anthropogene Einträge stammen von der Silberaufbereitung, der Stahlraffinerie, der Verbrennung fossiler Brennstoffe, der Müllverbrennung und von Mülldeponien, welche beispielsweise in den USA den Großteil aller Einträge ausmachen. Bereits im Jahr 1998 wurden jährlich schätzungsweise 2500 Tonnen Silber in die Umwelt abgegeben, davon 80 Tonnen direkt in Oberflächengewässer (Padhye et al., 2023). Der überwiegende Teil der Umweltbelastung durch Silber stammt von Feststoffen, die aufgrund der geringen Löslichkeit von elementarem Silber nur eine sehr geringe Gefahr für aquatische Systeme darstellen. Vor der weit verbreiteten Verwendung von AgNP (siehe Kapitel 1.1) war die Fotoindustrie die Hauptquelle für Silber in Oberflächengewässern. Der Übergang zu digitaler Fotografie hat zeitweise sogar zu einer allgemeinen Abnahme der Silbergehalte in der Natur geführt (Fabrega et al., 2011; Wood, 2011).

Silber kommt in der Natur hauptsächlich in sulfidischen Gesteinsschichten als Sulfide und Sulfosalze vor. Das eindeutig häufigste Silbermineral ist dabei Acanthit oder Silberglanz ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ). Ein weiterer, eher seltener Vertreter dieser Gruppe ist Aguilarit ( $\text{Ag}_4\text{SeS}$ ). Silber liegt auch in Form von Halogeniden wie Bromargyrit ( $\text{AgBr}$ ) oder dem weitaus häufigeren Chlorargyrit ( $\text{AgCl}$ ) vor. Man findet es in Verbindung mit anderen Metallen wie Eisen, Kupfer, Arsen, Tellur,

Antimon und Selen mit wechselnder Häufigkeit. Bekannte Mineralien sind unter anderem Pyrargyrit oder Dunkles Rotgültigerz ( $\text{Ag}_3\text{SbS}_3$ ), Proustit oder Lichtes Rotgültigerz ( $\text{Ag}_3\text{AsS}_3$ ), Polybasit ( $(\text{Ag,Cu})_{16}\text{Sb}_2\text{S}_{11}$ ) und Argentojarosit ( $\text{AgFe}^{3+}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ). Auch Bornit ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ) und Fahlerz können als Mischkristalle Silberionen enthalten. Dennoch kommt Silber auch durchaus in gediegener Form vor, meistens in Anwesenheit von elementarem Gold (Palyanova, 2020; Shalaby et al., 2004).

Die hohe Stabilität von Silbersulfid erkennt man an der Gleichgewichtskonstante, die stark auf Seiten der festen, ungelösten Form liegt. Der  $\log K$  für  $\text{Ag}_2\text{S}$  liegt bei 23,7 (Dyrssen, 1988) und das Löslichkeitsprodukt bei  $10^{-52}$  (Shakhashiri et al., 1980), was einen natürlichen Silbereintrag in Gewässer vernachlässigbar klein macht. Im Gegensatz zu vielen anderen Metallen zeigt sich bei der Spezierung von Silber in aquatischen Systemen nur eine geringe pH-Abhängigkeit. Allerdings hat  $\text{Ag}^+$  eine sehr hohe Affinität für Anionen und andere im Wasser vorliegende Stoffe. In Anwesenheit von Sulfiden bildet ionisches Silber bevorzugt die Sulfidkomplexe  $\text{AgHS}$  und  $\text{AgHS}_2^-$  mit einem  $\log K$  von 13,5 (Wood, 2011), Komplexe der Form  $\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_n^{1-2n}$  mit vorhandenem Thiosulfat ( $\log K$  zwischen 8,8 und 14,2) (Hogstrand & Wood, 1998) gefolgt von Komplexen mit gelöstem organischem Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon, DOC) ( $\log K = 9,0$ ) (Wood, 2011). DOC beinhaltet in diesem Zusammenhang Huminsäuren, Fulvosäuren, Fettsäuren, Aminosäuren und Urea. Weniger häufig kommt es zur Bildung von gelöstem  $\text{AgCl}$  (aq) und den Chloridkomplexen  $\text{AgCl}_2^-$ ,  $\text{AgCl}_3^{2-}$  und selten  $\text{AgCl}_4^{3-}$  mit  $\log K$  Werten zwischen 3,3 und 5,5, in Abhängigkeit der Salinität des Gewässers. Es besteht eine starke Abhängigkeit mit der Chloridkonzentration, deswegen kommen im Süßwasser eher  $\text{AgCl}$  (aq) und  $\text{AgCl}_2^-$  vor, während im Salzwasser  $\text{AgCl}_3^{2-}$  dominiert. Das Vorkommen von  $\text{AgCl}_4^{3-}$  unter realen Bedingungen ist umstritten, da dafür eine sehr hohe Salinität benötigt werden würde (Wood, 2011).

Unter Umständen kann es auch zur Ausfällung von festem Chlorargyrit ( $\text{AgCl}$ ) kommen, doch in natürlichen Systemen ist normalerweise die Konzentration an gelöstem Silber so gering, dass das Löslichkeitsprodukt dieses Salzes nicht überschritten wird. Oft sind dazu Silberkonzentrationen von mehr als 500  $\mu\text{g/L}$  nötig. Die Präzipitation von  $\text{Ag}_2\text{S}$  ist nicht bekannt. Zusätzlich zu Anionen und DOC adsorbiert gelöstes Silber sehr stark an Partikel im Wasser. Der

Verteilungskoeffizient zwischen Partikel und Wassersäule befindet sich für  $\text{Ag}^+$  im Bereich um  $10^5$ . Unter realen Bedingungen liegt somit ein Großteil des ionischen Silbers in Sulfid- und Thiosulfatkomplexen und komplexiert von DOC vor, während geringere Mengen an Chloridkomplexen vorhanden sind. Messungen legen nahe, dass deutlich weniger als 40 % der gelösten Silberionen als freie Ionen vorliegen. Aufgrund fehlender Anionen, Partikel und DOC liegt ionisches Silber in destilliertem Wasser dadurch beinahe vollständig in gelöster Form vor (Dyrssen, 1988; Hogstrand & Wood, 1998; Wood, 2011).

Ein weiterer möglicher Schritt in der natürlichen Transformation von gelöstem Silber in Gewässern ist die Reduktion von  $\text{Ag}^+$  zu elementarem Silber. Diese Photoreduktion läuft als photobiogeochemische Reaktion ab. Diese Reduktion durch NOM wurde auch ohne direkte Sonnenlichteinstrahlung beschrieben, aber die Reaktionsgeschwindigkeit war in diesem Fall sehr gering. Bei einer Bestrahlung ( $\lambda > 300 \text{ nm}$ ) des Mediums, die realen Bedingungen entspricht, kommt es bereits innerhalb der ersten Stunde zur Reduktion von ionischem Silber und zur Formation natürlicher Silbernanopartikel (Hou et al., 2013).

Die gelösten Silberionen werden von NOM komplexiert und bilden photoaktive Komplexe. Unter Sonneneinstrahlung kommt es zur Reduktion und Ausbildung von AgNP, deren Form sich mit anhaltender Versuchsdauer geändert hat. Der vorgeschlagene Mechanismus der Reaktion ist ein Ligand-Metall-Charge-Transfer (LMCT) von den organischen Liganden zum  $\text{Ag}^+$ -Zentralatom. Die zuerst angenommene Beteiligung von Superoxiden ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) an dieser Reaktion stellte sich hingegen als unwesentlich heraus. In Anwesenheit anderer Kationen wie  $\text{Na}^+$  läuft die Reaktion deutlich langsamer ab, da diese Kationen mit  $\text{Ag}^+$  um die Bindungsstellen der Liganden konkurrieren. Zusätzlich ist die Reduktion der Silberionen stark pH abhängig und die Reaktionsgeschwindigkeit steigt mit steigendem pH (getesteter pH-Bereich war 4 – 9). Ein großer Sprung ist im Bereich zwischen pH 6,4 und 7 zu sehen. Nach einer Versuchsdauer von 20 Minuten haben sich bei pH 8 mehr als doppelt so viele AgNP gebildet wie bei pH 6,4. Bei saurem pH-Wert lagen die verwendeten Huminsäuren teilweise protoniert vor und die elektrostatische Anziehung zu den Silberionen war schwächer. Insgesamt zeigen die Ergebnisse bisheriger Versuche eine

Umwandlung von 4 – 32 % der eingesetzten Silberionen (Hou et al., 2013; Yin et al., 2012).

Eine ähnliche Reduktion von  $\text{Ag}^+$  zu AgNP mit sichtbarem und UV-Licht ist ebenfalls durch extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) möglich. Dabei handelt es sich um langkettige Biomoleküle, die von Mikroorganismen an ihre Umgebung abgegeben werden und in aquatischen Systemen bis zu 40 % des gesamten vorhandenen Kohlenstoffes ausmachen können. Der Reaktionsmechanismus ist dabei derselbe wie zuvor. Aufgrund der Protonierung und Deprotonierung von in EPS enthaltenen Carboxy-, Hydroxy- und Phenolgruppen ist der Umsatz ebenfalls bei basischerem pH höher und schneller (Zhang et al., 2016).

Hashimoto et al. (2017) haben die Beständigkeit und Transformation von Silbernitrat und AgNP im Boden untersucht. Nach 30 Tagen unter aeroben Bedingungen wurden 88 % der eingesetzten Nanopartikel unverändert gefunden, während das  $\text{AgNO}_3$  vollständig umgewandelt wurde und Kolloide mit Huminsäuren und Schichtsilikaten gebildet hat. Unter anaeroben Bodenbedingungen wurden 83 % der AgNP zu  $\text{Ag}_2\text{S}$  umgesetzt, allerdings nur die Hälfte des Silbernitrats zu AgCl,  $\text{Ag}_2\text{S}$  und elementarem Silber. Wie auch in realen Umweltproben wurden nur geringe Mengen an Silberoxiden, -carbonaten und -sulfaten gefunden (Hashimoto et al., 2017).

In Gewässern und im Sediment durchlaufen AgNP langfristig ebenfalls eine Transformation, bei der hauptsächlich Sulfid oder Chlorid gebunden wird und sich Schichten ausbilden. Bei einer Untersuchung des Sees Tai Hu in China wurde dabei zwischen AgNP, AgCl NP und  $\text{Ag}_2\text{S}$  NP unterschieden. Im Wasser betrug der Anteil an unveränderten AgNP 7,8 – 17,1 %, der für chloridhaltige AgNP 12,6 – 25,1 % und der für sulfidhaltige 57,1 – 70,4 %. Die Aufteilung der Silbernanopartikel im Sediment unterschied sich nur geringfügig (Q. Bai et al., 2025). Die Auswirkungen der Komplexierung durch NOM auf die Stabilität der AgNP sind vielschichtig. Einerseits binden Huminsäuren und Fulvosäuren an Stellen der NP, die Silberionen freisetzen, und blockieren die Ionenabgabe. Andererseits schwächen die funktionellen Gruppen, welche die AgNP komplexieren, die Ag-Ag Bindungen und verbessern so die Bedingungen für die Diffusion der Silberionen (Yang et al., 2024).

AgNP fallen in die Gruppe der Nanomaterialien, die zu den „emerging pollutants“ gehören (Chávez-Hernández et al., 2024). Keller et al. (2013) schätzen einen jährlichen Eintrag von über 200 Tonnen Silber durch AgNP in die Umwelt, davon 63 Tonnen in Gewässer. Ein deutlich größerer Teil der Nanopartikel im Abwasser würde im Klärschlamm enden, kann aber unter Umständen bei Verwendung als Düngemittel für Felder wieder in den Boden eingetragen werden. Bei der Müllverbrennung oder Verbrennung fossiler Brennstoffe können AgNP in die Luft geraten und über weite Strecken transportiert werden, bevor sie mit dem Regen wieder auf den Boden oder in Gewässer zurückkommen (Chávez-Hernández et al., 2024).

Auch in privaten Haushalten kann es durch Waschen von Bekleidung oder Lebensmittelverpackungen oder Verwendung von Zahnbürsten zum Eintrag von AgNP ins Abwasser kommen (McGillicuddy et al., 2017). In Modellen werden die Konzentrationen von AgNP in Gewässern auf ng/L und mg/kg für Böden und Sedimente geschätzt (McGillicuddy et al., 2017).

### **1.3 Toxizität von Silberspezies**

Silber weist nur eine sehr geringe Toxizität gegenüber Säugetieren auf. Basierend auf einem bekannten Todesfall kann eine letale Dosis von 64 mg Silber/kg Körpergewicht für Menschen angegeben werden. Es kommt auch nur zu einer schwachen Bioakkumulation in Mäusen und Ratten. Silber steht im Verdacht karzinogen zu sein und Genmutationen auszulösen, allerdings gibt es dazu widersprüchliche Untersuchungen (Hadrup et al., 2018; Ratte, 1999). Auch für AgNP wird angenommen, dass sie Apoptose induzieren und zu DNA-Schäden führen können (Ong & Nyam, 2022). Bei Menschen kann es nach längerer oraler oder dermaler Exposition von Silber- oder AgNP-Lösungen zu Argyrie kommen, bei der es zu einer dauerhaften bläulich bis grauen Verfärbung der Haut durch Ablagerungen von Silber kommt (Hadrup et al., 2018; Ratte, 1999).

Silber gilt als das toxischste aller Metalle in Bezug auf aquatische Lebewesen. Die Toxizität von Silber in aquatischen Systemen hängt von der Konzentration

an gelösten und bioverfügbaren  $\text{Ag}^+$ -Ionen ab. Entscheidend ist hier einerseits die Löslichkeit der Verbindung in Wasser, aber anschließend auch das Vorliegen von freien Ionen (Ratte, 1999). Das hängt von verschiedenen Parametern ab, die erheblichen Einfluss auf die Toxizität haben. Silber liegt in natürlichen Systemen zu einem überwiegenden Teil an Partikel oder gelöstes organisches Material gebunden oder in Form von Komplexen vor und ist somit nicht bioverfügbar. Wichtige Liganden sind hierbei Thiosulfat, Sulfid und besonders Chlorid. Gleichzeitig spielen auch die Konzentrationen von anderen Kationen eine Rolle.  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  konkurrieren mit  $\text{Ag}^+$  um die Bindestellen in Kiemen, wo es zur Aufnahme kommt und in den aktiven Zentren von Biomolekülen. Des Weiteren senken  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  die Permeabilität der Kiemen und in Folge kommt es zu einer reduzierten Aufnahme der Silberionen. Insgesamt sinkt die Toxizität mit der Ionenstärke des Wassers, weswegen sie in Meerwasser aufgrund des höheren Salzgehaltes auch bis zu drei Größenordnungen geringer als in Süßwasser ist (Wood et al., 1999).

Für Toxizitätstests wird Silbernitrat verwendet, das die Silberverbindung mit der höchsten Toxizität darstellt. Es hat eine hohe Löslichkeit, bildet aber im Gegensatz zu Silberthiosulfat und Silberchlorid keine Komplexe. Das ist ein wichtiger Faktor, denn durch Komplexierung von Anionen wie Thiosulfat und Chlorid wird die Bioverfügbarkeit von Silberionen stark gesenkt (Wood et al., 1999).

Bei Süßwasserorganismen kommt es in den Kiemen zu einer nicht-kompetitiven Inhibition der Natrium-Kalium-ATPase durch Silberionen und die aktive Aufnahme von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  wird gestört. Die dadurch entstehende Störung des Ionenhaushalts im Blutplasma ist die primäre Wirkweise von Silber bei Süßwasserfischen (Wood et al., 1999). Zusätzlich löste eine Exposition zu  $\text{AgNO}_3$  bei der Amerikanischen Dickkopfelritze *Pimephales promelas* oxidativen Stress und gesteigerte Genexpression in zellulären Stressreaktionswegen aus (Garcia-Reyero et al., 2014). Bei Salzwasserfischen führte Silber ebenfalls zu einem gestörten Ionenhaushalt. In diesem Fall findet die Aufnahme allerdings nicht in den Kiemen, sondern im Darm statt und es kommt zu erhöhten  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$ -Leveln im Blutplasma, was schlussendlich zum Tod führen kann (Hogstrand & Wood, 1998).

Im Allgemeinen zeigen Wirbellose eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber Silber als Wirbeltiere wie Fische (Ratte, 1999). Für benthische Lebensformen wie Garnelen spielt womöglich auch die unmittelbare Nähe zum Gewässergrund eine Rolle bezüglich ihrer Silberexposition. Gelöstes Silber in der Wassersäule erreicht nur geringe Konzentrationen, da es zur Sedimentation kommt und Silber meistens in Form von  $\text{Ag}_2\text{S}$  vorliegt (Hirsch, 1998). Ratte (1999) nennt als mögliche Aufnahmewege für benthische Lebewesen den direkten Körperkontakt mit kontaminierten Sedimentpartikeln, die Aufnahme aus dem Wasser in den Sedimentporen sowie die Aufnahme und Verdauung von Sedimentpartikeln. Es wird angenommen, dass der letztgenannte Einnahmeweg den größten Anteil trägt.

Tabelle 1 LC<sub>50</sub>-Werte für Ag<sup>+</sup> und AgNP aus der Literatur. \*Salzwasser als Versuchsmedium verwendet

| Organismus                      | Substanz                                      | LC <sub>50</sub> (µg/L) |           |           | Quelle                     |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|-----------|-----------|----------------------------|
|                                 |                                               | 24h                     | 48h       | 72h       |                            |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i>       | Ag <sup>+</sup>                               |                         | 0,7       |           | (Kennedy et al., 2012)     |
| <i>Crangonyx pseudogracilis</i> | Ag <sup>+</sup>                               |                         | 6         |           | (Martin & Holdich, 1986)   |
| <i>Daphnia carinata</i>         | Ag <sup>+</sup>                               | 0,69                    | 0,62      |           | (Lekamge et al., 2018)     |
| <i>Daphnia carinata</i>         | Ag <sup>+</sup>                               |                         | 1,21      |           | (Lekamge, 2019)            |
| <i>Daphnia galeata</i>          | Ag <sup>+</sup>                               |                         | 2,13      |           | (Völker et al., 2013)      |
| <i>Daphnia magna</i>            | Ag <sup>+</sup>                               |                         | 1,10      |           | (Völker et al., 2013)      |
| <i>Daphnia magna</i>            | Ag <sup>+</sup>                               | 5,4                     | 2,6       |           | (Ulm et al., 2015)         |
| <i>Daphnia magna</i>            | Ag <sup>+</sup>                               | 1,36                    | 1,05      |           | (Ribeiro et al., 2014)     |
| <i>Daphnia magna</i>            | Ag <sup>+</sup>                               |                         | 2,2       |           | (Blinova et al., 2013)     |
| <i>Daphnia magna</i>            | Ag <sup>+</sup>                               | 0,81                    |           |           | (Poynton et al., 2012)     |
| <i>Daphnia pulex</i>            | Ag <sup>+</sup>                               |                         | 8         |           | (Griffitt et al., 2008)    |
| <i>Gammarus fossarum</i>        | Ag <sup>+</sup>                               | 1,37-3,34               | 1,26-2,73 | 1,09-2,52 | (Funck et al., 2013)       |
| <i>Gammarus pseudolimnaeus</i>  | Ag <sup>+</sup>                               | 4,7                     | 4,7       | 4,5       | (Lima et al., 1982)        |
| <i>Gammarus pulex</i>           | Ag <sup>+</sup>                               |                         | 2,1       |           | (Bury et al., 2002)        |
| <i>Paratya australiensis</i>    | Ag <sup>+</sup>                               | 3,6                     | 0,1       |           | (Lekamge et al., 2018)     |
| <i>Thamnocephalus platyurus</i> | Ag <sup>+</sup>                               | 5,7                     |           |           | (Blinova et al., 2013)     |
| <i>Artemia salina</i>           | AgNP (2-18 nm, PVA coated)                    |                         | 55        |           | (Becaro et al., 2015)      |
| <i>Daphnia similis</i>          | AgNP (2-18 nm, PVA coated)                    | 0,342                   | 0,262     |           | (Becaro et al., 2015)      |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (3-8 nm, paraffin coated)                | 11,41                   | 11,02     |           | (Ribeiro et al., 2014)     |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (6 nm)                                   |                         | 2         |           | (Asghari et al., 2012)     |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (7 nm)                                   |                         | 4         |           | (Asghari et al., 2012)     |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (8,4 nm, PVP coated)                     |                         | 54,0      |           | (Blinova et al., 2013)     |
| <i>Thamnocephalus platyurus</i> | AgNP (8,4 nm, PVP coated)                     | 68,8                    |           |           | (Blinova et al., 2013)     |
| <i>Artemia salina</i>           | AgNP (1 nm-10 nm)*                            | 9960                    | 3790      |           | (Gambardella et al., 2015) |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (10 nm)                                  |                         | 4,31      |           | (Hoheisel et al., 2012)    |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (10 nm)                                  |                         | 10        |           | (Ivask et al., 2014)       |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (12,5 nm, protein coated "Collargol")    |                         | 49,4      |           | (Blinova et al., 2013)     |
| <i>Thamnocephalus platyurus</i> | AgNP (12,5 nm, protein coated "Collargol")    | 256                     |           |           | (Blinova et al., 2013)     |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (18 nm)                                  |                         | 187       |           | (Asghari et al., 2012)     |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (18 nm, citrate coated)                  | 13,8                    | 12,4      |           | (Ulm et al., 2015)         |
| <i>Daphnia galeata</i>          | AgNP (< 20 nm, PVP coated)                    |                         | 13,9      |           | (Völker et al., 2013)      |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (< 20 nm, PVP coated)                    |                         | 121       |           | (Völker et al., 2013)      |
| <i>Daphnia pulex</i>            | AgNP (< 20 nm, PVP coated)                    |                         | 8,95      |           | (Völker et al., 2013)      |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i>       | AgNP (20 nm, citrate capped "NC20 ")          |                         | 4,8       |           | (Kennedy et al., 2012)     |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (20 nm)                                  |                         | 8,00      |           | (Hoheisel et al., 2012)    |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (20 nm)                                  |                         | 34        |           | (Ivask et al., 2014)       |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i>       | AgNP (20-30 nm)                               |                         | 67        |           | (Griffitt et al., 2008)    |
| <i>Daphnia pulex</i>            | AgNP (20-30 nm)                               |                         | 40        |           | (Griffitt et al., 2008)    |
| <i>Artemia franciscana</i>      | AgNP (15 nm-30 nm)*                           |                         | 6685      |           | (Zawadzka et al., 2021)    |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (15 nm-30 nm)                            | 29,7                    | 29,7      |           | (Zawadzka et al., 2021)    |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (30 nm)                                  |                         | 18,43     |           | (Hoheisel et al., 2012)    |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (35 nm, PVP coated)                      | 10,48                   |           |           | (Poynton et al., 2012)     |
| <i>Daphnia carinata</i>         | AgNP (36 nm, Epigallocatechin gallate coated) |                         | 19,37     |           | (Lekamge, 2019)            |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (40 nm)                                  |                         | 141       |           | (Ivask et al., 2014)       |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (40 nm, citrate coated)                  | 4,30                    |           |           | (Poynton et al., 2012)     |
| <i>Daphnia carinata</i>         | AgNP (41,2 nm, curcumin coated)               |                         | 21,37     |           | (Lekamge, 2019)            |
| <i>Daphnia carinata</i>         | AgNP (42,7 nm, tyrosine coated)               |                         | 49,74     |           | (Lekamge, 2019)            |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (50 nm)                                  |                         | 24,48     |           | (Hoheisel et al., 2012)    |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (60 nm)                                  |                         | 168       |           | (Ivask et al., 2014)       |
| <i>Daphnia magna</i>            | AgNP (80 nm)                                  |                         | 218       |           | (Ivask et al., 2014)       |
| <i>Daphnia carinata</i>         | AgNP (86,8 nm, tyrosine coated)               | 62,04                   | 35,48     |           | (Lekamge et al., 2018)     |
| <i>Paratya australiensis</i>    | AgNP (86,8 nm, tyrosine coated)               | 62,24                   | 55,34     |           | (Lekamge et al., 2018)     |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i>       | AgNP (100 nm, citrate capped "NC100 ")        |                         | 26,7      |           | (Kennedy et al., 2012)     |

Eine beispielhafte Auflistung der LC<sub>50</sub>-Werte für verschiedene Krebstiere ist in Tabelle 1 gezeigt. Die Werte für Ag<sup>+</sup> (zugegeben als AgNO<sub>3</sub>) liegen alle in einem ähnlichen Konzentrationsbereich von etwa 1 - 10 µg/L.

Die Toxizität von AgNP hängt stark von ihrer Größe und ihrem Coating ab und man kann nicht allgemein von „Silbernanopartikeln“ sprechen. Kleinere NP zeigen im Normalfall eine höhere Toxizität als größere NP, was mit ihrer größeren Gesamtoberfläche zusammenhängt (Hoheisel et al., 2012). In Tabelle 1 sind die LC<sub>50</sub>-Werte für verschiedene AgNP, ohne oder mit unterschiedlichen Coatings, angegeben. Sie sind höher als die Werte von ionischem Silber und liegen meistens im Bereich von 10 - 100 µg/L.

Zusätzlich wird angenommen, dass Filtrierer wie Garnelen oder Daphnien stärker von Nanopartikelbelastungen betroffen sind. Auf der Suche nach Nahrung filtern sie große Mengen Wasser und eine Exposition oder Aufnahme von Nanopartikeln ist wahrscheinlicher (Griffitt et al., 2008).

Der Wirkmechanismus von Silbernanopartikeln ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die Toxizität sich hauptsächlich durch die Abgabe von Ag<sup>+</sup>-Ionen in das Wasser begründet (Ratte, 1999). Zhao & Wang (2011) verwendeten Cystein, um Ag<sup>+</sup> zu komplexieren, das von AgNP freigesetzt wird. Auf diese Weise zeigten die AgNP keine akute Toxizität mehr gegenüber *Daphnia magna*. Die Wirkung würde weiter dadurch verstärkt werden, wenn Organismen ganze Nanopartikel aufnahmen und die Freisetzung der Ionen dann direkt im Körper geschähe. Allerdings zeigten Poynton et al. (2012), dass eine Exposition von *D. magna* zu NP andere Auswirkungen hat als die reine Exposition zu Ag<sup>+</sup>. Die Silbernanopartikel störten den Zellzyklus und führten bei hohen Konzentrationen zur Apoptose. Sie steigern die Proteolyse und bewirken eine Hochregulierung von zellulären Signalprozessen.

Auch Zhao & Wang (2011) nennen die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Membranschäden, Proteindenaturierung und DNA-Schäden durch freie Radikale als direkte Auswirkungen einer Exposition mit AgNP unabhängig von der Freisetzung von Silberionen.

## 1.4 Ökotoxikologische Tests

Die Bestimmung der Toxizität verschiedener Substanzen ist nicht nur für die Humanmedizin, sondern auch in der Umweltchemie von großer Bedeutung. Da Chemikalien während ihres gesamten Lebenszyklus von der Produktion bis zur Entsorgung ungeplant in die Umwelt gelangen können oder aufgrund ihres Verwendungszwecks absichtlich in diese eingebracht werden sollen, müssen die Auswirkungen einer solchen Exposition bekannt sein. Potenzielle kurz- und langfristige toxische Wirkungen natürlicher und synthetischer Stoffe und ihre Wirkmechanismen auf Tiere, Pflanzen und ganze Systeme sind Untersuchungsgegenstand der Ökotoxikologie. Dafür können die Untersuchungen je nach untersuchter Substanz und Art der Umweltbelastung variiert werden und beispielsweise der Versuchsorganismus, das Versuchsmedium und Art und Dauer der Exposition bestimmt werden (Schuijt et al., 2021; Valavanidis & Vlachogianni, 2015). Um allgemein akzeptierte und besser vergleichbare Ergebnisse zu erreichen stehen seit vielen Jahren eine Reihe verschiedener standardisierter Testmethoden wie die der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD, 1979, 2024), der EPA (United States Environmental Protection Agency, 1994), der Europäischen Chemikalienagentur sowie eine große Bandbreite an ISO-Normen zur Verfügung, die immer wieder ergänzt und aktualisiert werden.

In dieser Arbeit wird die akute Toxizität in aquatischen Systemen *in vivo* untersucht. Der gängigste Wert, um die Toxizität zu beschreiben ist die Effektkonzentration für 50 % ( $EC_{50}$ ), jene Konzentration bei welcher der beobachtete Effekt bei der Hälfte der Versuchsorganismen auftritt. Wie bei dieser Arbeit kann dieser Wert auch durch die letale Konzentration für 50 % ( $LC_{50}$ ) ersetzt werden, wenn der gewählte Endpunkt der Tod ist (EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION, 2002).

Besonders für Toxizitätstests sind Krebstiere (Crustacea) beliebte Versuchsorganismen, da sie empfindlich auf Schadstoffe und Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren und schon bei kurzer Versuchsdauer verlässliche Ergebnisse liefern (J. W. Lee et al., 2024; Santos et al., 2014). Mykles & Hui (2015) empfehlen *Neocaridina denticulata* und *N. davidi* aufgrund ihrer kurzen

Lebensdauer, geeigneten Größe, einfachen Haltung und hohen Verfügbarkeit. Sie führen auch den Vorteil des transparenten Exoskeletts an, was für eine einfache und nichtinvasive visuelle Überwachung des Versuchs von Nutzen sein kann. Andere verbreitete Beispielorganismen für aquatische Systeme sind der große Wasserfloh *Daphnia magna*, der Mexikanische Flohkrebs *Hyalomma azteca*, der Zebraquärbling *Danio rerio*, die Amerikanische Dickkopfelritze *Pimephales promelas* und verschiedene Süßwasseralgenarten (Schuijt et al., 2021).

## 2 Ziel der Arbeit

Da Silbernanopartikel in den letzten Jahren in immer mehr Produkten Verbreitung finden und so auch vermehrt in die Umwelt gelangen, ist die Forschung an ihrer Toxizität ein sehr relevantes Thema. Für diese Arbeit soll die akute Toxizität über 24 Stunden sowie die erweiterte akute Toxizität über 48 und 72 Stunden für zwei verschiedene AgNP, die sich in Größe und Art des Coatings unterscheiden, sowie für ionisches Silber in Form von  $\text{AgNO}_3$  bestimmt werden. Als Versuchstier soll die Rückenstrichgarnele *Neocaridina davidi* dienen, die auf der ganzen Welt im Süßwasser vorkommt. Um für möglichst naturnahe Bedingungen zu sorgen, soll künstliches Donauwasser als Medium verwendet werden.

Die Silberakkumulation und die Biokonzentration in den Garnelen sollen ebenfalls betrachtet und verglichen werden.

Zusätzlich soll das zeitliche Verhalten und die Löslichkeit der AgNP über den gesamten Versuchsablauf im Medium beobachtet werden, um damit mögliche Rückschlüsse auf Unterschiede in der Toxizität zu treffen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Reagenzien

Zur Herstellung des künstlichen Donauwassers (siehe Kapitel 3.2 und 3.6.1) wurde deionisiertes Wasser eingesetzt. Für alle weiteren Schritte sowie die Reinigung der Mesokosmen wurde Milli-Q Wasser verwendet.

Die Salze Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , ACS Reagenz  $\geq 98 \%$ ), Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , zur Analyse 99-103 %), Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ , zur Analyse 99,7-100,3 %), Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ , zur Analyse  $\geq 99 \%$ ), Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ , ACS Reagenz  $\geq 99 \%$ ), Magnesiumcarbonat ( $\text{MgCO}_3$ , rein  $\geq 40 \%$  Mg als  $\text{MgO}$ ) und Huminsäure Natriumsalz (technische Reinheit) wurden bei Sigma-Aldrich (Wien, Österreich) erworben.

Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , zur Analyse) und Magnesiumnitrat-Hexahydrat ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , für Metallspurenanalyse 99,999 %) stammen von Fisher Scientific (Wien, Österreich).

Weitere verwendete Chemikalien waren Salzsäure ( $\text{HCl}$ , TraceSELECT™ für die Spurenanalyse  $\geq 30 \%$ ) von Honeywell International (Wien, Österreich), Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , zur Analyse  $\geq 85 \%$ ) von Merck KGaA (Wien, Österreich), Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ , PrimarPlus für die Spurenanalyse  $> 68 \%$ ) von Fisher Scientific (Wien, Österreich).

Es wurde eine Silber-Standardlösung (1,000 mg/L in 2 %  $\text{HNO}_3$ , AVS Titrinorm®) von VWR International GmbH (Wien, Österreich) verwendet.

Titrisol® Salzsäure ( $\text{HCl}$  0,1 mol/L, M-Clarity™) Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) wurde bei der Titration des Säurebindungsvermögens eingesetzt.

Es wurden Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ , N4.5), Acetylen ( $\text{C}_2\text{H}_2$ , N2.6), Argon (Ar, N5.0) und synthetische Luft (N5.0, 79,5 %  $\text{N}_2$ , 20,5 %  $\text{O}_2$ ) von Messer Austria GmbH (Wien, Österreich) verwendet.

### 3.2 Künstliches Donauwasser als Versuchsmedium

Es wurde künstliches Donauwasser (Artificial Danube Water, ADW) als Medium für die Versuche verwendet, um naturnahe Bedingungen zu schaffen. Da *N. davidi* bereits in europäischen Flüssen nachgewiesen wurde, stellt das Einzugsgebiet der Donau ein durchaus relevantes Habitat für diese Garnelenart dar. Die Herstellung des Mediums wurde erstmals von Eiser (2023) beschrieben und stützt sich auf Wasserwerte, die im Jahr 2022 bei Wien in der Lobau gemessen wurden (MA 39 - Labors für Hygiene, 2022). Tabelle 2 zeigt den Konzentrationsbereich dieser Werte und vergleichbare Werte aus dem Folgejahr 2023, die bei der Messstelle Wien-Nußdorf gemessen wurden (Umweltbundesamt, 2024). Es ist der Konzentrationsbereich der insgesamt zwölf monatlichen Messungen dargestellt, da die Konzentrationen in den einzelnen Monaten saisonbedingt schwanken. Zusätzlich sind die mittleren Konzentrationen mit Standardabweichung für das ADW, welches für die Mesokosmenversuche verwendet wurde, aufgeführt (n = 6). Diese weisen keinen signifikanten Unterschied zu den Literaturwerten des Donauwassers auf (siehe Tabelle 2). Exakte Ionenkonzentrationen für die einzelnen Versuche befinden sich in Appendix 1.

Tabelle 2 Vergleich mit Messdaten der letzten beiden Jahre aus der Donau mit dem verwendeten ADW (n = 6)  
Monatlich gemessene Werte für das Jahr 2023 bei Nußdorf sind als Konzentrationsbereiche angegeben (in mg/L)  
DOC beschreibt den gelösten organischen Kohlenstoff (MA 39 - Labors für Hygiene, 2022; Umweltbundesamt, 2024)

|                                    | <b>Lobau 2022</b> | <b>Nußdorf 2023</b> | <b>ADW</b>    |
|------------------------------------|-------------------|---------------------|---------------|
| <b>Na<sup>+</sup></b>              | 7,7 - 11,0        | 6,2 - 15,6          | 9,91 ± 1,29   |
| <b>K<sup>+</sup></b>               | 1,5 - 3,9         | 1,69 - 2,51         | 3,26 ± 1,02   |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b>             | 15 - 22           | 8,2 - 13,7          | 17,8 ± 0,8    |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>             | 65 - 83           | 40,0 - 63,5         | 67,5 ± 7,4    |
| <b>Cl<sup>-</sup></b>              | 11 - 18           | 8,11 - 25,8         | 14,9 ± 0,8    |
| <b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> | 26 - 39           | 18,6 - 32,7         | 34,0 ± 1,0    |
| <b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>  | 1 - 5             | 0,856 - 2,33        | 1,11 ± 0,10   |
| <b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> | -                 | -                   | 262 ± 17      |
| <b>F<sup>-</sup></b>               | < 0.2             | -                   | < LOD         |
| <b>DOC</b>                         | -                 | 1,7 – 8,9           | 0,795 ± 0,235 |

Die genaue Herstellung des ADW ist in Kapitel 3.6.1 beschrieben.

### 3.3 Versuchsorganismus *Neocaridina davidi*

Die Rückenstrichgarnele *Neocaridina davidi* gehört zu den Süßwassergarnelen (Atyidae). Der Wildtyp ist transparent bis rötlich/bräunlich, allerdings existieren orange, grüne, gelbe, blaue und rote Zuchtformen. Aufgrund letzterer ist sie auch unter dem Namen „Red Cherry shrimp“ bekannt (Suen & Gillett-Kaufman, 2020). Sie erreicht eine Größe von 1,5 - 3,5 cm, wobei die weiblichen Tiere generell größer werden (Levitt-Barmats et al., 2019; Pantaleão et al., 2015). *N. davidi* stammt ursprünglich aus Südostasien, ist als invasive Spezies aber bereits in vielen Teilen der Welt wie Hawaii (Englund & Cai, 1999), Polen (Jabłońska et al., 2018) und Israel (Levitt-Barmats et al., 2019) verbreitet. Vermutlich kommt es durch den Aquarienhandel zu Freilassungen in neue Gebiete (Turkmen & Karadal, 2012). Außerdem ist *N. davidi* eine sehr robuste Art die sich schnell vermehrt, was zu ihrem Potential als invasive Spezies beiträgt (Levitt-Barmats et al., 2019).

Als benthisches Tier lebt *N. davidi* in unmittelbarer Nähe des Gewässergrundes. Sie ernährt sich von abgestorbenem organischem Material, Mikroinvertebraten und dem Biofilm, der sich auf Wasserpflanzen bildet (Vazquez et al., 2022).

*N. davidi* wurde bereits in anderen Studien als Versuchsorganismus für Toxizitätstests herangezogen (Razekenari et al., 2023; Zanitti et al., 2023). Ostróžka et al. (2024) untersuchten Effekte, die durch eine Exposition mit Nickel hervorgerufen wurden, während Xing et al. (2021, 2022) die Auswirkungen von Kupfer beobachteten. Zum aktuellen Zeitpunkt wurden noch keine Ergebnisse zu einer Silberexposition von *N. davidi* veröffentlicht. Es beschäftigen sich jedoch einige Arbeiten mit Garnelen, die in Aquakulturen für den menschlichen Verzehr gezüchtet werden, hauptsächlich die Weißfußgarnele *Litopenaeus vannamei*. Hier wird versucht mit AgNP als antimikrobiellem Wirkstoff die Ausbreitung von Viren zu verhindern. Ergebnisse zeigen, dass die Überlebensrate bei einer Infektion mit dem Weißfleckensyndrom-Virus (White spot syndrome virus) durch Zugabe von AgNP steigt, während die Nanopartikel selbst keine oder nur eine geringe toxische Wirkung gegenüber den Garnelen aufweisen (Camacho-Jiménez et al., 2020; Romo Quiñonez et al., 2022).

### 3.4 Silbarnanopartikel

Ag Nanospheres (5 mg/mL in Wasser) mit einem Durchmesser von 50 nm und einem PVP-Coating (40 kDa) wurde von nanoComposix (San Diego, USA) erworben. Sie wurden bei 4°C im Dunklen gelagert. Je nach Konzentration der NP handelt es sich um eine gelbliche bis dunkelgraue Lösung (siehe Abbildung 2). Je nach Bedarf wurden kurz vor Versuchsbeginn Verdünnungen mit Milli-Q Wasser hergestellt und direkt verwendet.

Ag Nanopowder (< 100 nm Partikelgröße, 99,5 % mit PVP als Stabilisator) als Pulver stammt von Sigma Aldrich (St. Louis, USA) und wurde bei Raumtemperatur im Dunklen unter Argonatmosphäre gelagert. Die frisch hergestellte Suspension hat einen gräulichen Farbton (siehe Abbildung 3). Vor jedem Versuch wurde eine Stocklösung mit einer Konzentration von etwa 60 mg/L hergestellt. Das Nanopowder wurde unter Argon entnommen, in 250 mL Milli-Q Wasser suspendiert und für 90 Minuten bis unmittelbar vor Versuchsbeginn im Ultraschallbad behandelt.

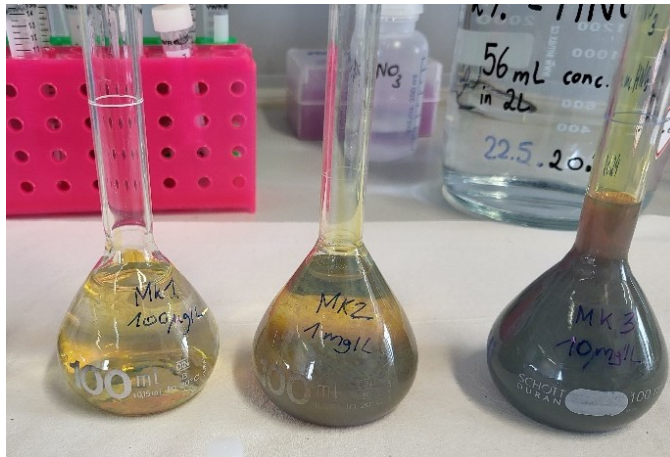


Abbildung 2 Frisch hergestellte Nanospheres-Lösungen

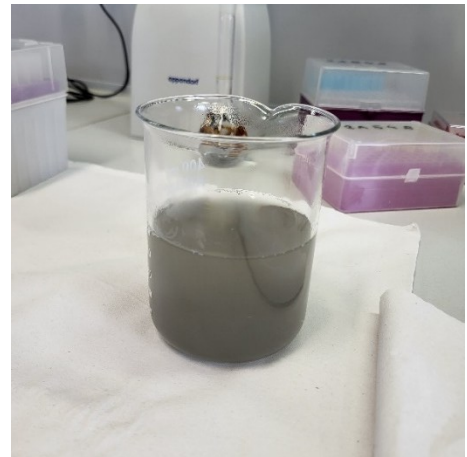


Abbildung 3 Frisch hergestellte Nanopowder-Lösung



Abbildung 4 Alte Nanospheres-Lösungen - es ist kein Absinken der Nanopartikel erkennbar

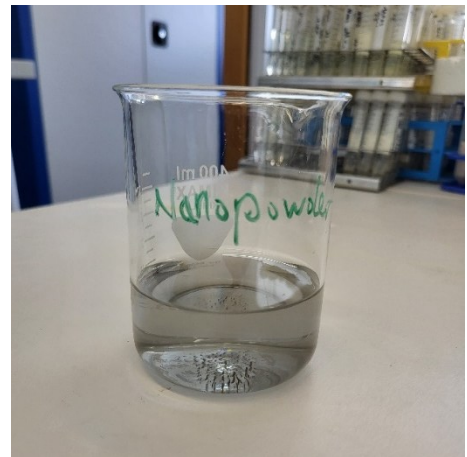


Abbildung 5 Alte Nanopowder-Lösung - die NP liegen deutlich erkennbar auf dem Gefäßboden

Die unterschiedliche Behandlung der NP-Lösungen ergibt sich dadurch, dass die gecoateten Nanospheres auch über längere Zeit in Lösung bleiben (siehe Abbildung 4), während das ungecoatete Nanopowder nach kurzer Zeit agglomeriert und absinkt (siehe Abbildung 5).

### 3.5 Charakterisierung der Nanopartikel

Eine genaue Charakterisierung der verwendeten NP wurde von Eiser (2023) durchgeführt und soll im Folgenden zusammengefasst werden.

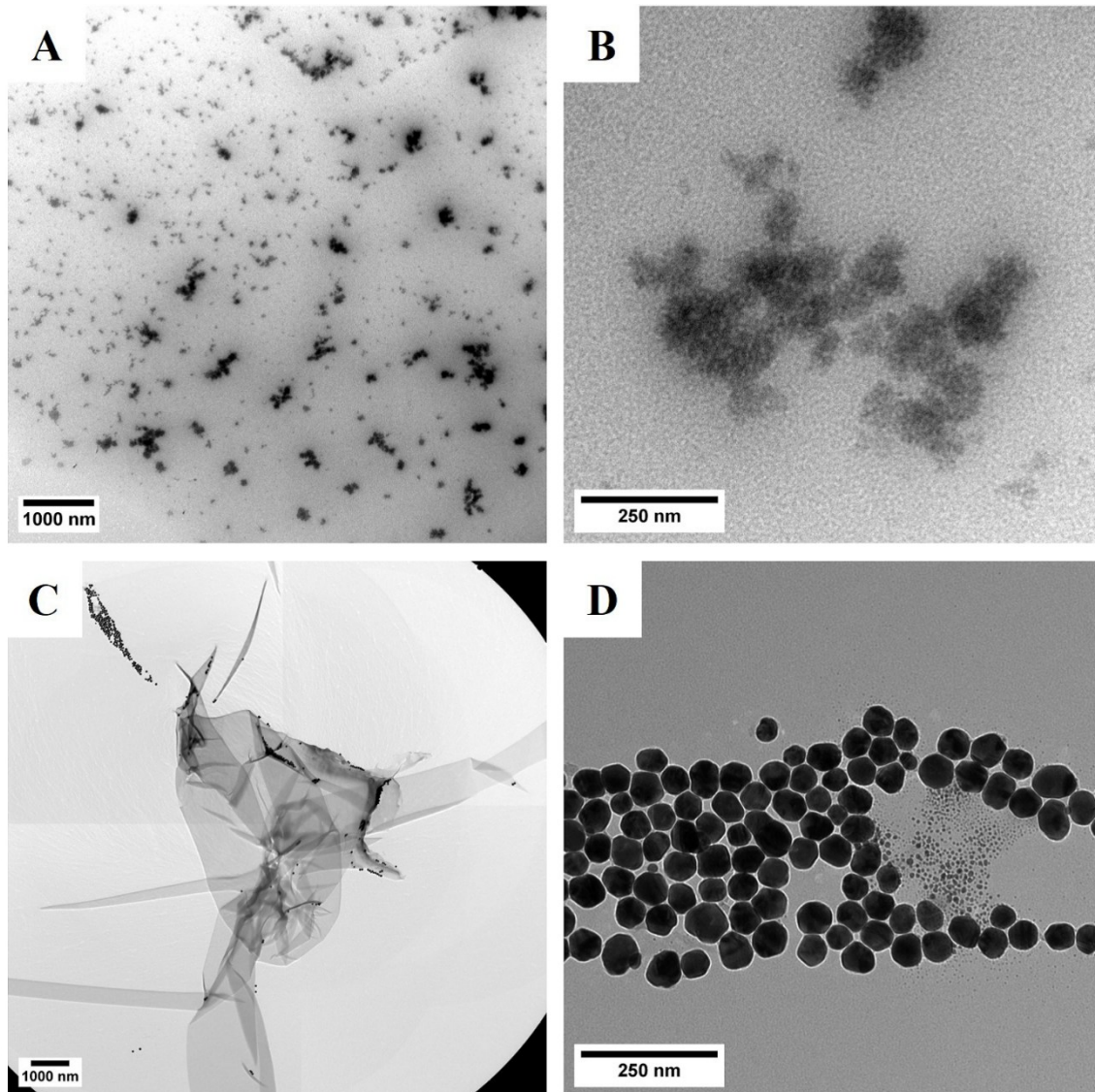


Abbildung 6 TEM-Aufnahmen der Silbernanopartikel (nach Eiser (2023)).

Nanopowder (oben) und Nanospheres (unten) bei 4.000-facher (A, C) und 31.500-facher (B, D) Vergrößerung

Anhand von Bildern (siehe Abbildung 6), die mit TEM (Transmissions-elektronenmikroskopie) aufgenommen wurden, wurde die Form der Nanopartikel durch ihre Zirkularität beschrieben. Dabei handelt es sich um einen Wert zwischen 0 und 1, wobei 1 einen perfekten Kreis darstellt (siehe Formel 1).

$$\text{Zirkularität} = 4\pi \frac{\text{Oberfläche}}{\text{Umfang}^2}$$

Formel 1

Die Nanospheres zeigen eine stark ausgeprägte und einheitliche Zirkularität mit Werten zwischen 0,48 und 1,00 und einem Median von 0,93. Das Nanopowder weist eine signifikant (als signifikant wurden Werte mit  $p < 0,05$  gewertet) geringere Zirkularität mit breit gestreuten Werten zwischen 0,04 und 0,95 und einem Median von 0,49 auf.

Die Größenverteilung der NP wurde mittels TEM und DLS (dynamic light scattering) bestimmt, wobei bei DLS die Annahme getroffen wird, dass sphärische Partikel vorliegen. Die Ergebnisse beider Methoden sind in Tabelle 3 dargestellt. Der mit DLS bestimmte hydrodynamische Durchmesser liegt bei den Nanospheres zwischen 32 und 116 nm mit einem Median von 61 nm. Bei den TEM-Ergebnissen zeigt sich für die Nanospheres eine einheitlichere Größenverteilung, die in einem ähnlichen Bereich zwischen 26 und 100 nm liegt und einen Median von 55 nm hat. Beide Ergebnisse befinden sich nahe an dem vom Hersteller angegebenen Durchmesser von 50 nm.

Tabelle 3 Ermittelte Größenverteilungen der NP mittels DLS und TEM (Durchmesser in nm) nach Eiser (2023)

|                                           | <b>Spannweite</b> | <b>1. Quartil</b> | <b>Median</b> | <b>3. Quartil</b> |
|-------------------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|-------------------|
| <i>Dynamic Light Scattering</i>           |                   |                   |               |                   |
| <b>Nanospheres</b>                        | 322 - 116         | 52                | 61            | 77                |
| <b>Nanopowder</b>                         | 23 - 1319         | 137               | 261           | 424               |
| <i>Transmissionselektronenmikroskopie</i> |                   |                   |               |                   |
| <b>Nanospheres</b>                        | 26 - 100          | 48                | 55            | 61                |
| <b>Nanopowder</b>                         | 27 - 1033         | 45                | 64            | 93                |

Für das Nanopowder sind die ermittelten Größenbereiche mit TEM und DLS ebenfalls ähnlich. Das Ergebnis mit TEM ist ein Größenbereich von 27 bis 1033 nm mit einem Median von 64 nm. Mit DLS erhält man einen Bereich von 23 bis 1319 nm, aber einen höheren Median von 261 nm. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu dem vom Hersteller angegebenen Durchmesser von  $< 100$  nm.

## 3.6 Experimenteller Ablauf

### 3.6.1 Herstellung des künstlichen Donauwassers

Die Vorschrift zur Herstellung des künstlichen Donauwassers für die Versuche wurde von Eiser (2023) übernommen.

Für 30 L ADW wurden 27,27 L deionisiertes Wasser vorgelegt und über 10 Minuten ein kräftiger CO<sub>2</sub>-Strom über einen Ausströmerstein eingeleitet während das Wasser gerührt wurde (400 Umdrehungen/min). Anschließend wurden 5,4 g CaCO<sub>3</sub> und 1,14 g MgCO<sub>3</sub> in insgesamt 200 mL Wasser beigelegt und für vier Stunden mit CO<sub>2</sub> gerührt, um die zugegeben Salze in Lösung zu bringen. Abschließend wurden 2,05 L Wasser, 0,15 g Huminsäuren in 120 mL Wasser und jeweils 120 mL von Stock 1 bis 3 (siehe Tabelle 4) zugegeben.

Tabelle 4 Zusammensetzung der Stocklösungen für die Herstellung des ADW

|                | Salze                                                                   | Wasser |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Stock 1</b> | 10,58 g MgSO <sub>4</sub><br>258,5 mg Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 500 mL |
| <b>Stock 2</b> | 3,887 g CaCl <sub>2</sub>                                               | 500 mL |
| <b>Stock 3</b> | 4,453 g NaHCO <sub>3</sub><br>896 mg KHCO <sub>3</sub>                  | 500 mL |

Über Nacht (ca. 15 - 20 Stunden) wurde gerührt und Raumluft durch den Ausströmerstein ins Wasser eingeleitet, um das im Wasser gelöste CO<sub>2</sub> wieder zu entfernen. Schließlich wurde mit deionisiertem Wasser auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt, da über Nacht eine geringe Menge Wasser verdunstet. Eine komplette Charakterisierung aller verwendeten ADW findet sich in Appendix 1. Um Analysefehler auszuschließen wurde für alle Versuche der Ionenbilanzfehler (Charge Balance Error, CBE) berechnet (Formel 2), der das Verhältnis von positiven zu negativen Ladungen angibt und in der Theorie bei 0 % liegt. Als akzeptabel galten hier Werte zwischen -5 % und 5 %. Da die Ladungen berücksichtigt werden, muss die Berechnung in Äquivalentkonzentrationen durchgeführt werden. Somit wird K<sup>+</sup> einfach, aber Ca<sup>2+</sup> doppelt gezählt.

$$CBE \text{ (in \%)} = \frac{\sum Kationen - |\sum Anionen|}{\sum Kationen + |\sum Anionen|} * 100 \quad \text{Formel 2}$$

### 3.6.2 Versuchsaufbau

Je nach Versuch wurden zwischen vier und sechs Mesokosmen verwendet, wobei einer davon immer als Referenz geführt wurde. Die Mesokosmen wurden wie in Abbildung 7 gezeigt nebeneinander aufgebaut.

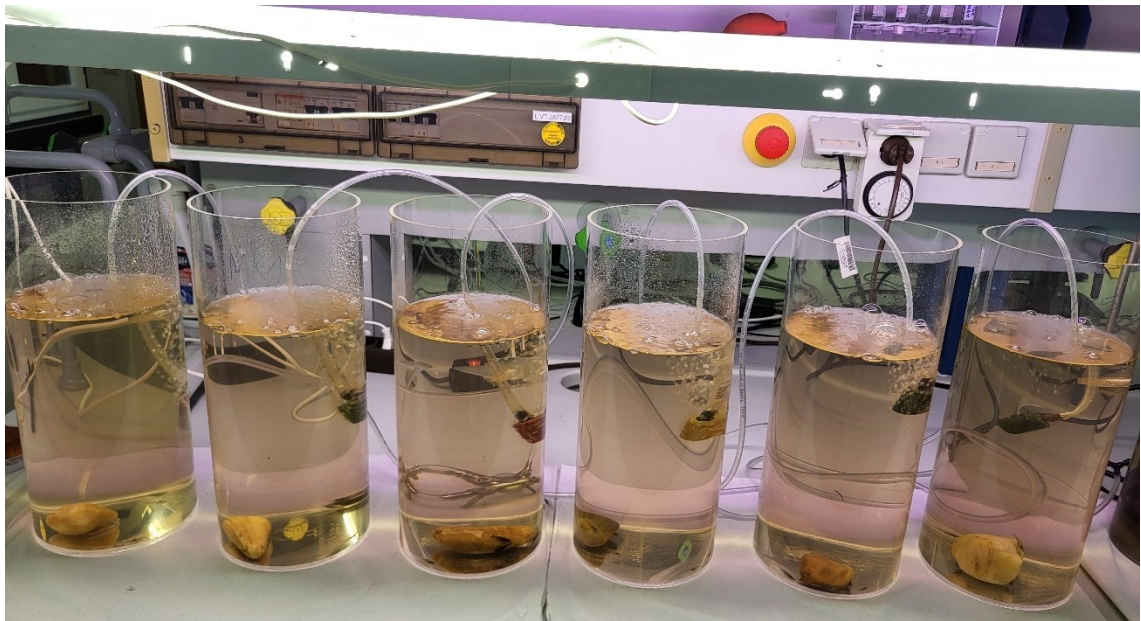


Abbildung 7 Fertiger Versuchsaufbau der Mesokosmen mit künstlichem Donauwasser, Luftzufuhr, Naturstein und gleichmäßige Beleuchtung von oben

Es handelt sich um Zylinder aus Acrylglas mit 15 cm Durchmesser und 35 cm Höhe, die nach oben hin offen blieben. Jeder Mesokosmos enthielt einen Naturstein und wurde mit 4 L ADW befüllt. Auf etwa halber Höhe des Behälters wurde ein Ausströmerstein befestigt, der an eine Luftpumpe angeschlossen war, um eine stetige Sauerstoffzufuhr durch Raumluft zu gewährleisten. Es wurde ein 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus eingehalten.

### 3.6.3 Versuchsablauf

Für jeden Versuch wurden 30 L ADW wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben frisch hergestellt. Die zuvor mit verdünnter  $\text{HNO}_3$  gereinigten Mesokosmen wurden mit ADW befüllt und dem Naturstein sowie der Luftzufuhr versehen.

Unmittelbar vor Versuchsstart wurden die Silber-/Silbernanopartikellösungen

hinzugefügt. Dabei wurden relativ zur Gesamtmenge vernachlässigbar kleine Volumina verwendet, weswegen in dieser Hinsicht keine Volumenkorrektur durchgeführt wurde. Die für die Versuche eingesetzten Nominalkonzentrationen sind in Tabelle 5 ersichtlich. Für die beiden AgNP wurde zuerst ein Orientierungsversuch über einen größeren Konzentrationsbereich durchgeführt, bevor in einem oder zwei weiteren Mesokosmenversuchen die Steigung der Toxizitätskurve dann über einen ausgewählten, engeren Konzentrationsbereich untersucht wurde. Anschließend wurden direkt aufeinander folgend jeweils zehn Versuchstiere in jeden Mesokosmos überführt. Die Garnelen der Art *Neocaridina davidi* wurden aus einer lokalen Zucht am Tag des Versuchsbeginnes erworben. Es wurden naturfarbene Exemplare von optisch vergleichbarer Größe gewählt. Der anfängliche Wasserstand wurde markiert und die Mesokosmen alle 24 Stunden nach der Probennahme mit Milli-Q Wasser bis zur Markierung aufgefüllt, um verdunstetes Wasser zu ersetzen.

Tabelle 5 Für den jeweiligen Versuch eingesetzte Nominalkonzentrationen

| Versuchsbezeichnung     | Eingesetzte Nominalkonzentrationen (µg/L) |
|-------------------------|-------------------------------------------|
| <b>Ionisches Silber</b> | 0 – 1 – 3 – 4 – 5 – 8                     |
| <b>Nanospheres 1</b>    | 0 – 100 – 1000 – 10000                    |
| <b>Nanospheres 2</b>    | 0 – 20 – 50 – 80 – 150                    |
| <b>Nanospheres 3</b>    | 0 – 15 – 30 – 40 – 100                    |
| <b>Nanopowder 1</b>     | 0 – 20 – 40 – 60 – 100 – 1000             |
| <b>Nanopowder 2</b>     | 0 – 200 – 400 – 500 – 600 – 800           |

Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden überlebende Versuchstiere gezählt, tote Versuchstiere aus dem Wasser entfernt und bei -25°C gelagert. Als Kriterium für das Überleben wurde eine eindeutige Reaktion bei leichter Berührung festgelegt. Nach 72 Stunden wurde der Versuch beendet, alle verbleibenden lebenden Versuchstiere gefangen und ebenfalls bei -25°C eingefroren.

Die Versuchstiere erhielten während der Versuche kein Futter.

### 3.6.4 Probennahmen

Bei den Wasserproben wurde über alle Versuche zwischen “gelöstem Silber” und “totalem Silber” unterschieden. Nach der gängigen Definition handelt es

sich bei allen Komponenten, die einen Filter mit 0,45 µm Porengröße passieren können, um gelöste Stoffe (Danielsson, 1982). Somit galten alle Nanopartikel als gelöst, die nach Filtration mit einem solchen Filter immer noch in der Probe vorhanden waren. "Totales Silber" bezeichnet dementsprechend sämtliches in der unfiltrierten Wasserprobe enthaltenes Silber.

Von dem fertigen ADW wurde eine gefilterte sowie ungefilterte Probe für die Bestimmung des Totalen organischen Kohlenstoffs (Total Organic Carbon, TOC) und des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) genommen (Unterscheidung nach dem oben beschriebenen Prinzip) und zusätzlich etwa 200 mL durch 0,45 µm-gefilterte Probe für die Ionenchromatografie, Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie und die Titration des Säurebindungsvermögens. Zwischen Zugabe der Silber-/Silbernanopartikellösungen und Einsetzen der Versuchstiere wurden in jedem Mesokosmos Proben zur Bestimmung der Konzentrationen an gelöstem und totalem Silber entnommen. Nach demselben Prinzip fand 24, 48 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn eine Probennahme statt.

### **3.7 Probenvorbereitung**

Die Wasserproben wurden mit demselben Volumen an 68% HNO<sub>3</sub> versetzt (5 + 5 mL) und bei 70°C für 60 Minuten im Trockenschrank (Heraeus T5028) aufgeschlossen.

Die tiefgefrorenen Garnelen wurden für mindestens 24 Stunden im Gefriertrockner (Alpha 2-4 LD plus, Christ) schonend getrocknet. Nachdem die Masse der einzelnen Garnelen bestimmt worden ist, wurden sie mit jeweils 3 mL 34% HNO<sub>3</sub> versetzt und bei 70°C für 90 Minuten im Trockenschrank aufgeschlossen. Diese Proben wurden abschließend durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, um nicht vollständig aufgelöste Reste zu entfernen.

## 3.8 Analysemethoden

### 3.8.1 Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie

Für die Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GFAAS) wurde ein PerkinElmer PinAAcle 900Z Atomabsorptionsspektrometer mit einem PerkinElmer AS900 Furnace Autosampler verwendet. Bei den Silbermessungen kam eine PerkinElmer Single Element Lumina™ Hohlkathodenlampe für Silber zum Einsatz. Diese wurde vor Verwendung drei bis vier Stunden lang im Instrument vorgewärmt.

Die Absorption für Silber wurde bei einer Wellenlänge von 328,07 nm und einer Spaltbreite von 0,7 nm bestimmt. Für jede Messung wurden 20 µL Probe verwendet. Proben wurden über die Peakflächen als Triplikate gemessen und der Mittelwert als Ergebnis angegeben.

Das Temperaturprogramm (grafischer Verlauf siehe Abbildung 8) der GFAAS startete mit dem Trocknen und Verdampfen der Probe. Dafür wurde das Graphitrohr innerhalb einer Sekunde auf 110°C geheizt und 30 Sekunden gehalten. Danach wurde das Rohr über 15 Sekunden auf eine Temperatur von 130°C erhitzt und wieder für 30 Sekunden gehalten. Für die Pyrolyse der Probe wurde sie innerhalb von 10 Sekunden auf 800°C gebracht und für 20 Sekunden belassen. Die Atomisierung fand bei 1700°C über fünf Sekunden statt und die Atomabsorption wurde gemessen. Abschließend folgte ein Reinigungsschritt, für den innerhalb einer Sekunde auf 2550°C erhitzt und diese Temperatur für drei Sekunden gehalten wurde.

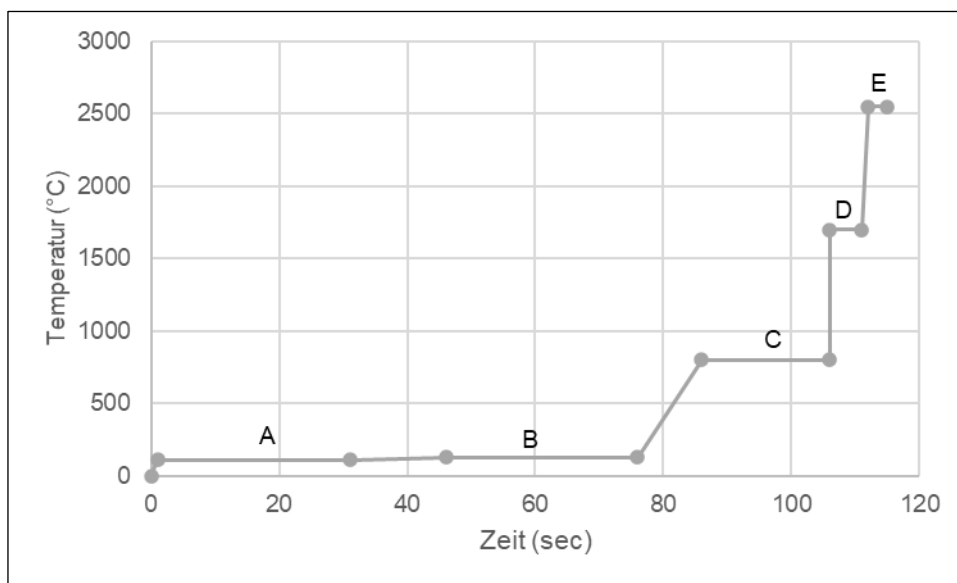


Abbildung 8 Temperaturprogramm der GFAAS für Ag: A + B Trocknen und Verdampfen, C Pyrolyse, D Atomisierung (kein Ar Gas) und E Reinigung

Während des Programms wurde stetig Argongas mit einer Menge von 250 mL/min durch das Graphitrohr geleitet. Der Gasstrom wurde nur für die Atomisierung und Absorptionsmessung ausgesetzt.

Mit frisch hergestellten Standards (in 2 %  $\text{HNO}_3$ ) wurde eine lineare Kalibrationsgerade über die Konzentrationen 0; 0,5; 1,0; 5,0 und 10  $\mu\text{g/L}$  erstellt. Kalibrationen mit  $R^2$ -Werten  $> 0,999$  wurden als ausreichend betrachtet. Um die Signalintensität mit Fortlaufen der Messungen zu überprüfen, wurde nach jeweils zehn Proben der Standard mit der Konzentration 10  $\mu\text{g/L}$  gemessen. Das limit of detection (LOD) lag bei 0,03  $\mu\text{g/L}$  für Silber.

### 3.8.2 Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie

Die quantitative Bestimmung der Kationen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  im ADW wurde mittels Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (FAAS) durchgeführt. Dafür wurde ein PerkinElmer AAnalyst 200 Atomabsorptionsspektrometer mit PerkinElmer Single Element Lumina™ Hohlkathodenlampen des entsprechenden Elements verwendet. Aufgrund ihres hohen Silbergehalts wurden auch die Wasserproben vom Versuch „Nanospheres 1“ mit der FAAS gemessen.

Als Kalibrationsgeraden wurden Polynomfunktionen durch Null mit vier Einzelpunkten und 2 % HNO<sub>3</sub> als Blank aufgenommen (siehe Tabelle 6). Für die Verdünnungen der Standards wurde ebenfalls 2 % HNO<sub>3</sub> verwendet. Als Anforderung für eine erfolgreiche Kalibration galt ein R<sup>2</sup>-Wert von > 0,9995.

Tabelle 6 Parameter der FAAS-Messungen und Konzentrationen der Kalibrationen

|                        | <b>Wellenlänge<br/>(nm)</b> | <b>Spaltbreiten<br/>(mm)</b> | <b>Konzentrationen für<br/>die Kalibration (mg/L)</b> |
|------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Na<sup>+</sup></b>  | 589,00                      | 1,8/0,6                      | 0 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1,0                          |
| <b>K<sup>+</sup></b>   | 766,49                      | 2,7/0,45                     | 0 - 0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,0                            |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b> | 285,21                      | 2,7/1,05                     | 0 - 0,063 - 0,125 - 0,25 - 0,5                        |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b> | 422,67                      | 2,7/0,6                      | 0 - 2,5 - 5,0 - 10 - 20                               |
| <b>Ag<sup>+</sup></b>  | 328,07                      | 2,7/0,8                      | 0 - 0,25 - 0,5 - 1,0 - 2,0                            |

Die Proben wurden als Triplikat gemessen und der Mittelwert davon als Ergebnis herangezogen.

### 3.8.3 Ionenchromatografie

Es wurde ein Metrohm 930 Compact IC Flex Gerät mit einer Metrosep A Supp 5 Trennsäule (Partikelgröße = 5 µm, Länge = 250 mm, Innendurchmesser = 4,0 mm) zusammen mit einem Metrohm IC Conductivity Detector zur verwendet, um chromatografisch die Konzentrationen der Anionen Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup> und SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> im ADW zu bestimmen. Die Messung wurde bei 25,0°C und einer Fließgeschwindigkeit von 0,700 mL/min über 30 Minuten durchgeführt. Als Laufmittel diente eine Lösung mit 3,2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 1,0 mM NaHCO<sub>3</sub>. Die Leitfähigkeit des Laufmittels wurde im Detektor mit 0,1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> unterdrückt. Für die Analyse wurden 20 µL der gefilterten (0,45 µm) Probe auf die Säule aufgebracht. Es wurden Kalibrationsfunktionen der Anionen verwendet und über die Peakflächen integriert. Die Kalibrationen wurden bei jeder Messung durch Proben bekannter Konzentration überprüft und gegebenenfalls erneuert.

### 3.8.4 TOC und DOC

Zur Bestimmung der Huminstoffe im ADW wurden der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) und der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) gemessen.

Das dafür eingesetzte Gerät war ein Shimadzu TOC-V CPH Total Organic Carbon Analyzer mit einem ASI-V Autosampler. DOC und TOC wurden für jeden Versuch nur einmal zu Versuchsbeginn bestimmt.

Es wurde eine ungefilterte 10 mL Probe für TOC und eine durch einen 0,45 µm Spritzenfilter gefilterte 10 mL Probe für DOC gemessen. Diese wurden im Autosampler mit 1 M HCl auf pH < 2 angesäuert und drei Minuten lang mit synthetischer Luft durchspült, wodurch anorganischer Kohlenstoff entfernt werden konnte. Damit wurde ausschließlich non-purgeable organic carbon (NPOC) gemessen. Die Oxidation von jeweils 50 µL Probe wurde durch platin-katalysierte Verbrennung bei 720°C erreicht. Dabei entstandenes CO<sub>2</sub> wurde mittels eines nichtdispersiven Infrarotsensors detektiert. Eine lineare Kalibration über die Peakflächen einer Kaliumphthalat-Standardlösung wurde regelmäßig durchgeführt. Für die Auswertung wurden Blanks als Hintergrundwerte zwischen den Proben gemessen und jede Probe jeweils um den direkt davor bestimmten Blank korrigiert.

### 3.8.5 Zusätzliche Messungen

Der pH-Wert des ADW wurde in einem gefilterten Aliquot mit einem VWR pH10 Pen gemessen. Die Leitfähigkeit wurde direkt im ungefilterten ADW mit einem Mettler Toledo FiveGo mit LE703 IP67 Leitfähigkeits-Messzelle bestimmt.

Um die Hydrogencarbonatkonzentration zu ermitteln wurde das Säurebindungsvermögen (SBV) bestimmt. 50 mL gefiltertes ADW wurden dafür mit 0,1 M Salzsäure mit einer Glaselektrode potentiometrisch titriert. Ein Beispiel für eine grafische Titrationskurve ist nachfolgend in Abbildung 9 gezeigt. Zur Ermittlung des Äquivalenzpunktes wurde die Gran-Funktion (Formel 3) herangezogen, die gegen das zugegebene Volumen an Säure aufgetragen wird.

$$\text{Gran Funktion} = (V_{\text{Probe}} + V) * 10^{-pH} \quad \text{Formel 3}$$

$$SBV = \frac{100 * V_{\text{ext}}}{V_{\text{Probe}}} \quad \text{Formel 4}$$

|                          |                                                         |
|--------------------------|---------------------------------------------------------|
| V <sub>Probe</sub> ..... | Volumen der Probe (mL)                                  |
| V.....                   | Volumen 0,1 M HCl (mL)                                  |
| V <sub>ext</sub> .....   | extrapolierter Verbrauch an HCl am Äquivalenzpunkt (mL) |
| SBV.....                 | Säurebindungsvermögen (meq/L)                           |

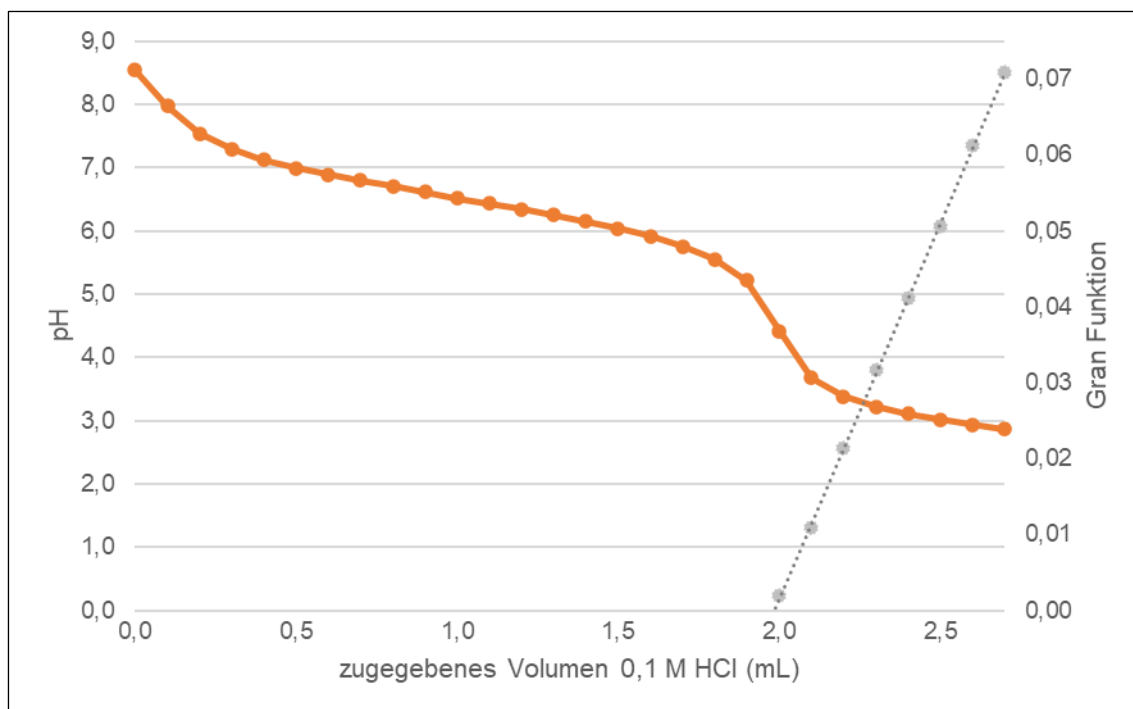


Abbildung 9 Titration des SBV vom Versuch mit  $\text{Ag}^+$ . Der pH-Wert ist in orange, die Gran Funktion in grau gezeigt

Legt man eine Regressionsgerade im Bereich des Äquivalenzpunktes durch diese Punkte (unterbrochene Linie). Der Schnittpunkt mit der x-Achse zeigt den extrapolierten Verbrauch an Säure (in mL) am Äquivalenzpunkt ( $V_{\text{ext}}$ ) an. Das Säurebindungsvermögen wurde mit Formel 4 bestimmt. Es wurde hier annäherungsweise mit der Konzentration aller Carbonate gleichgesetzt, da andere Anionen in deutlich geringeren Mengen vorkommen. Aufgrund des pH-Wertes ist Hydrogencarbonat die dominierende Carbonatspezies und der Einfluss von geringen Mengen  $\text{CO}_3^{2-}$  wird vernachlässigt.

### 3.9 Software

Für die statistische Auswertung und grafische Darstellung wurde SigmaPlot (Version 15.0) verwendet. Weitere Abbildungen und Tabellen wurden mit Microsoft Excel 2019 (Version 2410) erstellt. Ausreißer wurden mittels Grubb's Test mit der online Version von GraphPad bestimmt. Die Relevanz verschiedener Versuchstiere aus der Literatur wurde mithilfe von OneZoom Tree of Life Explorer Version 4.0 bestimmt.

## 4 Ergebnisse

Für alle statistischen Auswertungen galt  $p < 0,05$  als signifikant.

### 4.1 Löslichkeit und Verhalten im Wasser

Während der Versuche wurden sowohl das totale Silber als auch das gelöste Silber ( $0,45 \mu\text{m}$  Filter) bestimmt, um Rückschlüsse über die Löslichkeit der betreffenden Silberspezies treffen zu können. Abbildung 10 zeigt die totale Menge an Silber in den Mesokosmen nach der Zeit für den Versuch mit ionischem Silber. Hier ist ein Trend zur Abnahme der totalen Silberkonzentration mit der Versuchsdauer erkennbar. Nach 24 Stunden waren in den Mesokosmen im Mittel noch 71 % der ursprünglichen Menge Silber vorhanden, nach 48 Stunden waren es im Mittel 53 % und nach 72 Stunden noch im Mittel 47 %. Der Zeitpunkt „0 Stunden“ stellt den Versuchsbeginn dar.

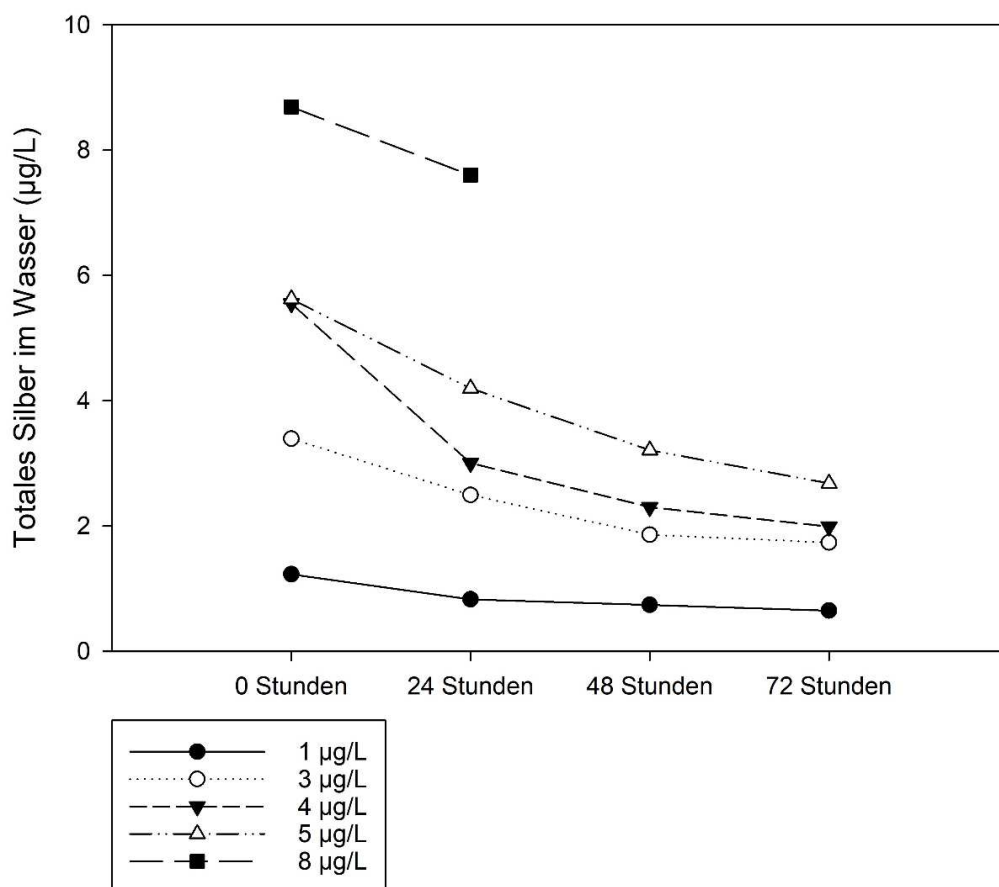


Abbildung 10 Totales Silber im ADW bei dem Versuch mit ionischem Silber nach Nominalkonzentration. Für die höchste Nominalkonzentration wurden nur nach 0 und 24 Stunden Proben genommen

Für denselben Versuch waren nach 24 Stunden im Mittel noch 39 % so viel gelöstes Silber vorhanden wie zu Beginn des Versuchs (siehe Abbildung 11). Nach 48 Stunden hat sich die Menge an gelöstem Silber etwa halbiert (im Mittel 21 % der Menge vom Versuchsbeginn), nach 72 Stunden waren es im Durchschnitt 20 % der Menge vom Versuchsbeginn.

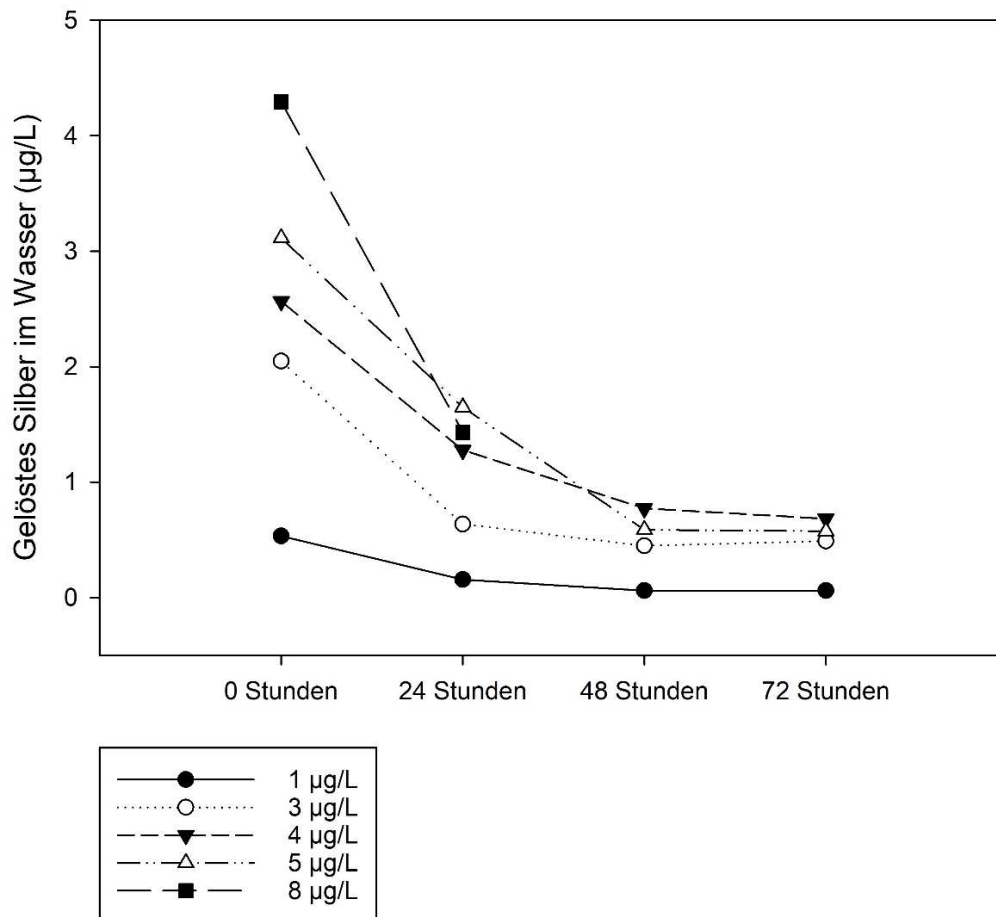


Abbildung 11 Gelöstes Silber im ADW bei dem Versuch mit ionischem Silber nach Nominalkonzentration. Für die höchste Nominalkonzentration wurden nur nach 0 und 24 Stunden Proben genommen

Auch für die Nanospheres zeigt sich in Abbildung 12 eine Abnahme des totalen Silbers über die Versuchsdauer. Nach 24 Stunden waren im Durchschnitt noch 91 % der ursprünglichen Konzentration, nach 48 Stunden waren es im Mittel 84 % und nach Versuchsende im Mittel 70 % der anfänglichen Konzentration.

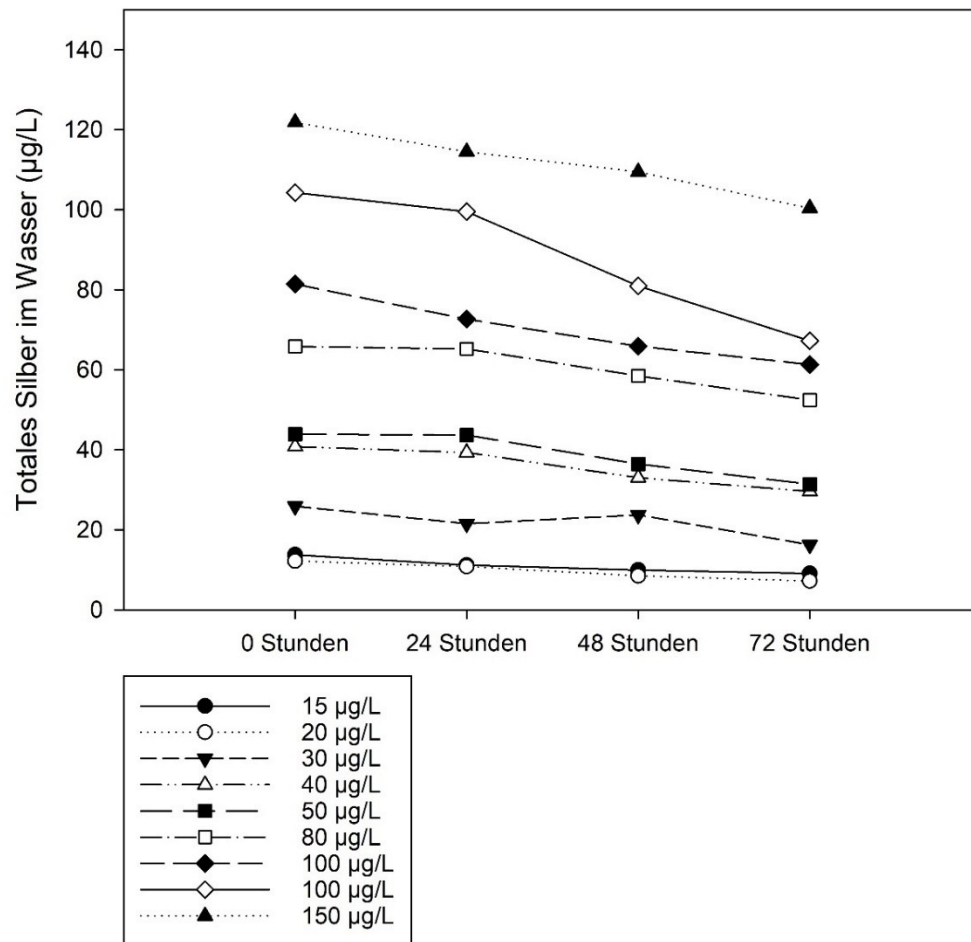


Abbildung 12 Totales Silber im ADW bei den Versuchen mit Ag Nanospheres nach Nominalkonzentration. Die Daten für die Konzentrationen 1 mg/L und 10 mg/L sind nicht abgebildet. Für die Konzentration von 100 µg/L sind aus beiden Versuchsreihen Daten vorhanden

Die Menge an gelöstem Silber für die Nanospheres (siehe Abbildung 13) ist innerhalb der ersten 24 Stunden im Mittel auf 38 % des anfänglichen Wertes gesunken, hat sich danach aber nicht mehr signifikant verändert (34 % nach 48 Stunden und 32 % nach 72 Stunden).

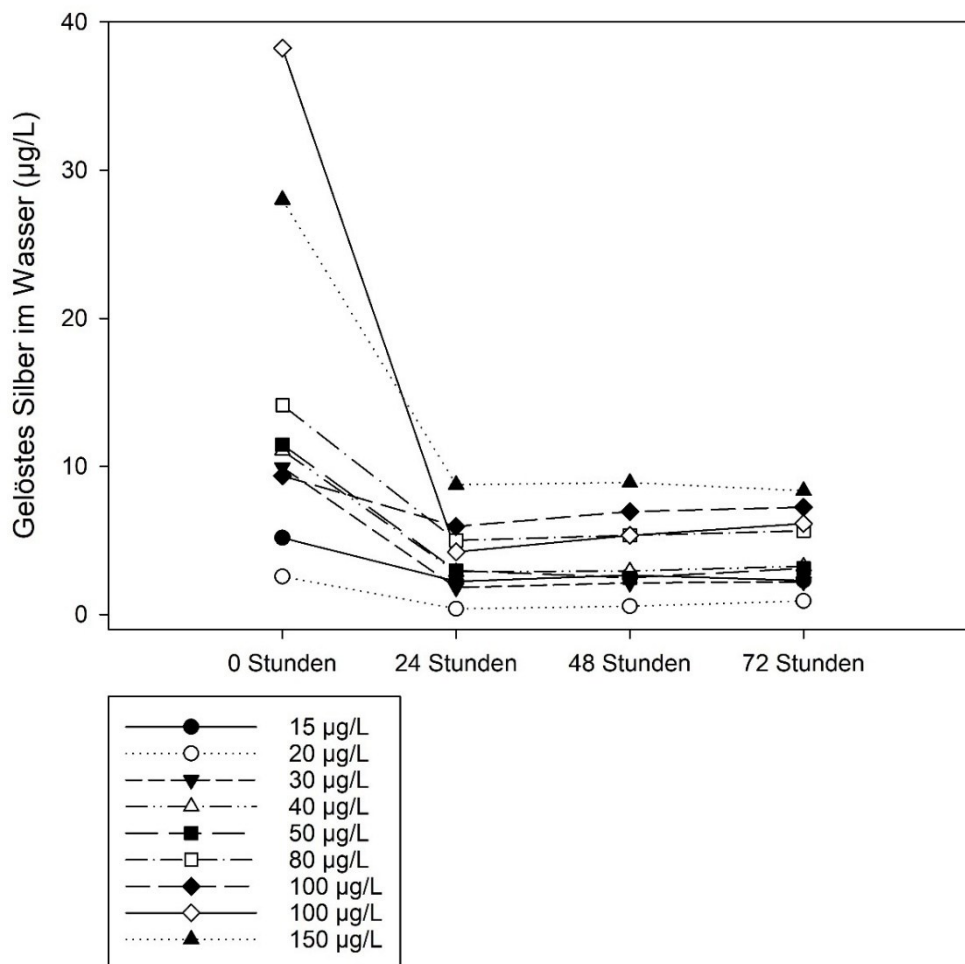


Abbildung 13 Gelöstes Silber im ADW bei den Versuchen mit Ag Nanospheres nach Nominalkonzentration. Die Daten für die Konzentrationen 1 mg/L und 10 mg/L sind zur besseren Anschaulichkeit nicht abgebildet. Für die Konzentration von 100 µg/L sind aus zwei Versuchsreihen Daten vorhanden

Für das Nanopowder ist ebenfalls ein negativer Trend für die Menge an totalem Silber im Medium zu sehen (siehe Abbildung 14). Nach 24 Stunden waren im Schnitt noch 61 % der ursprünglichen Menge an totalem Silber vorhanden. Diese ist weiter auf mittlere 51 % nach 48 Stunden und mittlere 41 % nach 72 Stunden gesunken.

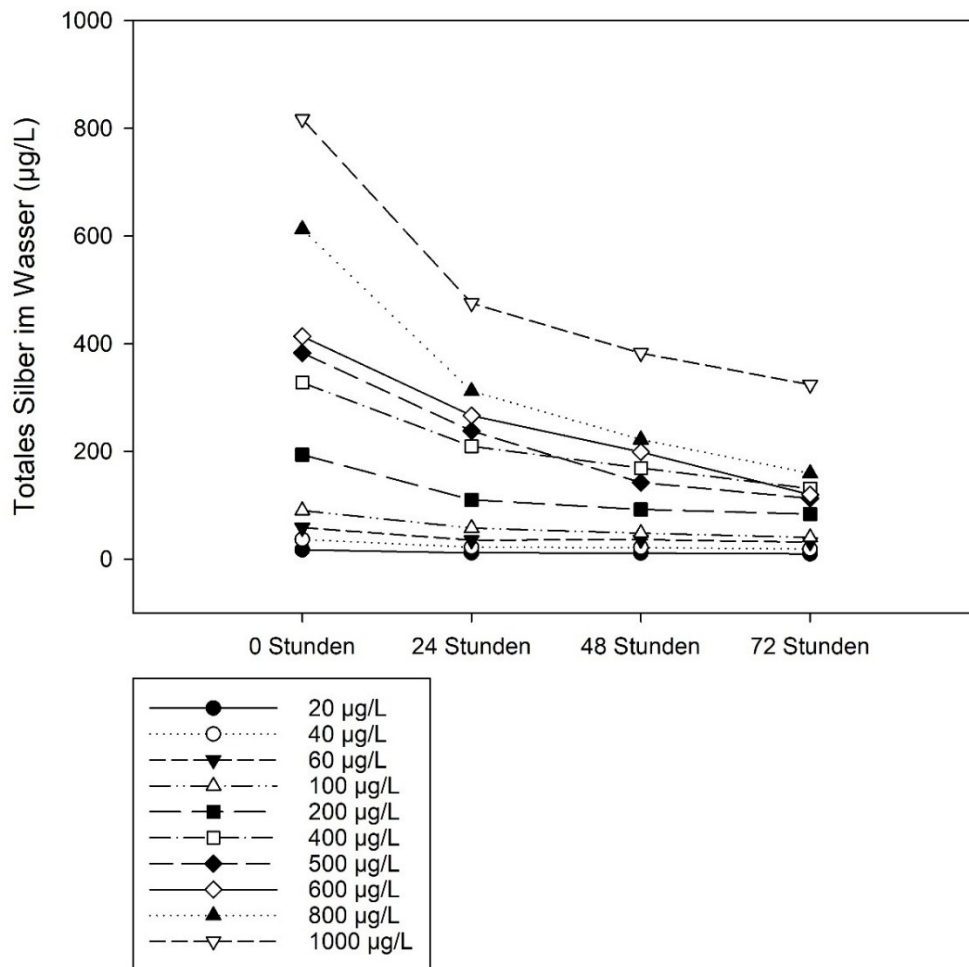


Abbildung 14 Totales Silber im ADW bei den Versuchen mit Ag Nanopowder nach Nominalkonzentration

Im Fall des gelösten Silbers für die Versuche mit Nanopowder lässt sich kein Trend erkennen. Während nach 24 Stunden alle Werte signifikant ( $p < 0,001$ ) gesunken sind (im Schnitt  $57 \pm 24$  % des anfänglichen Wertes), sind nach 48 Stunden (im Mittel 92 % des Anfangswertes) und 72 Stunden (im Mittel 103 % des Anfangswertes) einzelne Zunahmen und Abnahmen sowohl zum Tag davor als auch zum Wert vom Versuchsstart zu erkennen. Im Durchschnitt berechnet sich ein signifikanter ( $p = 0,004$ ) Anstieg zwischen den Werten nach 24 und 48 Stunden, allerdings gilt das nicht für alle Nominalkonzentrationen, wie in Abbildung 15 ersichtlich wird.

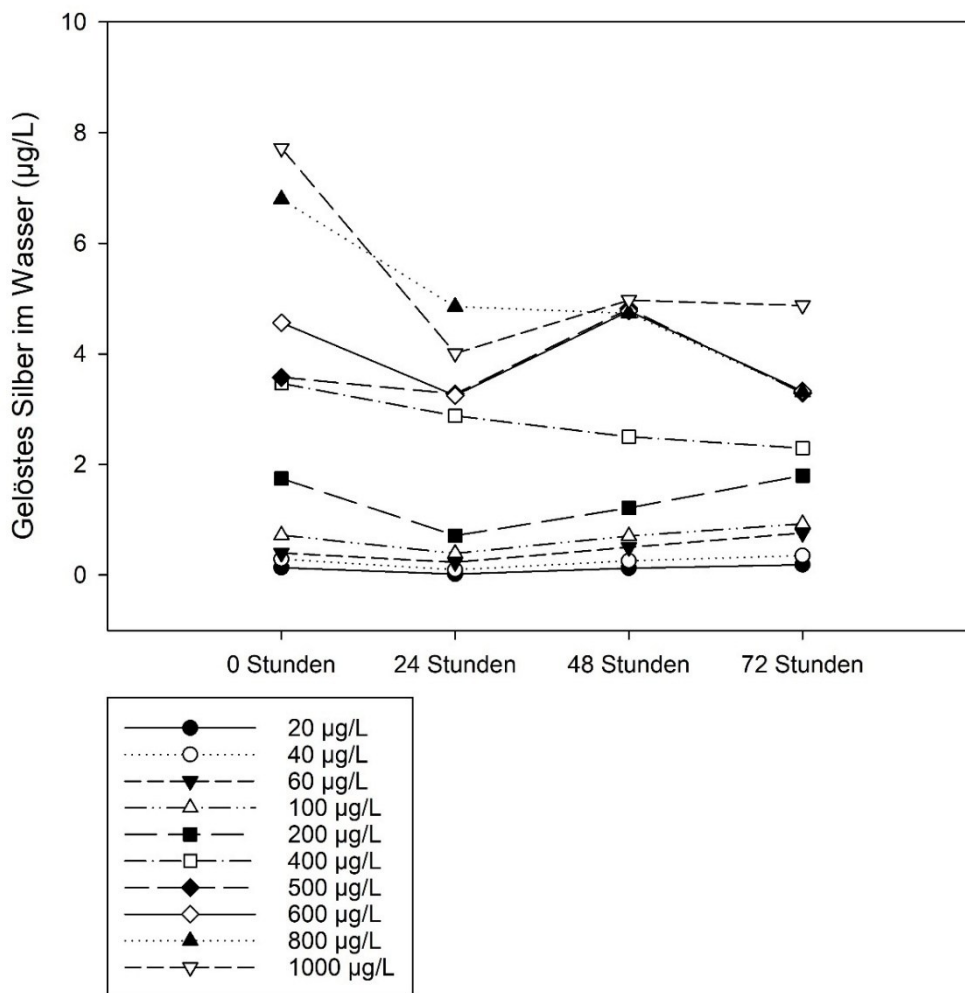


Abbildung 15 Gelöstes Silber im ADW bei den Versuchen mit Ag Nanopowder nach Nominalkonzentration

Tabelle 7 zeigt den Anteil in % des gelösten Silbers am totalen Silber für alle Versuche zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Tabelle 7 Anteil des gelösten Silbers am totalen Silber für die jeweilige Nominalkonzentration und Versuchszeitpunkt

| <b>Ionisches Silber</b> |           |            |            |            |
|-------------------------|-----------|------------|------------|------------|
| Nominal-konzentration   | 0 Stunden | 24 Stunden | 48 Stunden | 72 Stunden |
| 1 µg/L                  | 43,6 %    | 18,9 %     | 8,1 %      | 9,3 %      |
| 3 µg/L                  | 60,4 %    | 25,5 %     | 24,1 %     | 28,3 %     |
| 4 µg/L                  | 46,2 %    | 42,5 %     | 33,6 %     | 34,3 %     |
| 5 µg/L                  | 55,4 %    | 39,3 %     | 18,3 %     | 21,4 %     |
| 8 µg/L                  | 49,4 %    | 18,8 %     | -          | -          |
| <b>Ag Nanospheres</b>   |           |            |            |            |
| Nominal-konzentration   | 0 Stunden | 24 Stunden | 48 Stunden | 72 Stunden |
| 15 µg/L                 | 37,7 %    | 20,1 %     | 26,8 %     | 25,3 %     |
| 20 µg/L                 | 21,1 %    | 3,6 %      | 6,6 %      | 12,7 %     |
| 30 µg/L                 | 38,4 %    | 8,4 %      | 9,0 %      | 13,6 %     |
| 40 µg/L                 | 27,1 %    | 7,3 %      | 8,9 %      | 11,0 %     |
| 50 µg/L                 | 26,1 %    | 6,8 %      | 6,8 %      | 9,9 %      |
| 80 µg/L                 | 21,4 %    | 7,7 %      | 9,1 %      | 10,8 %     |
| 100 µg/L                | 11,5 %    | 8,2 %      | 10,5 %     | 11,8 %     |
| 100 µg/L                | 36,7 %    | 4,3 %      | 6,6 %      | 9,1 %      |
| 150 µg/L                | 23,0 %    | 7,7 %      | 8,1 %      | 8,3 %      |
| 1 mg/L                  | 35,3 %    | 38,5 %     | 23,2 %     | 10,4 %     |
| 10 mg/L                 | 29,6 %    | 16,8 %     | 2,4 %      | 3,8 %      |
| <b>Ag Nanopowder</b>    |           |            |            |            |
| Nominal-konzentration   | 0 Stunden | 24 Stunden | 48 Stunden | 72 Stunden |
| 20 µg/L                 | 0,76 %    | 0,14 %     | 1,10 %     | 1,92 %     |
| 40 µg/L                 | 0,79 %    | 0,43 %     | 1,20 %     | 1,88 %     |
| 60 µg/L                 | 0,68 %    | 0,65 %     | 1,37 %     | 2,40 %     |
| 100 µg/L                | 0,80 %    | 0,68 %     | 1,46 %     | 2,29 %     |
| 200 µg/L                | 0,94 %    | 0,84 %     | 1,30 %     | 1,51 %     |
| 400 µg/L                | 0,90 %    | 0,65 %     | 1,32 %     | 2,15 %     |
| 500 µg/L                | 1,06 %    | 1,37 %     | 1,48 %     | 1,75 %     |
| 600 µg/L                | 0,93 %    | 1,38 %     | 3,39 %     | 2,91 %     |
| 800 µg/L                | 1,10 %    | 1,22 %     | 2,40 %     | 2,77 %     |
| 1 mg/L                  | 1,11 %    | 1,56 %     | 2,13 %     | 2,07 %     |

Bei ionischem Silber und den Nanospheres sinkt der Anteil des gelösten Silbers im Durchschnitt in den ersten 24 Stunden signifikant, danach kommt es zu keinen signifikanten Änderungen mehr. Das Nanopowder dagegen zeigt in den ersten 24 Stunden keine signifikante Änderung, über die Versuchsdauer kommt

es im Mittel aber zu einem signifikanten Anstieg ( $p < 0,001$ ) des Anteils an gelöstem Silber.

Zu beinahe jedem der vier Messzeitpunkte ist der mittlere Anteil des gelösten Silbers für ionisches Silber signifikant höher als der für die Nanospheres und diese wiederum alle signifikant höher als für das Nanopowder. Die einzige Ausnahme bilden die Anteile von ionischem Silber und Nanospheres nach 48 Stunden, die sich nicht signifikant unterscheiden ( $p = 0,117$ ).

## 4.2 Akute Toxizität über 24 Stunden

Zur Bestimmung der akuten Toxizität wurden 4-Parameter sigmoidale Fitkurven verwendet und für alle Silberspezies liegen gute Übereinstimmungen mit den experimentellen Daten vor. Mittels Funktionen aus Sigma Plot wurden aus den erhaltenen Kurven  $LC_{50}$ -Werte zur Beschreibung der akuten Toxizität über eine Dauer von 24 Stunden auf *Neocaridina davidi* berechnet.

Die folgende Abbildung 16 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für ionisches Silber mit einem  $R^2$  von 0,966.  $Ag^+$  wurde dabei in Form des leichtlöslichen Salzes  $AgNO_3$  zugegeben, welches auch in der Literatur die gängige Silberspezies für Toxizitätstests ist.

Die Kurve setzt sich aus elf Einzelwerten zusammen, von denen die rot umrandeten von Haensell (2024) aus derselben Arbeitsgruppe übernommen wurden. Die Nominalkonzentrationen liegen in einem Bereich zwischen 0 und 9  $\mu g/L$ .

Es wurde ein  $LC_{50}$  von 4,3  $\mu g/L$  über 24 Stunden auf *N. davidi* berechnet.

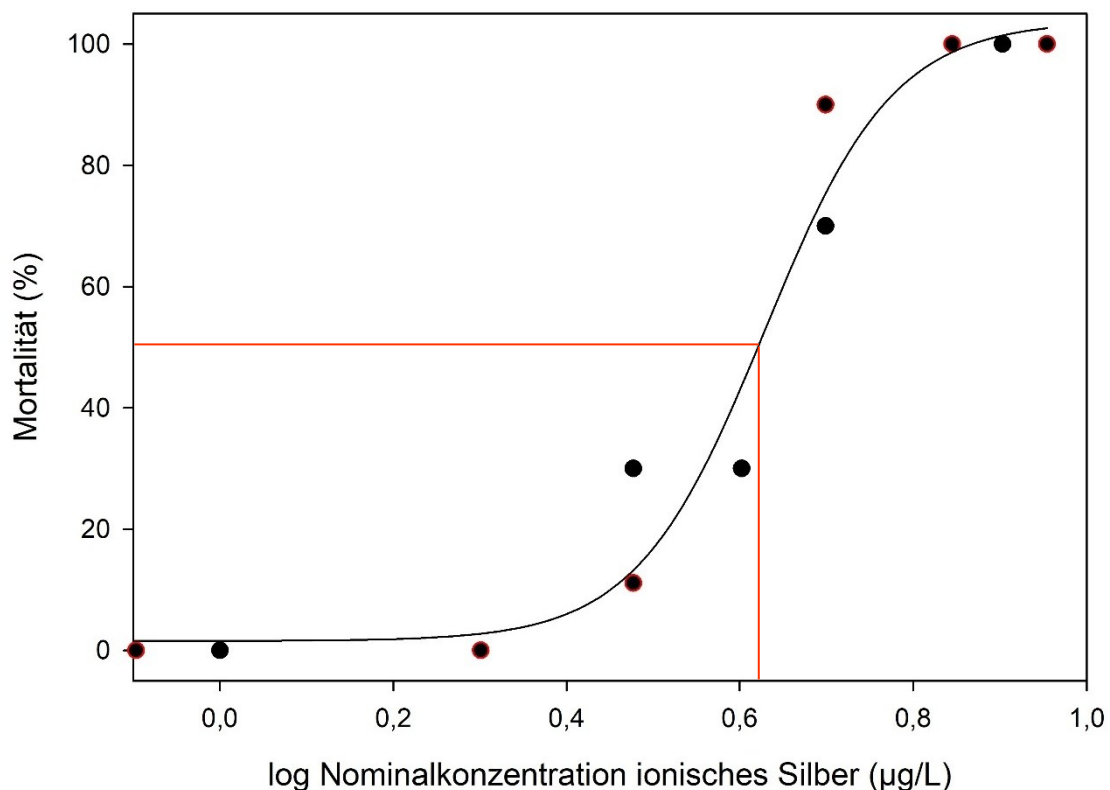


Abbildung 16 Akute Toxizität von ionischem Silber ( $LC_{50}$  4,3  $\mu g/L$ ) über 24 Stunden (n = 11)

Punkte mit roter Umrandung wurden von Haensell (2024) übernommen

Die Datenpunkte zur Bestimmung der Toxizität der Silbernanospheres sind in Abbildung 17 abgebildet. Die Fit-Kurve hat einen  $R^2$ -Wert von 0,914 und setzt sich aus zwölf Einzelwerten über einen Bereich der Nominalkonzentrationen von 0 – 10 mg/L zusammen.

Es wurde ein  $LC_{50}$  von 37,7  $\mu\text{g/L}$  über 24 Stunden auf *N. davidi* berechnet.

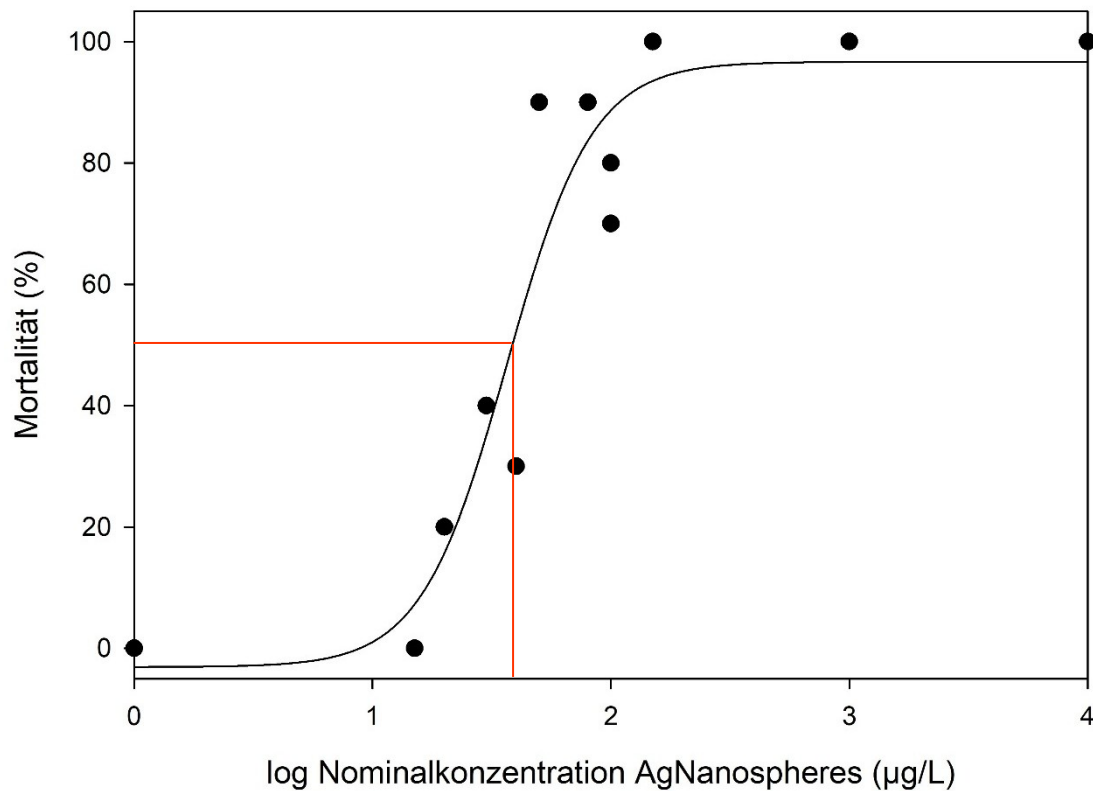


Abbildung 17 Akute Toxizität von Ag Nanospheres ( $LC_{50}$  37,7  $\mu\text{g/L}$ ) über 24 Stunden (n = 12)

In Abbildung 18 ist die Toxizitätskurve für das Silbernanopowder dargestellt. Der  $R^2$ -Wert beträgt 0,983. Für die Fit-Kurve wurden zwölf Datenpunkte verwendet, von denen der Wert für 0  $\mu\text{g/L}$  in der Abbildung nicht gezeigt ist, um die Übersichtlichkeit zu verbessern. Die Werte liegen in einem Nominalkonzentrationsbereich von 0 bis 1000  $\mu\text{g/L}$ .

Es wurde ein  $\text{LC}_{50}$  von 383  $\mu\text{g/L}$  über 24 Stunden auf *N. davidi* berechnet.

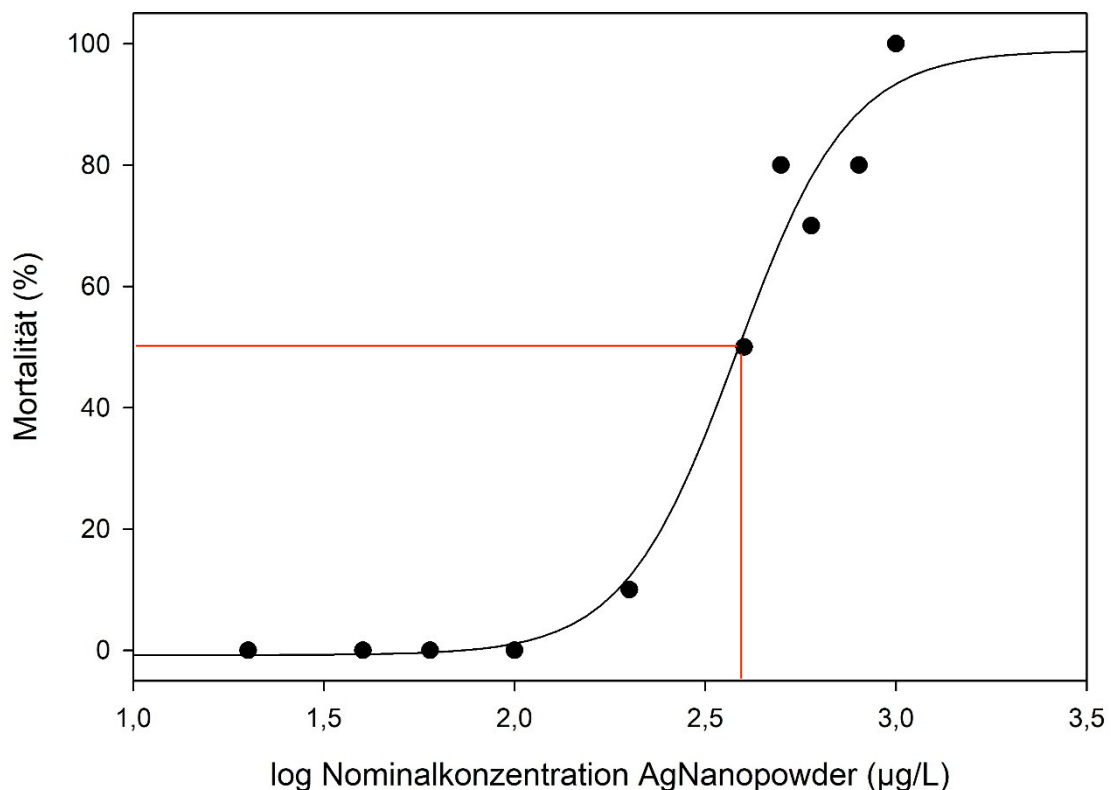


Abbildung 18 Akute Toxizität von Ag Nanopowder ( $\text{LC}_{50}$  383  $\mu\text{g/L}$ ) über 24 Stunden

( $n = 12$ ; aus Darstellungsgründen ist der Bereich der x-Achse ohne den Nullwert gewählt)

### 4.3 Akute Toxizität über 48 und 72 Stunden

Bei dem Versuch mit Ag Nanospheres bei einer Nominalkonzentration von 100  $\mu\text{g/L}$  ist eine Garnele nach 72 Stunden gestorben. Bei den Versuchen mit Ag Nanopowder sind eine Garnele nach 48 Stunden (100  $\mu\text{g/L}$ ) und eine nach 72 Stunden (400  $\mu\text{g/L}$ ) gestorben. Das hat zu keiner Änderung der  $\text{LC}_{50}$  geführt.

## 4.4 Silberakkumulation in den Garnelen

### 4.4.1 Gesamte Akkumulation

Die folgenden drei Abbildungen zeigen das angereicherte Silber in den einzelnen Garnelen nach Aufschluss mit  $\text{HNO}_3$  auf die Trockenmasse (TM) des jeweiligen Versuchstieres bezogen für jede der drei Versuchsreihen. Ergebnisse mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander. Die Datensets wurden auf Ausreißer getestet. Diese sind in den Abbildungen in Rot dargestellt.

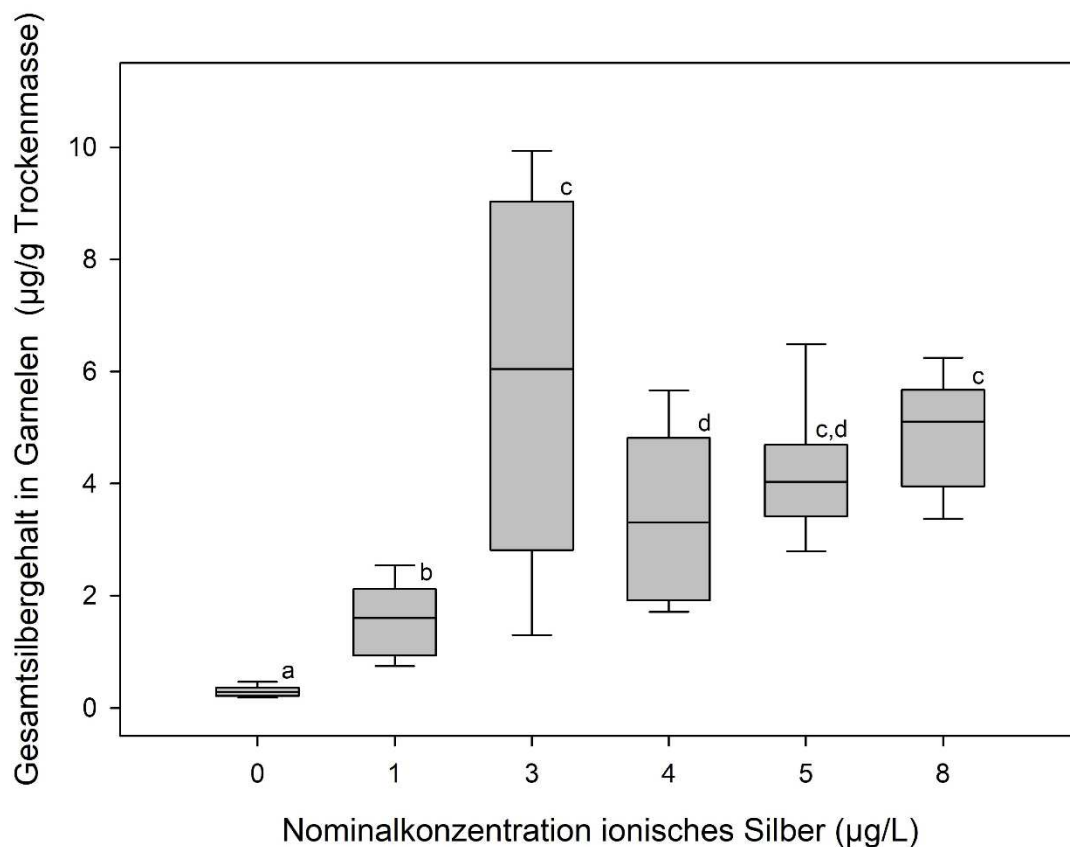


Abbildung 19 Silberakkumulation in den Garnelen in µg/g Trockenmasse während des Versuchs mit ionischem Silber in Abhängigkeit der Nominalkonzentration in den Mesokosmen; n = 10 für alle Konzentrationen

In Abbildung 19 ist das angereicherte Silber nach unterschiedlichen  $\text{Ag}^+$ -Nominalkonzentrationen im Mesokosmos gezeigt. Die Akkumulation der Referenz (Mittelwert 0,294 µg/g TM) und der Nominalkonzentration von 1 µg/L (Mittelwert 1,57 µg/g TM) unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,001$ ) voneinander und sind beide signifikant niedriger als in den höher konzentrierten Mesokosmen. Die Akkumulation bei 3 µg/L ionischem Silber hat den höchsten

Mittelwert von 5,87 µg/g TM und ist signifikant ( $p = 0,0366$ ) höher als die bei einer Nominalkonzentration von 4 µg/L (Mittelwert 3,44 µg/g TM). Die Akkumulation bei 4 µg/L ist nicht signifikant ( $p = 0,215$ ) unterschiedlich zu der bei 5 µg/L (Mittelwert 4,18 µg/g TM), jedoch signifikant niedriger ( $p = 0,0177$ ) als die bei 8 µg/L (Mittelwert 4,87 µg/g TM). Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anreicherungen bei 3 µg/L, 5 µg/L und 8 µg/L.

Die Silberakkumulation für die Nanospheres ist in Abbildung 20 zu sehen. Die Referenzen mit einem Mittelwert von 3,30 µg/g TM angereichertem Silber liegen signifikant (alle  $p \leq 0,001$ ) unter allen anderen Nominalkonzentrationen. Die Anreicherungen bei Nominalkonzentrationen von 15 µg/L (Mittelwert 7,78 µg/g TM), 20 µg/L (Mittelwert 8,26 µg/g TM), 30 µg/L (Mittelwert 7,66 µg/g TM), 40 µg/L (Mittelwert 10,99 µg/g TM), 50 µg/L (Mittelwert 7,59 µg/g TM) und 100 µg/L (Mittelwert 13,0 µg/g TM) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Bei 80 µg/L (Mittelwert 12,4 µg/g TM) gibt es keinen signifikanten Unterschied zu 40 µg/L und 100 µg/L.

Die Silberakkumulationen bei den verbleibenden Nominalkonzentrationen 150 µg/L (Mittelwert 17,9 µg/g TM), 1000 µg/L (Mittelwert 53,5 µg/g TM) und 10 mg/L (Mittelwert 132 µg/g TM) unterscheiden sich signifikant.

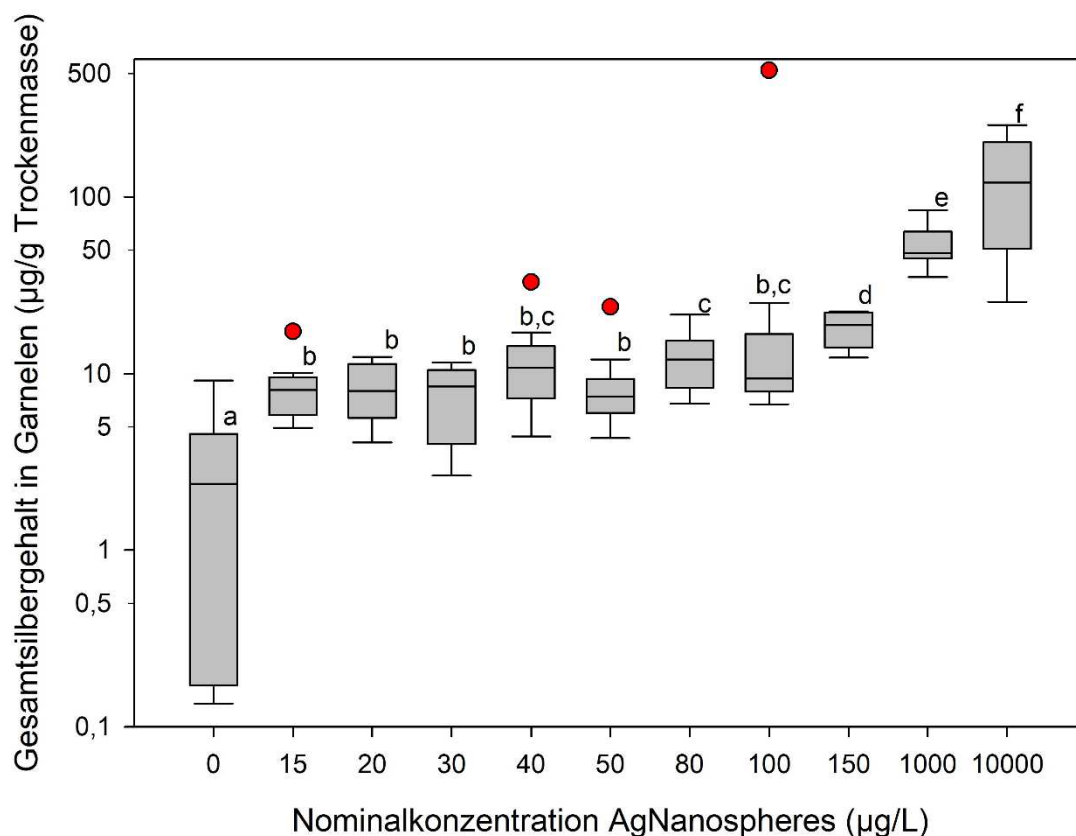


Abbildung 20 Silberakkumulation in den Garnelen in µg/g Trockenmasse während der Versuche mit Silbernanospheres in Abhängigkeit der Nominalkonzentration in den Mesokosmen; n = 30 für 0 µg/L, n = 20 für 100 µg/L, n = 10 für alle weiteren Konzentrationen

Die Silberakkumulation in den Garnelen für Silbernanopowder ist in Abbildung 21 zusammengefasst. Während die Referenz (Mittelwert 1,07 µg/g TM) signifikant (alle  $p < 0,001$ ) unter allen anderen Werten liegt, besteht zwischen den Nominalkonzentrationen 20 µg/L (Mittelwert 2,99 µg/g TM), 40 µg/L (Mittelwert 2,93 µg/g TM) und 60 µg/L (Mittelwert 3,39 µg/g TM) kein signifikanter Unterschied. Die Akkumulationen bei 100 µg/L (Mittelwert 6,38 µg/g TM), 200 µg/L (Mittelwert 15,4 µg/g TM) und 400 µg/L (Mittelwert 56,5 µg/g TM) sind alle signifikant höher als bei allen Mesokosmen mit niedrigerer Nanopowderkonzentration. Die Mittelwerte bei den höheren Nanopowderkonzentrationen variieren, aber nur die Anreicherung bei 600 µg/L (Mittelwert 43,0 µg/g TM) ist signifikant niedriger als jene bei 500 µg/L (Mittelwert 91,4 µg/g TM) und 800 µg/L (Mittelwert 80,5 µg/g TM). Überraschend niedrig liegt die Anreicherung bei der höchsten Nominalkonzentration von 1000 µg/L mit einem Mittelwert von 10,4 µg/g TM. Sie ist signifikant niedriger als bei den geringeren Nominalkonzentrationen 400 µg/L, 500 µg/L, 600 µg/L und 800 µg/L.

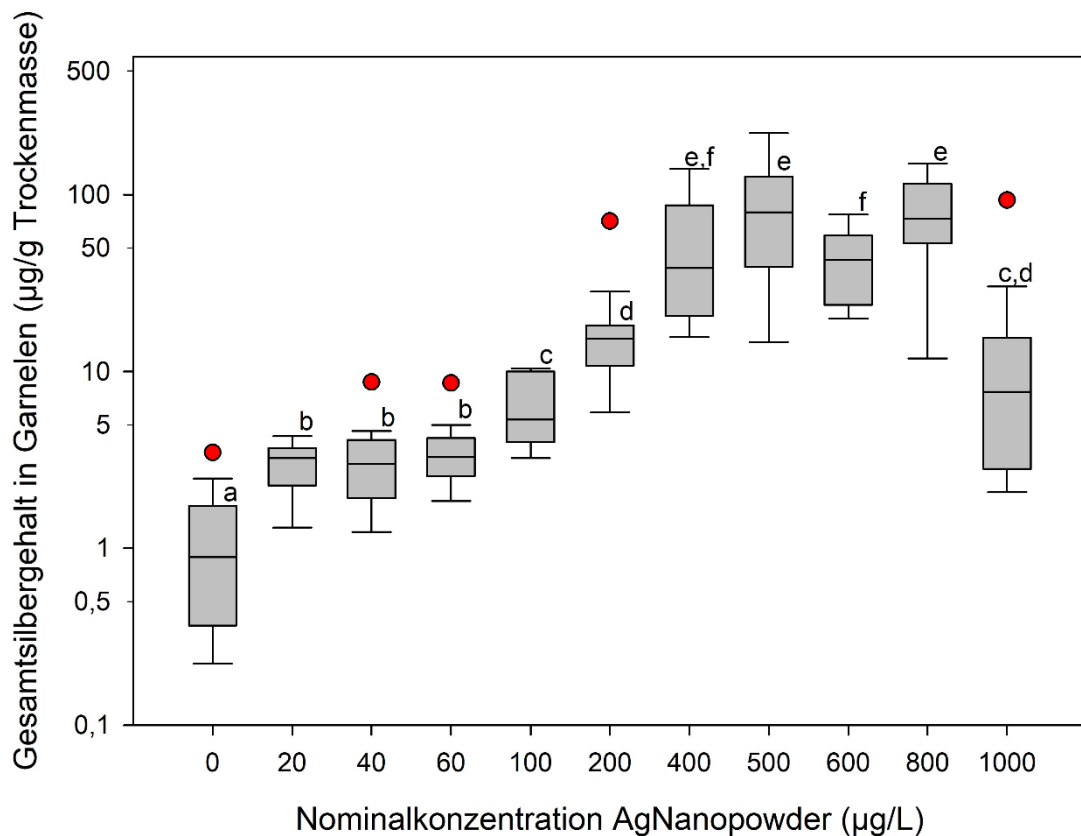


Abbildung 21 Silberakkumulation in den Garnelen in µg/g Trockenmasse während der Versuche mit Silbernanopowder in Abhängigkeit der Nominalkonzentration in den Mesokosmen;  $n = 20$  für 0 µg/L,  $n = 10$  für alle weiteren Konzentrationen

#### 4.4.2 Biokonzentration

Die Akkumulation von Silber in den Versuchstieren kann auch anhand des Biokonzentrationsfaktors (bioconcentration factor, BCF) beschrieben werden, der die angereicherte Menge relativ zur mittleren Anreicherung der Referenzen betrachtet. In Tabelle 8 wurden die BCF nach der Expositionsdauer zum Silber oder den Silbernanopartikeln aufgeteilt. Als Expositionsdauer wurde die Lebenszeit eines Versuchstieres im Mesokosmos in ganzen Tagen festgelegt.

Tabelle 8 Mittlere Biokonzentrationsfaktoren für alle Konzentrationen nach Expositionsdauer. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind hervorgehoben \*Statistik nicht möglich, da in einer Gruppe nur ein Wert vorliegt

<sup>1</sup>eine Garnele nach 48 Stunden verstorben <sup>2</sup>eine Garnele nach 72 Stunden verstorben

| <b>Ionisches Silber</b> |                         |                          |              |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------|
|                         | Exposition < 24 Stunden | Exposition > 24 Stunden  | p-Wert       |
| 1 µg/L                  | -                       | 5,33 ± 2,28              | -            |
| 3 µg/L                  | 7,20 ± 3,13             | 25,4 ± 6,70              | <b>0,002</b> |
| 4 µg/L                  | 10,2 ± 3,92             | 12,3 ± 5,37              | 0,556        |
| 5 µg/L                  | 13,6 ± 2,28             | 15,7 ± 6,62              | 0,448        |
| 8 µg/L                  | 16,5 ± 3,25             | -                        | -            |
| <b>Ag Nanospheres</b>   |                         |                          |              |
|                         | Exposition < 24 Stunden | Exposition > 24 Stunden  | p-Wert       |
| 15 µg/L                 | -                       | 2,36 ± 0,59              | -            |
| 20 µg/L                 | 1,27 ± 0,07             | 2,81 ± 0,75              | <b>0,025</b> |
| 30 µg/L                 | 1,39 ± 0,73             | 2,94 ± 0,52              | <b>0,004</b> |
| 40 µg/L                 | 1,91 ± 0,74             | 4,04 ± 0,79              | <b>0,006</b> |
| 50 µg/L                 | 2,30 ± 0,72             | -                        | -            |
| 80 µg/L                 | 3,54 ± 1,38             | 5,74*                    | *            |
| 100 µg/L                | 3,47 ± 2,08             | 5,62 ± 2,42 <sup>2</sup> | 0,110        |
| 150 µg/L                | 5,41 ± 1,19             | -                        | -            |
| 1 mg/L                  | 16,2 ± 4,6              | -                        | -            |
| 10 mg/L                 | 40,1 ± 25,1             | -                        | -            |
| <b>Ag Nanopowder</b>    |                         |                          |              |
|                         | Exposition < 24 Stunden | Exposition > 24 Stunden  | p-Wert       |
| 20 µg/L                 | -                       | 2,80 ± 0,90              | -            |
| 40 µg/L                 | -                       | 2,74 ± 1,11              | -            |
| 60 µg/L                 | -                       | 3,17 ± 0,96              | -            |
| 100 µg/L                | -                       | 5,97 ± 2,62 <sup>1</sup> | -            |
| 200 µg/L                | 26,5*                   | 12,9 ± 4,1               | *            |
| 400 µg/L                | 83,9 ± 36,1             | 21,8 ± 6,4 <sup>2</sup>  | <b>0,005</b> |
| 500 µg/L                | 102,6 ± 55,5            | 17,0 ± 5,7               | 0,070        |
| 600 µg/L                | 48,4 ± 15,0             | 20,9 ± 2,3               | <b>0,016</b> |
| 800 µg/L                | 86,4 ± 35,3             | 30,7 ± 33,7              | 0,079        |
| 1 mg/L                  | 9,69 ± 8,50             | -                        | -            |

Bei den Versuchen mit ionischem Silber und Nanospheres steigen die BCF für die Versuchstiere, die innerhalb des ersten Tages verstorben sind, mit steigender Silberkonzentration im Mesokosmos an. Beim Nanopowder ist das nicht der Fall. Dafür steigt die Akkumulation bei den länger exponierten Garnelen proportional zur Nominalkonzentration.

Die Differenz der BCF für Expositionen von < 24 Stunden und > 24 Stunden unterscheiden sich für die beiden Nanopartikel. Für ionisches Silber und Nanospheres sind die mittleren BCF für alle < 24 Stunden kleiner als die für > 24 Stunden. Beim ionischen Silber ist allerdings nur ein Unterschied signifikant, bei den Nanospheres sind es drei von vier. Für das Nanopowder sind alle BCF für < 24 Stunden größer als jene für > 24 Stunden, zwei davon sind signifikant.

Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen dem Biokonzentrationsfaktor und dem Gewicht der Garnelen.

Es konnte während dem Aufschluss nicht unterschieden werden, ob das gemessene Silber tatsächlich von den Garnelen aufgenommen wurde oder nur von außen an den Körper adsorbiert hat.

## 5 Diskussion

### 5.1 Toxizität und Löslichkeitsverhalten

Da nach 24 Stunden keine relevanten Änderungen hinsichtlich der Mortalität mehr festgestellt werden konnten, wird im Folgenden ausschließlich die Toxizität über 24 Stunden betrachtet. Um den  $LC_{50}$  für ionisches Silber in Form von  $AgNO_3$  über 24 Stunden zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit bereits vorhandene Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Haensell (2024) um weitere Datenpunkte ergänzt, die vor allem den Bereich zwischen 10 % und 90 % Mortalität genauer darstellen. Der neu berechnete  $LC_{50}$ -Wert von  $4,3 \mu g/L$  stimmt gut mit dem alten Wert von  $3,84 \mu g/L$  überein. Dieser Wert liegt auch im Bereich der Literaturwerte von  $0,69 - 5,7 \mu g/L$  für andere Krebstiere aus Tabelle 1.

Für diese Arbeit wird in der Auswertung nur der  $LC_{50}$  über 24 Stunden betrachtet, da es bei längerer Versuchsdauer keine signifikanten Änderungen gab. Interessanterweise sind die Ergebnisse in der Literatur in dieser Hinsicht gespalten. Zum einen kommt es wie im Falle dieser Arbeit dazu, dass sich die  $LC_{50}$ -Werte über 24 und 48 Stunden nicht oder nur gering unterscheiden (Lima et al., 1982), während die Mortalität bei verlängerter Versuchsdauer in anderen Fällen eindeutig höher war (Ulm et al., 2015). Bei Lekamge et al. (2018) zeigen sich beide Effekte bei unterschiedlichen Versuchstieren, wobei die mit *N. davidi* näher verwandte Spezies *Paratya australiensis* das gegenteilige Verhalten zeigt.

Für beide untersuchte Nanopartikel war der 24 Stunden- $LC_{50}$  höher als der für ionisches Silber und damit die Toxizität geringer. Im Fall der Nanospheres unterschied er sich etwa um den Faktor 10, für das Nanopowder um den Faktor 100. Damit zeigt sich, dass für die akute Toxizität das Vorhandensein von gelösten Silberspezies ausschlaggebend ist. Wie die Ergebnisse mit ionischem Silber zeigen, hat dieses eine starke toxische Wirkung. Zusätzliche schädliche Auswirkungen durch AgNP die laut Definition gelöst vorliegen, wie von Poynton et al. (2012) beschrieben, können nicht ausgeschlossen werden. Diese Vermutung wird auch durch die Übereinstimmung mit dem Anteil an

gelöstem Silber bestätigt. Bei den Nanospheres lagen nach 24 Stunden im Mittel 10,4 % der Nominalkonzentration gelöst vor (vergleiche Abbildung 13), beim Nanopowder waren es nur 0,53 % (vergleiche Abbildung 15). Diese Beobachtung lässt sich mit den unterschiedlichen Coatings der Nanopartikel begründen. Das ungecoatete Nanopowder agglomeriert und verringert seine Oberfläche stark. Dadurch werden nicht so viele Silberionen in das Medium abgegeben. Im Gegensatz dazu haben die Nanospheres ein PVP-Coating, das eine Agglomeration der einzelnen NP verhindert. Da die NP somit einzeln vorliegen, haben sie in Summe eine deutlich größere Oberfläche und es werden mehr Silberionen ins Wasser abgegeben. Wie in Tabelle 7 ersichtlich, sinkt der relative Anteil des gelösten Silbers für den jeweiligen Tag für die Nanospheres über den Versuchsablauf, während der Anteil für das Nanopowder jeden Tag annähernd konstant bleibt. Allerdings sinkt die Konzentration an totalem Silber für das Nanopowder viel stärker als für die Nanospheres. Dies ist einfach dadurch zu erklären, dass das Nanopowder über die Zeit agglomeriert und sich am Boden absetzt. Dadurch ist es auch in den ungefilterten Wasserproben nicht mehr vorhanden.

Durch die Agglomeration setzt sich das Nanopowder in größeren Ansammlungen am Boden ab, während die Nanospheres eher in Lösung bleiben. Aufgrund der benthischen Lebensweise der Garnelen könnte das Absinken des Nanopowders eine erhöhte Exposition bedeuten. Allerdings hat sich das bei den Versuchen nicht merklich auf die Toxizität ausgewirkt.

Der Hauptgrund dafür, dass sich die  $LC_{50}$  nach 24 Stunden nicht mehr signifikant verändert haben, ist die deutlich gesunkene Konzentration an gelöstem Silber im Medium sowohl für beide NP als auch das ionische Silber. Dieses wurde durch die vorhandenen Huminstoffe komplexiert und war damit nicht mehr bioverfügbar. Diese Komplexierung wird auch oft in der Literatur beschrieben (Hogstrand & Wood, 1998; Ratte, 1999; Walters et al., 2014; Wood, 2011). Es kommt ebenfalls zur Ausbildung von Chlorokomplexen mit gelöstem Silber, woraufhin dieses ebenfalls nicht mehr bioverfügbar ist.

Da die Zusammensetzung des Versuchsmediums sich allerdings an gemessenen Werten der Donau orientiert und es sich somit um realitätsnahe

Bedingungen handelt, ist dieses Verhalten auch in der Natur zu erwarten. Hogstrand & Wood (1998) schätzten, dass in Süßwasser weniger als 40 % des gelösten Silbers bioverfügbar ist. Weitere Ergebnisse legen nahe, dass unter anderem reduzierte Schwefelgruppen in gelöstem organischem Material Silberionen bei Sonnenlichteinstrahlung zu NP-ähnlichen Kolloiden reduzieren können (Chen et al., 2012).

Auch die totalen Silberkonzentrationen haben über die Versuche abgenommen. Der Rückgang des totalen Silbers in den Mesokosmen kann nicht mit einer Aufnahme durch die Garnelen erklärt werden, da es sich hierbei nur um einen Bruchteil dieser Menge handelt. Eine mögliche Erklärung ist die Adsorption an die Wände der Mesokosmen, die zumindest bei den höchsten Konzentrationen ( $\geq 1$  mg/L) als dunkelbraune Ablagerungen sichtbar war. Da bei diesen Versuchen kein Sediment vorhanden war und analysiert wurde, können auch keine Aussagen über mögliches ausgefallenes Silber getroffen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Silberionen nicht nur komplexiert werden und an Partikel binden, sondern auch an viele weitere Oberflächen. Es handelt sich nicht um eine sprunghafte Abnahme, sondern die Konzentration an totalem Silber sinkt über den Verlauf einiger Stunden. Demnach ist zu erwarten, dass der fehlende Teil des absoluten Silbers an die Mesokosmenoberfläche, den Stein und die Luftzufuhr adsorbiert hat (Wood, 2011). Eine ähnliche Abnahme des totalen Silbers in den Versuchsmedien haben auch Unrine et al. (2012) beobachtet, wobei es hier zu viel größeren Abnahmen von bis zu 75 % der Nominalkonzentration gekommen ist.

## 5.2 Silberakkumulation

Die Silberakkumulation in den Versuchstieren zeigt bei allen Versuchen den zu erwartenden Trend, dass eine höhere Silber- oder AgNP-Konzentration zu einer erhöhten Akkumulation führt. Dennoch gibt es für jede der drei Substanzen Abweichungen von diesem Trend, wie die Konzentrationen 3 µg/L ionisches Silber (siehe Abbildung 19) oder 600 µg/L und 1000 µg/L Nanopowder (siehe Abbildung 21). Diese Ergebnisse liegen nicht daran, dass für eben diese Konzentrationen durch Zufall Garnelen mit einer stark unter- oder überdurchschnittlichen Masse verwendet wurden. Zusätzlich stimmt die Mortalität der Versuchstiere aus diesen Mesokosmen gut mit der LC<sub>50</sub>-Kurve und damit den anderen Ergebnissen überein. Nur die unerwartet niedrige Anreicherung bei 1000 µg/L Nanopowder lässt sich vermutlich damit erklären, dass nur bei dieser Konzentration alle Garnelen innerhalb der ersten 24 Stunden verstorben sind. Auffällig war, dass viele davon schon innerhalb der ersten Stunden gestorben sind, was aber nicht detailliert aufgezeichnet wurde. Bedingt durch diese vergleichsweise kürzere Überlebenszeit im Mesokosmos hatten die Garnelen eine deutlich kürzere Expositionszeit, was ein Grund für die geringe Akkumulation sein kann.

Bei den Biokonzentrationsfaktoren kann man zwei verschiedene Trends feststellen (siehe Tabelle 8). Für das ionische Silber und die Nanospheres steigen die BCF mit der eingesetzten Konzentration und der Expositionsdauer. Diese Übereinstimmung mit den Ergebnissen für ionisches Silber legt nahe, dass die Nanospheres Silberionen ins Wasser abgeben, die dann von den Garnelen aufgenommen werden. Dieser Prozess wird durch das PVP-Coating der Nanospheres begünstigt, durch welches sie nicht agglomerieren und gut in Lösung bleiben. Das Nanopowder, das kein Coating hat und deswegen agglomeriert und sich absetzt, zeigt ein anderes Verhalten. Zusätzlich könnten auch gelöste Nanopartikel selbst von den Garnelen aufgenommen worden sein. Dieses Verhalten ist auch eher von den gecoateten und damit stabileren Nanospheres als dem ungecoatetem Nanopowder zu erwarten. Hier haben die Garnelen mit längerer Exposition keine höheren BCF, sondern das Gegenteil ist der Fall. Alle mittleren BCF für eine Exposition < 24 Stunden sind höher als die für > 24 Stunden (nur zwei von vier signifikant höher, allerdings liegen die p-

Werte für die anderen bei 0,070 und 0,079). Das zeigt, dass das Nanopowder agglomeriert und durch die kleinere Oberfläche keine relevanten Mengen an Silberionen ins Wasser abgibt. Dafür erkennt man, dass die Mortalität vom BCF abhängt, denn ein Wert über etwa 30 scheint tödlich zu sein. Der höchste Mittelwert für die überlebenden Garnelen beträgt 30,7 und der niedrigste für die innerhalb eines Tages verstorbenen beträgt 26,5. Eine Ausnahme stellt die höchste Konzentration von 1 mg/L dar, für die aber bereits zuvor die sehr kurze Expositionsdauer diskutiert wurde.

Somit ist anzunehmen, dass eine Aufnahme der Nanopowderpartikel über einen BCF von 30 zum Tod führt, wobei nach 24 Stunden allerdings nicht mehr genug NP im Medium vorhanden sind, um dieses Level noch zu erreichen. Das stimmt auch mit den gemessenen Silberkonzentrationen für das Nanopowder überein. Für ionisches Silber und Silbernanospheres ist kein direkter Zusammenhang zwischen den BCF und der Mortalität erkennbar.

## 6 Conclusio

Diese Arbeit zeigt, dass neben der bereits bekannten hohen Toxizität von ionischem Silber auf aquatische Lebewesen auch schon Silbernanopartikel in Konzentrationen im  $\mu\text{g/L}$ -Bereich für Garnelen toxisch sind. Die Toxizität hängt von der Konzentration an gelösten Silberspezies ab, die sich aus Silberionen, die von den NP ins Medium freigesetzt werden, und gelösten Nanopartikeln selbst ab. Das ist beides wiederum auch vom Löslichkeitsverhalten der Partikel abhängig, welches durch ihr Coating bestimmt wird. Diese funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche verhindern durch sterische oder elektrostatische Abstoßung eine Agglomeration der einzelnen NP und die dadurch höhere Gesamtoberfläche begünstigt eine Abgabe von Silberionen ins Medium. Aus diesem Grund kann die Toxizität von AgNP nicht allgemein betrachtet werden. In dieser Arbeit wurde ein  $\text{LC}_{50}$ -Wert für *N. davidi* über 24 Stunden von  $4,3 \mu\text{g/L}$  für ionisches Silber ermittelt. Den oben genannten Bedingungen zur Silberionenfreisetzung folgend liegen die  $\text{LC}_{50}$ -Werte für die Nanospheres mit Coating bei  $37,7 \mu\text{g/L}$  und für das Nanopowder ohne Coating bei  $383 \mu\text{g/L}$ . Diese Konzentrationen liegen um den Faktor  $10^2 - 10^3$  über umweltanalytischen Messungen von natürlichen Gewässern, können in Einzelfällen aber durchaus erreicht oder überschritten werden.

Für ionisches Silber und Silbernanospheres zeigt sich der Trend, dass die mittleren Biokonzentrationsfaktoren mit der Versuchsdauer ansteigen, wobei es nicht immer zu einem signifikanten Anstieg kommt. Das könnte bedeuten, dass die Toxizität nicht direkt mit der Biokonzentration zusammenhängt. Beim Silbernanopowder ist dieser Trend erkennbar. Hier liegen die mittleren BCF bei den Garnelen, die innerhalb von 24 Stunden gestorben sind, über denen mit längerer Exposition, aber nicht alle davon signifikant. Das zeigt, dass BCF von  $> 30$  tödlich für die Garnelen sind, aber nicht mit der Versuchsdauer ansteigen. Die Konzentration an gelöstem Silber in den Mesokosmen ist in allen drei Testsubstanzen über die Versuchsdauer gesunken, besonders stark in den ersten 24 Stunden.  $\text{Ag}^+$  wird dabei durch Anionen und besonders Huminstoffe komplexiert und ist nicht mehr bioverfügbar. Das scheint die Erklärung zu sein, wieso eine verlängerte Exposition zu keinen signifikanten Veränderungen

hinsichtlich der Mortalität geführt hat. Nur bei den niedrigsten Nanopowderkonzentrationen bleibt das gelöste Silber annähernd stabil.

## 7 Literaturverzeichnis

- Allehyani, E. S. (2022). Surface Functionalization of Polyester Textiles for Antibacterial and Antioxidant Properties. *Polymers*, 14(24). <https://doi.org/10.3390/polym14245512>
- Ameh, T., Zarzosa, K., Braswell, W. E., & Sayes, C. M. (2023). Nanoparticle surface coatings produce distinct antibacterial effects that are consistent across diverse bacterial species. *Frontiers in Toxicology*, 5. <https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1119547>
- An, H. J., Sarkheil, M., Park, H. S., Yu, I. J., & Johari, S. A. (2019). Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 218, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.01.002>
- Asghari, S., Johari, S. A., Lee, J. H., Kim, Y. S., Jeon, Y. B., Choi, H. J., Moon, M. C., & Yu, I. J. (2012). Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *Journal of Nanobiotechnology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-14>
- Bai, Q., Li, Q., Zheng, R., Yu, S., Hao, Z., Liu, J., & Cai, Y. (2025). Speciation, Distribution and Environmental Risk of Dominant Silver-Containing Nanoparticles in the Taihu Lake, China. *Environmental Pollution*, 125726. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.125726>
- Bai, Y. Y., Yang, Y. J., Xu, Y., Yang, X. Y., & Zhang, Z. L. (2023). Current Lifetime of Single-Nanoparticle Electrochemical Collision for In Situ Monitoring Nanoparticles Agglomeration and Aggregation. *Analytical Chemistry*, 95(9), 4429–4434. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c05016>
- Bastianini, F., Hidalgo, A. I. C., Hook, D. Z., Smith, J. A., Cumming, D., & Dunbar, A. (2024). Using Ag nanoparticles in the electron transport layer of perovskite solar cells to improve efficiency. *Solar Energy*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2024.112318>
- Becaro, A. A., Jonsson, C. M., Puti, F. C., Siqueira, M. C., Mattoso, L. H. C., Correa, D. S., & Ferreira, M. D. (2015). Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. *Environmental*

- Nanotechnology, Monitoring and Management*, 3, 22–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2014.11.002>
- Blinova, I., Niskanen, J., Kajankari, P., Kanarbik, L., Käkkinen, A., Tenhu, H., Penttinen, O. P., & Kahru, A. (2013). Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 3456–3463. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1290-5>
- Bury, N. R., Shaw, J., Glover, C., & Hogstrand, C. (2002). Derivation of a toxicity-based model to predict how water chemistry influences silver toxicity to invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 133, 259–270. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00096-0)
- Camacho-Jiménez, L., Álvarez-Sánchez, A. R., & Mejía-Ruiz, C. H. (2020). Silver nanoparticles (AgNPs) as antimicrobials in marine shrimp farming: A review. In *Aquaculture Reports* (Vol. 18). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100512>
- Cartwright, A., Jackson, K., Morgan, C., Anderson, A., & Britt, D. W. (2020). A review of metal and metal-oxide nanoparticle coating technologies to inhibit agglomeration and increase bioactivity for agricultural applications. *Agronomy*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/agronomy10071018>
- Chávez-Hernández, J. A., Velarde-Salcedo, A. J., Navarro-Tovar, G., & Gonzalez, C. (2024). Safe nanomaterials: from their use, application, and disposal to regulations. *Nanoscale Advances*, 6(6), 1583–1610. <https://doi.org/10.1039/d3na01097j>
- Chen, Z., Campbell, P. G. C., & Fortin, C. (2012). Silver Binding by Humic Acid as Determined by Equilibrium Ion-Exchange and Dialysis. *The Journal of Physical Chemistry A*, 116(25), 6532–6539. <https://doi.org/10.1021/jp212403r>
- Danielsson, L. G. (1982). On the use of filters for distinguishing between dissolved and particulate fractions in natural waters. *Water Research*, 16(2), 179–182. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90108-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90108-7)
- Dyrssen, D. (1988). Sulfide complexation in surface seawater. *Marine Chemistry*, 24(2), 143–153. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(88\)90045-X](https://doi.org/10.1016/0304-4203(88)90045-X)

- Eiser, M. (2023). *Silver Nanoparticles in the Aquatic Environment-Assessing Uptake and Accumulation in the Aquatic Macrophyte Myriophyllum spicatum under Environmentally Relevant Conditions* [Masterarbeit]. Universität Wien.
- Englund, R. A., & Cai, Y. (1999). The occurrence and description of *Neocaridina denticulata sinensis* (Kemp, 1918) (Crustacea: Decapoda: Atyidae), a new introduction to the Hawaiian Islands. *BISHOP MUSEUM OCCASIONAL PAPERS*, 58.
- Estephan, Z. G., Schlenoff, P. S., & Schlenoff, J. B. (2011). Zwitteration as an alternative to PEGylation. *Langmuir*, 27(11), 6794–6800. <https://doi.org/10.1021/la200227b>
- EUON. (2021). *NanoData*. European Observatory for Nanomaterials. <https://euon.echa.europa.eu/nanodata/sectors/manufacturing/overview/market>
- EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION. (2002). *Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC*.
- Fabrega, J., Luoma, S. N., Tyler, C. R., Galloway, T. S., & Lead, J. R. (2011). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37(2), 517–531. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.012>
- Farré, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., & Barceló, D. (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1), 81–95. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2458-1>
- Frank, L. A., Onzi, G. R., Morawski, A. S., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., & Contri, R. V. (2020). Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. *Reactive and Functional Polymers*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104459>
- Funck, J. A., Danger, M., Gismondi, E., Cossu-Leguille, C., Guérold, F., & Felten, V. (2013). Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. *Aquatic Toxicology*, 142–143, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.07.012>

- Gambardella, C., Costa, E., Piazza, V., Fabbrocini, A., Magi, E., Faimali, M., & Garaventa, F. (2015). Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research*, 111, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.001>
- Garcia-Reyero, N., Kennedy, A. J., Escalon, B. L., Habib, T., Laird, J. G., Rawat, A., Wiseman, S., Hecker, M., Denslow, N., Steevens, J. A., & Perkins, E. J. (2014). Differential Effects and Potential Adverse Outcomes of Ionic Silver and Silver Nanoparticles in Vivo and in Vitro. *Environmental Science & Technology*, 48(8), 4546–4555. <https://doi.org/10.1021/es4042258>
- Giese, B., Klaessig, F., Park, B., Kaegi, R., Steinfeldt, M., Wigger, H., Von Gleich, A., & Gottschalk, F. (2018). Risks, Release and Concentrations of Engineered Nanomaterial in the Environment. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19275-4>
- 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), 1972–1978. <https://doi.org/10.1897/08-002.1>
- Hadrup, N., Sharma, A. K., & Loeschner, K. (2018). Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 98, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.08.007>
- Haensell, N. W. (2024). *Akute Toxizität von Silberionen gegenüber der Süßwassergarnele Neocaridina davidi* [Bachelorarbeit]. Universität Wien.
- Hashimoto, Y., Takeuchi, S., Mitsunobu, S., & Ok, Y.-S. (2017). Chemical speciation of silver (Ag) in soils under aerobic and anaerobic conditions: Ag nanoparticles vs. ionic Ag. *Journal of Hazardous Materials*, 322, 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.001>
- Hirsch, M. P. (1998). Toxicity of silver sulfide-spiked sediments to the freshwater amphipod (*Hyalella azteca*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(4), 601–604. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170411>
- Hogstrand, C., & Wood, C. M. (1998). Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: Implications for water

- quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(4), 547–561.  
<https://doi.org/10.1002/etc.5620170405>
- Hoheisel, S. M., Diamond, S., & Mount, D. (2012). Comparison of nanosilver and ionic silver toxicity in *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(11), 2557–2563.  
<https://doi.org/10.1002/etc.1978>
- Hou, W. C., Stuart, B., Howes, R., & Zepp, R. G. (2013). Sunlight-driven reduction of silver ions by natural organic matter: Formation and transformation of silver nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 47(14), 7713–7721. <https://doi.org/10.1021/es400802w>
- Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Käkinen, A., Titma, T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V., & Kahru, A. (2014). Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS ONE*, 9(7).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102108>
- Jabłońska, A., Mamos, T., Gruszka, P., Szlauer-Łukaszewska, A., & Grabowski, M. (2018). First record and DNA barcodes of the aquarium shrimp, *Neocaridina davidi*, in Central Europe from thermally polluted River Oder canal, Poland. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 2018-January(419). <https://doi.org/10.1051/kmae/2018004>
- Kätelhön, E., Sokolov, S. V., Bartlett, T. R., & Compton, R. G. (2017). The Role of Entropy in Nanoparticle Agglomeration. *ChemPhysChem*, 18(1), 51–54.  
<https://doi.org/10.1002/cphc.201601130>
- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., & Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(6). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
- Kennedy, A. J., Chappell, M. A., Bednar, A. J., Ryan, A. C., Laird, J. G., Stanley, J. K., & Steevens, J. A. (2012). Impact of organic carbon on the stability and toxicity of fresh and stored silver nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 46(19), 10772–10780.  
<https://doi.org/10.1021/es302322y>
- Kim, K. M., Kim, H. M., Lee, W. J., Lee, C. W., Kim, T. Il, Lee, J. K., Jeong, J., Paek, S. M., & Oh, J. M. (2014). Surface treatment of silica nanoparticles

- for stable and charge-controlled colloidal silica. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 29–40. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57922>
- Lee, I., Morales, R., Albiter, M. A., & Zaera, F. (2008). Synthesis of heterogeneous catalysts with well shaped platinum particles to control reaction selectivity. *PNAS*, 105(40), 15241–15246. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805691105>
- Lee, J. W., Shim, I., & Park, K. (2024). Proposing Effective Ecotoxicity Test Species for Chemical Safety Assessment in East Asia: A Review. In *Toxics* (Vol. 12, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/toxics12010030>
- Lekamge, S. (2019). *Toxicity of silver nanoparticles to selected Australian freshwater biota: influences of coating and age of nanoparticles* [Doktorarbeit]. RMIT University.
- Lekamge, S., Miranda, A. F., Abraham, A., Li, V., Shukla, R., Bansal, V., & Nuggeoda, D. (2018). The toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) to three freshwater invertebrates with different life strategies: *Hydra vulgaris*, *Daphnia carinata*, and *Paratya australiensis*. *Frontiers in Environmental Science*, 6(DEC). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00152>
- Levitt-Barmats, Y., Yanai, Z., Cohen, T. M., & Shenkar, N. (2019). Life-history traits and ecological characteristics of the ornamental shrimp *Neocaridina denticulata* (De Haan, 1844), recently introduced into the freshwater systems of Israel. *Aquatic Invasions*, 14(4), 684–702. <https://doi.org/10.3391/ai.2019.14.4.08>
- Lima, A. R., Curtis, C., Hammermeister, D. E., Call, D. J., & Felhaber, T. A. (1982). Acute Toxicity of Silver to Selected Fish and Invertebrates. *Bull. Environm. Contain. Toxicol*, 29, 184–189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/bf01606148>
- MA 39 - Labors für Hygiene. (2022). *Wichtige Wasserinhaltsstoffe*. Stadt Wien - Wiener Wasser, 1060 Wien.
- Ma, D., Zhang, L., Hu, J., Fu, Z., Luo, T., Yang, D., Fang, D., Li, J., Peng, J., & Wang, Y. (2022). Preparation and gas-sensitive properties of hollow Zn<sub>2</sub>SnO<sub>4</sub>/SnO<sub>2</sub> nano-cubes. *Inorganic Chemistry Communications*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109507>

- Martin, T. R., & Holdich, D. M. (1986). The acute lethal toxicity of heavy metals to peracarid crustaceans (with particular reference to fresh-water asellids and gammarids). *Wat. Res.*, 20(9), 1137–1147. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(86\)90060-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90060-6)
- McGillicuddy, E., Murray, I., Kavanagh, S., Morrison, L., Fogarty, A., Cormican, M., Dockery, P., Prendergast, M., Rowan, N., & Morris, D. (2017). Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment*, 575, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>
- Mykles, D. L., & Hui, J. H. L. (2015). *Neocaridina denticulata*: A decapod crustacean model for functional genomics. *Integrative and Comparative Biology*, 55(5), 891–897. <https://doi.org/10.1093/icb/icv050>
- nanoComposix. (2024). *Useful Terminology*. <https://nanocomposix.com/pages/useful-terminology>
- Nanotechnology Products Database. (n.d.). Retrieved September 2, 2024, from <https://product.statnano.com/>
- O'Brien, M. N., Jones, M. R., Brown, K. A., & Mirkin, C. A. (2014). Universal noble metal nanoparticle seeds realized through iterative reductive growth and oxidative dissolution reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 136(21), 7603–7606. <https://doi.org/10.1021/ja503509k>
- OECD. (1979). *Summary of considerations in the report from the OECD Expert Group on Ecotoxicology*. [https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2006/09/summary-of-considerations-in-the-report-from-the-oecd-expert-group-on-ecotoxicology\\_g1gh76d5/9789264022386-en.pdf](https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2006/09/summary-of-considerations-in-the-report-from-the-oecd-expert-group-on-ecotoxicology_g1gh76d5/9789264022386-en.pdf)
- OECD. (2024). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. OECD. <https://doi.org/10.1787/54066090-en>
- Ong, W. T. J., & Nyam, K. L. (2022). Evaluation of silver nanoparticles in cosmeceutical and potential biosafety complications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2085–2094. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.035>
- Ostróżka, A., Chajec, Wilczek, G., Student, S., Kocot, K., Homa, J., & Rost-Roszkowska, M. (2024). Toxic effects of nickel on tolerance and regeneration in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *European*

- Zoological Journal*, 91(1), 180–205.  
<https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2310041>
- Padhye, L. P., Jasemizad, T., Bolan, S., Tsyusko, O. V., Unrine, J. M., Biswal, B. K., Balasubramanian, R., Zhang, Y., Zhang, T., Zhao, J., Li, Y., Rinklebe, J., Wang, H., Siddique, K. H. M., & Bolan, N. (2023). Silver contamination and its toxicity and risk management in terrestrial and aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 871. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161926>
- Palyanova, G. A. (2020). Gold and Silver Minerals in Sulfide Ore. *Geology of Ore Deposits*, 62(5), 383–406. <https://doi.org/10.1134/S1075701520050050>
- Pantaleão, J. A. F., López-Greco, L. S., Alves, D. F. R., Barros-Alves, S. D. P., Negreiros-Fransozo, M. L., & Tropea, C. (2015). Nutritional vulnerability in early stages of the freshwater ornamental “red cherry shrimp” *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Caridea: Atyidae). *Journal of Crustacean Biology*, 35(5), 676–681. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002357>
- Poynton, H. C., Lazorchak, J. M., Impellitteri, C. A., Blalock, B. J., Rogers, K., Allen, H. J., Loguinov, A., Heckman, J. L., & Govindasmaw, S. (2012). Toxicogenomic responses of nanotoxicity in *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 46(11), 6288–6296. <https://doi.org/10.1021/es3001618>
- Pulit-Prociak, J., & Banach, M. (2016). Silver nanoparticles - A material of the future...? *Open Chemistry*, 14(1), 76–91. <https://doi.org/10.1515/chem-2016-0005>
- Ratte, H. T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1), 89–108. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180112>
- Razekenari, A. M., Fereidouni, A. E., Movahedinia, A., & Neyshabouri, E. Z. (2023). Impacts of sublethal concentrations of 17  $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) on growth, reproductive performance, and survival in red cherry shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Atyidae) during consecutive spawnings. *Aquatic Toxicology*, 259. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106519>
- Ribeiro, F., Gallego-Urrea, J. A., Jurkschat, K., Crossley, A., Hassellöv, M., Taylor, C., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2014). Silver nanoparticles

- and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, 466–467, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.101>
- Romo Quiñonez, C. R., Alvarez-Ruiz, P., Mejía-Ruiz, C. H., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Gamez-Jimenez, C., Valenzuela-Quíñonez, W., Montoya-Mejía, M., & Pérez, E. N. (2022). Chronic toxicity of shrimp feed added with silver nanoparticles (Argovit-4R) in *Litopenaeus vannamei* and immune response to white spot syndrome virus infection. *PeerJ*, 10. <https://doi.org/10.7717/peerj.14231>
- Rosi, N. L., & Mirkin, C. A. (2005). Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews*, 105(4), 1547–1562. <https://doi.org/10.1021/cr030067f>
- Sajanlal, P. R., Sreeprasad, T. S., Samal, A. K., & Pradeep, T. (2011). Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano Reviews*, 2(1), 5883. <https://doi.org/10.3402/nano.v2i0.5883>
- Santos, D. B., Barbieri, E., Bondioli, A. C. V., & De Melo, C. B. (2014). Effects of Lead in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) metabolism regarding salinity. *Mundo Da Saude*, 38(1), 16–23. <https://doi.org/10.15343/0104-7809.20143801016023>
- Schuijt, L. M., Peng, F.-J., van den Berg, S. J. P., Dingemans, M. M. L., & Van den Brink, P. J. (2021). (Eco)toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future. *Science of The Total Environment*, 795, 148776. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148776>
- Shakhashiri, B. Z., Dirreen, G. E., & Juergens, F. (1980). Solubility and complex ion equilibria of silver(I) species in aqueous solution. *Journal of Chemical Education*, 57(11), 813. <https://doi.org/10.1021/ed057p813>
- Shalaby, I. M., Stumpf, E., Helmy, H. M., El Mahallawi, M. M., & Kamel, O. A. (2004). Silver and silver-bearing minerals at the Um Samiuki volcanogenic massive sulphide deposit, Eastern Desert, Egypt. *Mineralium Deposita*, 39(5–6), 608–621. <https://doi.org/10.1007/s00126-004-0427-y>
- Shamaeizadeh, A., Razi Astarai, F., & Kasaeian, A. (2024). Investigating the effect of adding silver nanoparticles to hybrid crystalline silicon solar cells. *Results in Optics*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.rso.2023.100598>

- Sharma, V. K., Siskova, K. M., Zboril, R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science*, 204, 15–34. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.002>
- Suen, C., & Gillett-Kaufman, J. L. (2020). *Cherry Shrimp* *Neocaridina davidi* (Bouvier 1904) (Crustacea: Decapoda: Atyidae). <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T198132A147794954.en>
- The European Commission. (2011). Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Official Journal of the European Union*. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/emerging/docs/](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/)
- Turkmen, G., & Karadal, O. (2012). The Survey of the Imported Freshwater Decapod Species via the Ornamental Aquarium Trade in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(15). <https://doi.org/10.3923/javaa.2012.2824.2827>
- Ulm, L., Krivohlavek, A., Jurašin, D., Ljubojević, M., Šinko, G., Crnković, T., Žuntar, I., Šikić, S., & Vrčec, I. V. (2015). Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19990–19999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5201-4>
- Umweltbundesamt. (2024). *H2O Fachdatenbank - Qualitätsabfrage Öffentlich*. <https://wasser.umweltbundesamt.at/h2odb/fivestep/abfrageQdPublic.xhtml>
- United States Environmental Protection Agency. (1994). Catalogue of Standard Toxicity Tests for Ecological Risk Assessment. *Intermittent Bulletin*, 2(2).
- Unrine, J. M., Colman, B. P., Bone, A. J., Gondikas, A. P., & Matson, C. W. (2012). Biotic and abiotic interactions in aquatic microcosms determine fate and toxicity of ag nanoparticles. Part 1. Aggregation and dissolution. *Environmental Science and Technology*, 46(13), 6915–6924. <https://doi.org/10.1021/es204682q>
- Valavanidis, A., & Vlachogianni, T. (2015). ECOTOXICITY TEST METHODS AND ECOLOGICAL RISK ASSESSMENT. Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology Tests under the Guidelines of International Organizations. *Science Advances on Environmental Chemistry, Toxicology and Ecotoxicology Issues*. [www.chem-tox-ecotox.org](http://www.chem-tox-ecotox.org)

- Vazquez, N. D., Sganga, D. E., & López Greco, L. S. (2022). Effect of different substrates on growth and biochemical composition of the ornamental “red cherry” caridean shrimp, *Neocaridina davidi* (Atyidae). *Aquaculture Research*, 53(8), 3001–3009. <https://doi.org/10.1111/are.15812>
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 377–410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>
- Vigderman, L., Khanal, B. P., & Zubarev, E. R. (2012). Functional gold nanorods: Synthesis, self-assembly, and sensing applications. *Advanced Materials*, 24(36), 4811–4841. <https://doi.org/10.1002/adma.201201690>
- Völker, C., Boedicker, C., Daubenthaler, J., Oetken, M., & Oehlmann, J. (2013). Comparative Toxicity Assessment of Nanosilver on Three Daphnia Species in Acute, Chronic and Multi-Generation Experiments. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075026>
- 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 nano-toxicological research. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49(13), 1588–1601. <https://doi.org/10.1080/10934529.2014.938536>
- Wood, C. M. (2011). Silver. In *Fish Physiology* (Vol. 31, pp. 1–65). [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(11\)31023-0](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(11)31023-0)
- Wood, C. M., Playle, R. C., & Hogstrand, C. (1999). Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1), 71–83. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180110>
- Xing, K., Liu, Y., Yan, C., Zhou, Y., Sun, Y., Su, N., Yang, F., Xie, S., & Zhang, J. (2021). Transcriptome analysis of *Neocaridina denticulate sinensis* under copper exposure. *Gene*, 764. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145098>
- Xing, K., Liu, Y., Yan, C., Zhou, Y., Zhang, R., Sun, Y., & Zhang, J. (2022). Transcriptomic analysis of *Neocaridina denticulate sinensis* hepatopancreas indicates immune changes after copper exposure. *Fish and Shellfish Immunology*, 121, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.10.029>

- Yang, Y., Wang, K., Liu, X., Xu, C., You, Q., Zhang, Y., & Zhu, L. (2024). Environmental behavior of silver nanomaterials in aquatic environments: An updated review. *Science of The Total Environment*, 907, 167861. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167861>
- Yin, Y., Liu, J., & Jiang, G. (2012). Sunlight-Induced Reduction of Ionic Ag and Au to Metallic Nanoparticles by Dissolved Organic Matter. *ACS Nano*, 6(9), 7910–7919. <https://doi.org/10.1021/nn302293r>
- Yu, S. J., Yin, Y. G., & Liu, J. F. (2013). Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 15(1), 78–92. <https://doi.org/10.1039/c2em30595j>
- Zanitti, M., Medesani, D. A., Rodríguez, E. M., & López Greco, L. S. (2023). Long-Term Exposure of the Red Cherry Shrimp *Neocaridina davidi* to Diclofenac: Impact on Survival, Growth, and Reproductive Potential. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 85(2), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s00244-023-01027-9>
- Zare, Y. (2016). Study of nanoparticles aggregation/agglomeration in polymer particulate nanocomposites by mechanical properties. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 84, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2016.01.020>
- Zawadzka, K., Felczak, A., Nowak, M., Kowalczyk, A., Piwoński, I., & Lisowska, K. (2021). Antimicrobial activity and toxicological risk assessment of silver nanoparticles synthesized using an eco-friendly method with *Gloeophyllum striatum*. *Journal of Hazardous Materials*, 418. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126316>
- Zhang, X., Yang, C. W., Yu, H. Q., & Sheng, G. P. (2016). Light-induced reduction of silver ions to silver nanoparticles in aquatic environments by microbial extracellular polymeric substances (EPS). *Water Research*, 106, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.004>
- Zhao, C. M., & Wang, W. X. (2011). Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(4), 885–892. <https://doi.org/10.1002/etc.451>

# Appendix

Appendix 1 Aufstellung aller Messwerte zu den verwendeten ADW. F<sup>-</sup> lag bei allen Versuchen unter dem LOD von 0,05 mg/L. \*beim Versuch mit ionischem Silber wurde nur DOC bestimmt

|                         | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Cl <sup>-</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | TOC  | DOC   | pH   | Leitfähigkeit<br>(µS/cm) | CBE<br>(%) |
|-------------------------|-----------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------|-------|------|--------------------------|------------|
| <b>Ionisches Silber</b> | 9,00            | 2,50           | 17,0             | 61,0             | 14,4            | 32,6                          | 1,10                         | 254                           | *    | 1,02  | 8,68 | 471,0                    | -3,57      |
| <b>Nanospheres 1</b>    | 8,10            | 3,10           | 17,0             | 64,1             | 14,3            | 33,1                          | 1,06                         | 256                           | 1,77 | 1,10  | 8,74 | 481,0                    | -2,64      |
| <b>Nanospheres 2</b>    | 11,8            | 5,30           | 18,9             | 71,1             | 16,6            | 34,4                          | 1,29                         | 273                           | 1,70 | 0,804 | 8,73 | 519,6                    | 0,66       |
| <b>Nanospheres 3</b>    | 10,0            | 2,73           | 17,8             | 59,6             | 14,8            | 34,4                          | 1,02                         | 236                           | 1,91 | 0,485 | 8,52 | 468,9                    | -0,69      |
| <b>Nanopowder 1</b>     | 9,85            | 2,97           | 18,6             | 79,4             | 15,0            | 35,2                          | 1,13                         | 284                           | 2,08 | 0,607 | 8,40 | 505,7                    | 1,35       |
| <b>Nanopowder 2</b>     | 10,7            | 2,99           | 17,6             | 69,9             | 14,7            | 34,4                          | 1,05                         | 269                           | 1,94 | 0,751 | 8,72 | 496,8                    | -0,72      |

## Abstract

Silver is generally considered to be the most toxic metal for aquatic life. With the decline of analogue photography and the associated silver waste, this problem has become less important for some years. However, with the increased use of silver nanoparticles in a great range of products, the environmental impact of silver is now higher than ever before.

In this work, the acute toxicity to the Cherry shrimp *N. davidi* was determined for the first time. Silver nanospheres with PVP-coating, silver nanopowder without coating and ionic silver were compared. In order to create realistic conditions, mesocosm experiments were carried out with artificial Danube water. The determined LC<sub>50</sub> over 24 hours was 4.3 µg/L for ionic silver, 37.7 µg/L for the nanospheres and 383 µg/L for the nanopowder. The differences can be explained by the stability of the NP and the resulting release of silver ions. The nanospheres with PVP-coating tend to agglomerate less than the nanopowder and therefore have a larger total surface area which can release silver ions. This assumption is also confirmed by the measured concentrations of dissolved and therefore bioactive silver, which also includes dissolved nanoparticles. The dissolved proportion of silver was greater for the nanospheres than for the nanopowder. Due to complexation by humic acids and chlorides, only a portion of the ionic silver, which was added as a readily soluble salt, was dissolved. This dissolved proportion generally decreased over time for all silver species.

The silver accumulation in the shrimps was also analysed. It is similar for Ag<sup>+</sup> and the nanospheres where it increases with longer exposure times. In contrast, for the nanopowder the shrimps that died after 24 hours absorbed more silver than those that survived longer in the mesocosm. Results show that a bioconcentration factor of around 30 is lethal. It is a possibility that after 24 hours there is no longer any relevant accumulation happening, as only a small amount of dissolved silver is still present.

These results show that the coating of AgNP has a significant influence on its toxicity and solubility.

## Zusammenfassung

Allgemein gilt Silber als das toxischste Metall für aquatische Lebewesen. Mit dem Rückgang der analogen Fotografie und den damit verbundenen Silberabfällen hat diese Problematik für einige Jahre an Bedeutung verloren. Durch die verstärkte Verwendung von Silbernanopartikeln in einer immer breiteren Produktpalette ist die Umweltbelastung durch Silber heute aber höher als je zuvor.

In dieser Arbeit wurde erstmals die akute Toxizität auf die Rückenstrichgarnele *N. davidi* bestimmt. Es wurden Silbernanospheres mit PVP-Coating, Silbernanopowder ohne Coating und ionisches Silber verglichen. Um realitätsnahe Bedingungen zu schaffen, wurden Mesokosmenversuche mit künstlichem Donauwasser durchgeführt. Der  $LC_{50}$  über 24 Stunden betrug für ionisches Silber  $4,3 \mu\text{g/L}$ , für die Nanospheres  $37,7 \mu\text{g/L}$  und für das Nanopowder  $383 \mu\text{g/L}$ . Die Unterschiede werden mit der Stabilität der NP und der daraus resultierenden Freisetzung von Silberionen erklärt. Die Nanospheres mit PVP-Coating agglomerieren weniger als das Nanopowder und haben somit eine größere Gesamtoberfläche, über die sich Silberionen lösen können. Diese Annahme wird auch durch die gemessenen Konzentrationen an gelöstem und damit bioaktivem Silber bestätigt, das aber auch gelöste NP miteinschließt. Der gelöste Anteil am Silber war bei den Nanospheres größer als beim Nanopowder. Aufgrund von Komplexbildung mit Huminstoffen und Chloriden lag selbst beim ionischen Silber, welches als leichtlösliches Salz zugegeben wurde, nur ein Teil gelöst vor. Dieser gelöste Anteil hat generell für alle Silberspezies über die Zeit abgenommen. Weiters wurde die Silberakkumulation in den Garnelen betrachtet. Diese ist für  $\text{Ag}^+$  und die Nanospheres ähnlich und nimmt mit steigender Expositionsdauer zu. Beim Nanopowder ist das Gegenteil der Fall, denn nach 24 Stunden verstorbene Garnelen haben mehr Silber aufgenommen als jene, die längere Zeit im Mesokosmos überlebt haben. Hier zeigt sich, dass ein Biokonzentrationsfaktor von etwa 30 zum Tod führt. Womöglich kommt es nach 24 Stunden zu keiner relevanten Anreicherung mehr, da nur noch wenig gelöstes Silber vorliegt. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Coating von AgNP einen wesentlichen Einfluss auf deren Toxizität und Löslichkeit hat.