



Bayerisches Landesamt für
Umwelt



Umweltrelevante Eigenschaften synthetischer Nanopartikel

Abschlussbericht



analytik



Bayerisches Landesamt für
Umwelt



Umweltrelevante Eigenschaften synthetischer Nanopartikel

Abschlussbericht

Abschlussbericht

Umweltrelevante Eigenschaften synthetischer Nanopartikel

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)
Bürgermeister-Ulrich-Straße 160
86179 Augsburg
Tel.: 0821 9071-0
Fax: 0821 9071-5556
E-Mail: poststelle@lfu.bayern.de
Internet: www.lfu.bayern.de

Projektbearbeitung

LfU, Referat 76, Dr. Marina Maier

Projektleitung

LfU, Referat 76, Dr. Michael Gierig, Dr. Martin Wegenke

Januar 2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
2	Ausgangslage und Projektziele	8
3	Angewendete Techniken und Methoden	10
3.1	Laborkläranlagen	10
3.1.1	Auswahl und Charakterisierung von Nanopartikeln für die Experimente	12
3.1.1.1	Dosierung der Nanopartikel	15
3.1.2	Versuchbegleitende Analytik	16
3.2	Einfluss von Nanopartikeln auf Belebtschlammprozesse	19
3.2.1	Nitrifikationshemmtest (DIN EN ISO 9509)	19
3.2.2	Respirationshemmtest (OECD 209)	21
3.2.2.1	Verlängerter Respirationshemmtest	22
4	Ergebnisse und Diskussion	23
4.1	Untersuchungen in Laborkläranlagen	23
4.1.1	Verteilung von Nanopartikeln in Kläranlagen	25
4.2	Einfluss von Nanopartikeln auf Belebtschlammprozesse	26
4.2.1	Nitrifikationshemmtest (DIN EN ISO 9509)	26
4.2.2	Respirationshemmtest (OECD 209)	29
4.3	Metallbelastung bayerischer Kläranlagen	30
4.4	Bestimmung von Nanopartikeln in wässrigen Umweltproben	32
5	Zusammenfassung	36
6	Anhang	37
7	Verwendete Abkürzungen	43
8	Projektbegleitende Aktivitäten	44
9	Literatur	45

1 Einleitung

Die Nanotechnologie (griech. nanos = Zwerg) ist die gezielte Beeinflussung oder Herstellung von Strukturen, Systemen oder Materialien im Bereich atomarer oder molekularer Dimensionen mit nanoskaligen Abmessungen zwischen 1 nm und 100 nm [1]. Ein Nanometer ist ein milliardstel Meter (10^{-9} m) und bezeichnet einen Grenzbereich, in dem die Oberflächeneigenschaften gegenüber den Volumeneigenschaften der Materialien eine große Rolle spielen. Mit abnehmender Teilchengröße nimmt die relative Oberfläche bei gleichbleibendem Gesamtvolumen zu. Werkstoffe in Nanodimension zeigen spektakuläre Veränderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften: Schmelzpunkte verschieben sich, Farben, katalytische Aktivitäten, Leitfähigkeit und Transporteigenschaften verändern sich. Damit eröffnen sich völlig neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Produkten [2,3].

Für Nanomaterialien gibt es mehrere Definitionen, die nicht einheitlich sind. Über eine gemeinsame Definition wird seit längerem auf der europäischen Ebene diskutiert. Nach einer Empfehlung der EU-Kommission wird Nanomaterial beschrieben als *„ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50 Prozent der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben“* [4].

Synthetische Nanomaterialien werden bereits in vielen Produkten und Prozessen weltweit eingesetzt und es ist zukünftig mit einer Zunahme der Anwendungen in verschiedenen Bereichen zu rechnen (Abbildung 1).

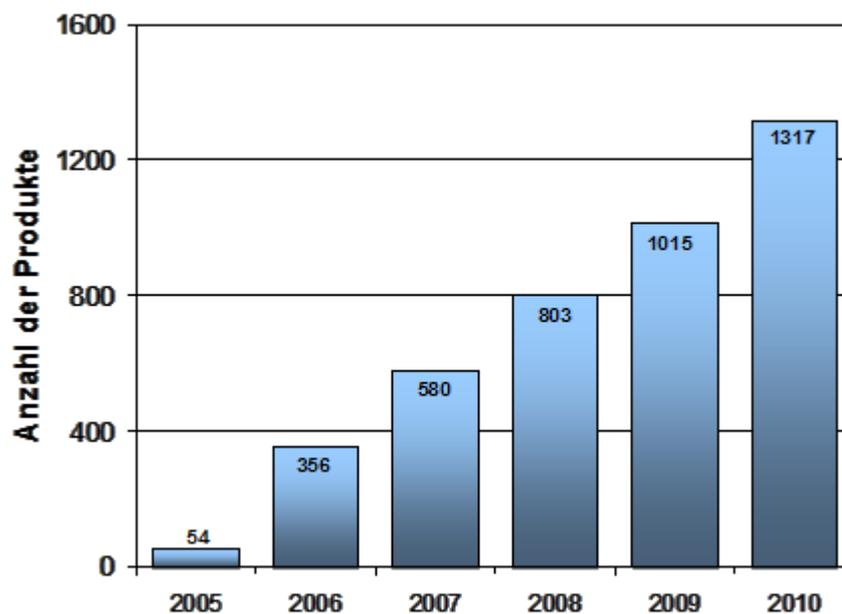


Abbildung 1: Anzahl der Nanoprodukte weltweit [5]

Das Woodrow Wilson International Center unterhält eine Datenbank, in der die weltweit auf dem Markt befindlichen Konsumprodukte erfasst sind. Im März 2011 wurde eine aktualisierte Bestandsaufnahme von mehr als 1300 Nanoprodukten veröffentlicht (Abbildung 2).

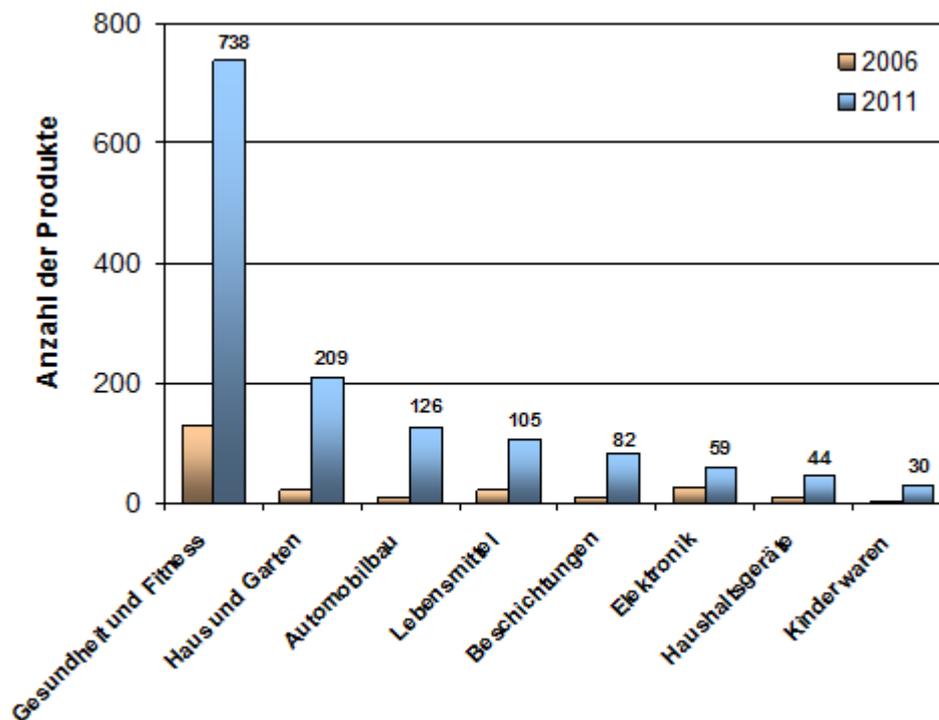


Abbildung 2: Anzahl der Nanoprodukte nach Anwendungskategorie [5]

Parallel zu den viel versprechenden Prognosen über die Marktpotenziale der Nanotechnologie gibt es jedoch auch Bedenken hinsichtlich der Auswirkungen dieser Technologie auf biologische Systeme und die Umwelt [6]. Mit dem steigenden Einsatz von Nanomaterialien erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Exposition der Umwelt. Nanopartikel können in Luft, Wasser und Boden gelangen [7,8]. Der Kenntnisstand über Freisetzungsszenarien, Verhalten, Verbleib und Auswirkungen von Nanopartikeln im Verlauf ihres „Lebenszyklus“ ist zurzeit sehr lückenhaft. Nanomaterialien verhalten sich in der Umwelt häufig anders als die größer strukturierten Varianten („Bulk-Material“) [9,10]. Dies hängt sowohl mit den neuen Materialeigenschaften als auch mit der Vielfalt von Strukturen, Produkten und Anwendungsfeldern zusammen [11]. Aufgrund der Vielzahl an Nanomaterialien und ihrer verschiedenen Anwendungen sind allgemeine Aussagen über die Gefährlichkeit von Nanomaterialien nicht möglich. Trotz gleicher Zusammensetzung unterscheiden sich Nanopartikel stark in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften. Unterschiede bestehen z.B. in Dotierungen, Morphologie, Kristallstruktur und Oberflächenreaktivität der Partikel [12,8]. Das Umweltverhalten muss deswegen für einzelne Klassen von Nanopartikeln separat untersucht und beurteilt werden.

2 Ausgangslage und Projektziele

Nanopartikel können während der Produktion, der Weiterverarbeitung, dem Transport sowie beim Gebrauch oder bei der Entsorgung von Produkten in die Umwelt freigesetzt werden. Die kommunalen Kläranlagen spielen dabei eine zentrale Rolle, da ihnen die in Haushalts- und Industrieabwasser gelangenden Nanopartikel zugeführt werden. Vor allem Nanopartikel aus Konsumprodukten werden überwiegend über das Abwasser in Kläranlagen eingetragen [9]. So konnte die Freisetzung von Nanosilber aus imprägnierten Textilien beim Waschen nachgewiesen werden [13]. Nano-Titandioxid bzw. Nano-Zinkoxid werden derzeit vornehmlich in Farben, Kosmetika und Sonnencremes verwendet. Ins Abwasser gelangen diese Nanopartikel durch Abwaschen der Creme oder durch Regenereignisse. Der Eintrag von Titandioxid-Nanopartikeln aus Außenwandfarben ins Abwasser wurde von Kaegi et al. (2008) untersucht. Sowohl in Regenwasser von einer neu gestrichenen Fassade als auch in Wasser von einer zwei Jahre alten Fassade wurden nanoskalige Titandioxidpartikel nachgewiesen [14].

Das kommunale Abwasser wird in Kläranlagen einer mechanischen und einer biologischen Reinigung unterzogen (Abbildung 3).

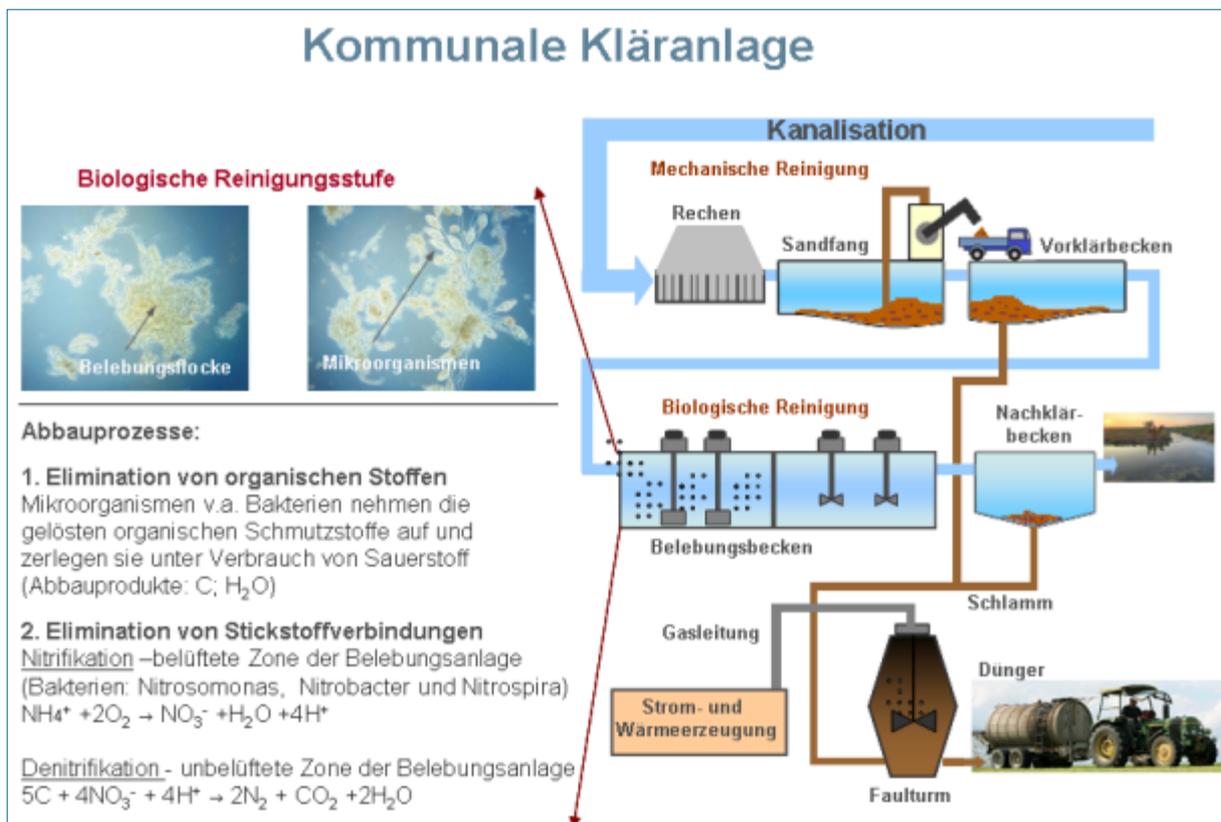


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion einer kommunalen Kläranlage

Bei der mechanischen Reinigung wird das Abwasser zunächst im Rechenbecken von Sperr- und Grobstoffen befreit, dann im Sandfang von Sand und Kies und zuletzt im Vorklärbecken vom größten Teil der ungelösten organischen Stoffe.

In der biologischen Reinigungsstufe kommen spezialisierte Bakterien und Mikroorganismen zum Einsatz, die sich in den Belebungsbecken von gewässerbelastenden Stoffen ernähren. Dieser Vorgang verläuft nach den gleichen Gesetzen wie die Selbstreinigungsvorgänge in natürlichen Oberflächengewässern. Auf diese Weise werden gelöste organische Kohlenstoffverbindungen wie Kohlenhydrate, Eiweißkörper und Fette abgebaut. Auch die Stickstoffelimination findet im Rahmen der biologischen Reinigung statt. Die Reduzierung des Stickstoffgehaltes erfolgt in zwei Stufen: In der ersten Stufe (Nitrifikation) wird Ammoniumstickstoff ($\text{NH}_4\text{-N}$) über Nitrit (NO_2^-) zu Nitrat (NO_3^-) oxidiert, wobei freier Sauerstoff benötigt wird. In der zweiten Stufe (Denitrifikation) wird der Sauerstoff des Nitrats (NO_3^-) für den Abbau von Kohlenstoff verwendet, wobei gasförmiger Stickstoff (N_2) entsteht und in die Atmosphäre entweicht [15].

Die Empfindlichkeit von Belebtschlammorganismen gegenüber Nanopartikeln wurde bis jetzt nur wenig untersucht. Besonders bei der Zufuhr von Nanopartikeln mit antibakteriellen Eigenschaften (wie Ag-, TiO_2 -, ZnO- oder CuO-Nanopartikel) ist nicht auszuschließen, dass die Belebtschlammorganismen geschädigt werden. Über die Wirkung der obengenannten Nanopartikel auf andere Mikroorganismen liegen bereits zahlreiche Studien vor. Eine starke biozide Wirkung von Nanosilber wurde bei Gramnegativen Bakterien und antibiotikaresistenten Bakterien nachgewiesen [16,17]. Die Untersuchungen von *Choi et.al* zeigten, dass Silber-Nanopartikel die Atmung der Bakterien um 42 bis 86% bzw. das Wachstum um 55 bis 66 % hemmen können [18]. Studien zur Wirkung von TiO_2 -Nanopartikeln auf Bakterien dokumentieren eine photokatalytische Aktivität von Nano- TiO_2 und des Weiteren eine bakterizide Wirkung gegenüber *Escherichia coli* [19]. *Adams et. al.* belegten in ihren Studien eine höhere bakterizide Wirkung von Nano-ZnO gegenüber *Bacillus subtilis* und *Vibrio fischeri* im Vergleich zu den TiO_2 -Nanopartikeln ähnlicher Größe [20,21]. Suspendierte CuO-Nanopartikel wirken antibakteriell gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* [22,23].

Ein Ziel des Vorhabens war es, das Vorkommen und das Verhalten biozid wirkender Nanopartikel in Kläranlagen zu untersuchen. Insbesondere war zu prüfen, ob durch die biozide Wirkung von Nanomaterialien die Reinigungsfunktion von Kläranlagen beeinträchtigt wird und ob die Nanopartikel über den Ablauf einer Kläranlage in die Gewässer gelangen können.

Um einen Überblick über die Silber-, Titan-, Zink- bzw. Kupferbelastung und deren zeitliche Entwicklung in bayerischen Kläranlagen zu erhalten, sollten Klärschlammproben aus den Jahren 2008 und 2010 auf die Gesamtgehalte an Silber, Titan, Zink und Kupfer untersucht werden.

Als Vorbereitung für den Aufbau einer Nano-Analytik am LfU sollte eine Bestandsaufnahme der entsprechenden verfügbaren analytischen Verfahren durchgeführt werden. Dabei sollte ein Überblick gewonnen werden, in wieweit die derzeit vorhandenen Methoden für die Quantifizierung und Charakterisierung synthetischer Nanopartikel in Umweltproben, insbesondere in Wasser, geeignet sind.

Die Kompetenz des LfU im Bereich Nanotechnologie sollte durch eine Fachtagung dokumentiert werden. Der Kenntnisstand zur Umweltrelevanz synthetischer Nanopartikel sollte in einer Informationsbroschüre für die Öffentlichkeit aufbereitet werden.

3 Angewendete Techniken und Methoden

3.1 Laborkläranlagen

Das LfU betreibt biologische Kläranlagen im Labormaßstab. In jeder dieser Anlagen kann die biologische Stufe einer realen Kläranlage unter definierten Bedingungen simuliert werden. Die Anlagen bestehen aus zwei Belebungsbecken mit vorgeschalteter Denitrifikationsstufe und einem Nachklärbecken und werden vollautomatisch betrieben. Diese Belebungsverfahren werden in Kläranlagen sehr häufig zur Stickstoffelimination angewendet [24,25]. Der aus der Nitrifikation fließende Belebtschlamm wird in einem Nachklärbecken vom gereinigten Abwasser getrennt und als Rücklaufschlamm zusammen mit dem Rezirkulationsvolumenstrom zurück in das Denitrifikationsbecken geführt (Abbildung 4).

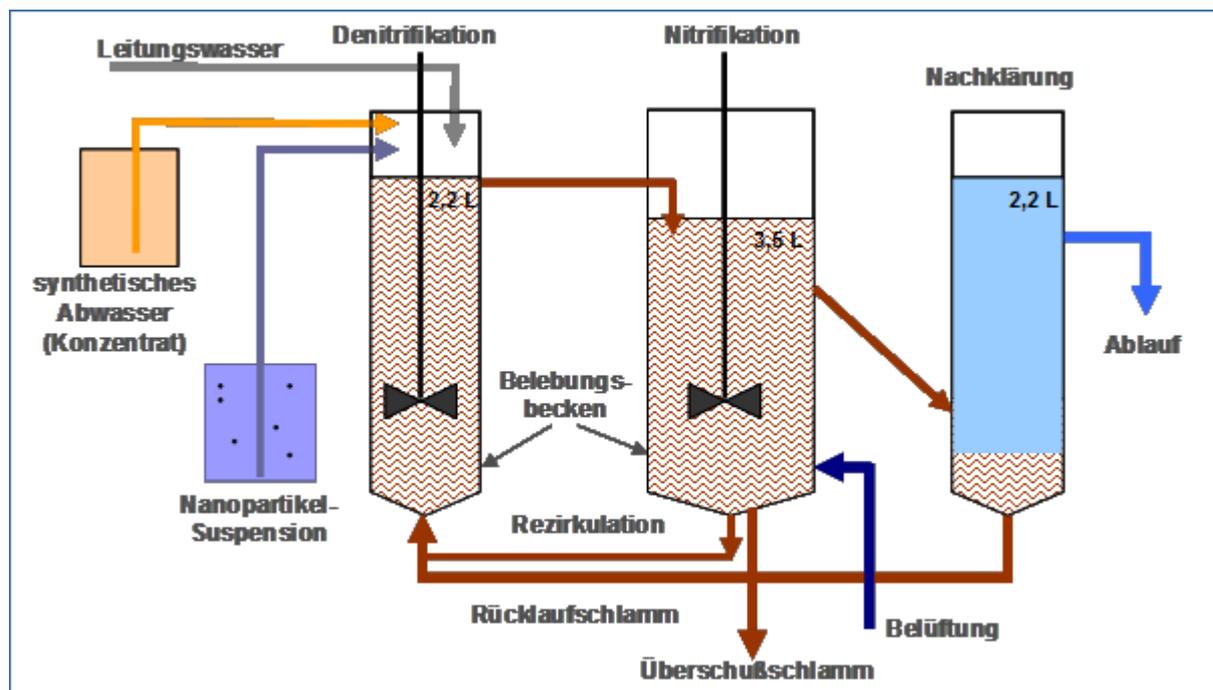


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der LfU-Laborkläranlagen

Das Beckenvolumen sowohl der Denitrifikations- als auch der Nitrifikationsstufe wurden durch Rühren ständig vollständig durchmischelt. Für den Betrieb der Kläranlagen wurde synthetisches Abwasser verwendet (s. Anhang), um eine konstante Matrix für die Abbaubersuche zu erhalten und Wechselwirkungen mit sonstigen Abwasserbe-

standteilen auszuschließen. Die Nanopartikel-Dosierlösungen wurden aus einer separaten Vorlage in das Denitrifikationsbecken eingeleitet. Pro Tag und Anlage wurden 12 Liter einer Lösung zudosiert, die sich wie folgt zusammensetzte: 240 ml synthetisches Abwasser, 240 ml Nanopartikel-Dosierlösung, 11520 ml Leitungswasser. Die Versuche wurden in Anlehnung an DIN EN ISO 11733 bzw. OECD 303A durchgeführt. Für die Untersuchung wurden die Laborkläranlagen mit Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage Weilheim befüllt und anschließend 10 bis 14 Tage ohne Testsubstanzen eingefahren. Die Einfahrphase diente zum Waschen und zur Stabilisierung des Belebtschlammes. Der Biomassegehalt im Belebungsbecken wurde auf 2,5 g/l gehalten, was den in den meisten kommunalen Kläranlagen herrschenden Bedingungen entspricht [26]. Für jede getestete Nanopartikelart wurden zwei Parallelversuche in separat betriebenen Prüfanlagen durchgeführt. Die Nanopartikel wurden jeweils 55 Tage kontinuierlich zudosiert. Um die Funktionstüchtigkeit der Anlagen beurteilen zu können, wurde zusätzlich eine Kontrollanlage betrieben, die nicht mit Nanopartikeln beaufschlagt wurde (Abbildung 5a). Da die Toxizität von TiO_2 -Nanopartikeln auf einem photokatalytischen Effekt beruht, wurden an allen drei Anlagen (Kontrollanlage und zwei Prüfanlagen) UV-Lampen 100 W der Fa. Exo-Terra eingebaut (Abbildung 5b). Die Anlagen wurden täglich 12 Stunden mit UV-Licht bestrahlt.

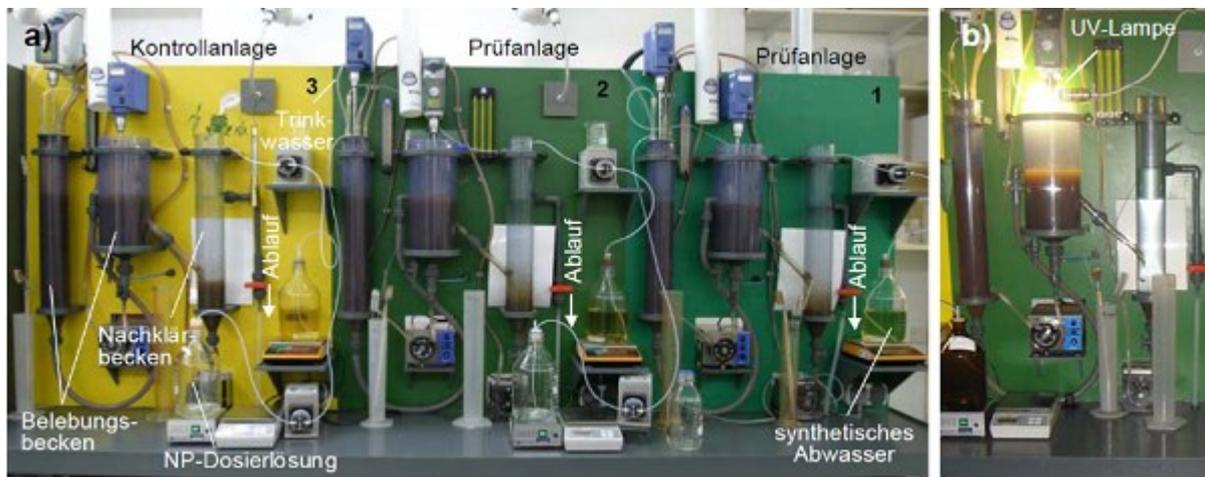


Abbildung 5: Laborkläranlagen während des Betriebes: a) ohne zusätzliche UV-Bestrahlung, b) mit zusätzlicher UV-Bestrahlung

Der Sauerstoffgehalt in den Nitrifikationsbecken wurde automatisch zwischen 2 und 3 mg/l reguliert. Hierfür wurden Sauerstoffsonden FDO 700 IQ der Fa. WTW und ein Sauerstoff-Regelgerät IQ SensorNet 2 der Fa. WTW verwendet. Der pH-Wert wurde zwei Mal wöchentlich mittels eines Handgeräts Multi 197i der Fa. WTW gemessen. Die elektrische Leitfähigkeit wurde mit einem Handgerät LF 325 der Fa. WTW regelmäßig kontrolliert.

3.1.1 Auswahl und Charakterisierung von Nanopartikeln für die Experimente

Silber-Nanopartikel

Nanosilber-Partikel werden mit zunehmender Tendenz in zahlreichen Anwendungen eingesetzt. Dazu gehören Lebensmittelverpackungen, Medizinprodukte, Haushalts- und Bürogeräte, Wasserfilter, Lacke und Wandfarben, Textilien und Kosmetika [5]. Je nach Anwendungsbereich werden Silber-Nanopartikel mit verschiedenen Größen, Formen, Ladungen und Oberflächenfunktionalisierungen hergestellt. Bei der Synthese werden die Partikel mit einem Stabilisator umhüllt, um das Wachsen zu Mikropartikeln zu verhindern [27]. Diese Hülle hat großen Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften und damit auch auf die biologische Aktivität der Nanopartikel. Zur Stabilisierung von Nanosilber werden häufig verschiedene Emulgatoren (wie z.B. Polyoxyethylen-Fettsäureester), Natriumcitrat [28], das neutrale Polymer Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Konservierungsstoffe (wie z.B. Propylenglycol) verwendet [29]. Durch Einbau von Silbernanopartikeln in eine Matrix aus Silikon oder aus thermoplastischen Polyurethanen (TPU) können Polymer-Silber-Nanokomposite hergestellt werden. Das Nanosilber liegt dabei in amorphen Polymerpartikeln vor, die eine Größe $> 1 \mu\text{m}$ aufweisen.

Für die Untersuchungen in den Laborkläranlagen wurden die Arten von Nanosilber ausgewählt, die am häufigsten bei der Herstellung nanosilberhaltiger Produkte eingesetzt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Nanosilber – Testsubstanzen

Testsubstanz	Hersteller	Anwendung
Nano-Ag (Emulgator)	Sigma-Aldrich GmbH	Forschung
Nano-Ag (PVP),	Particular GmbH	Kosmetika, Textilien, Technik
Nano-Ag (Citrat)	Particular GmbH	Kosmetika, Textilien, Technik

Die Nanopartikel-Präparationen wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Abbildung 7 zeigt die REM-Aufnahmen und die Partikelgrößenverteilung.

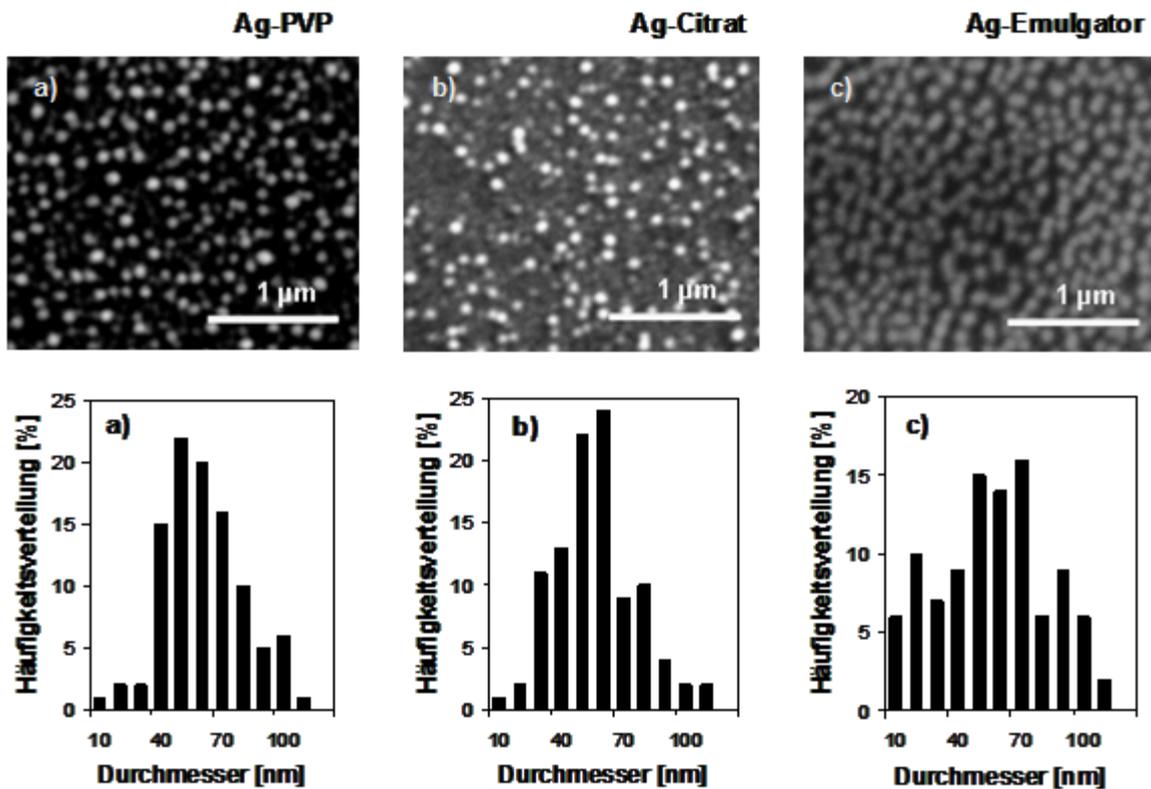


Abbildung 6: REM-Aufnahmen von Silber-Nanopartikeln mit Größenverteilungshistogrammen (n=500)

Die Größenverteilung der eingesetzten Nanopartikel wurde mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops Hitachi S300N bestimmt. Es wurden jeweils 500 Partikel ausgewertet. Dabei ergab sich eine breite Größenverteilung von 10 bis 110 nm Durchmesser.

Nano-TiO₂

Nano-Titandioxid ist neben Nanosilber derzeit eines der am häufigsten eingesetzten Nanomaterialien. TiO₂-Nanopartikel werden als physikalischer UV-Filter in Sonnenschutzmitteln und Kosmetika eingesetzt [30]. Des Weiteren finden sie Anwendung in Farben, Kunststoffen, Emaillen, Papier und Farbstoffsolarzellen [31]. Je nach gewünschten Eigenschaften und Anwendungen werden die Nanopartikel entsprechend beschichtet. Beispielsweise werden Nanopartikel für Drucker-Toner mit Silanen, für Autolacke mit Aluminium- und Zirkon-Oxid und für kosmetische Anwendungen mit Silikon beschichtet. Die Beschichtung erhöht die Dispergierbarkeit in Emulsionen und ist vor allem für die Photostabilität unabdingbar. Unbeschichtetes Titandioxid ist ein Photohalbleiter und neigt unter UV-Bestrahlung zur Oxidation und in Folge zu Radikalbildung. Diese Radikale sind in der Lage, viele organische Substanzen abzubauen. Die photokatalytische Eigenschaft von Nano-TiO₂ ermöglicht zahlreiche industrielle Anwendungen wie die photokatalytische Wasseraufbereitung, die Luftreinigung, selbstreinigende Schichten, Antibeschlagbeschichtungen, Solarzellen, und Wasserstoff-Herstellung [32]. Sie birgt aber auch das Risiko schädlicher Auswirkungen auf lebende Organismen. Von den beiden in der Industrie eingesetzten TiO₂-Kristallformen Anatas und Rutil ist Anatas die photokatalytisch aktivere Form. Ein Gemisch aus 20-30% Rutil-Nanopartikeln und 70-80% Anatas-Nanopartikeln weist

die höchste Aktivität auf und wird intensiv industriell eingesetzt [33,34]. Für die Untersuchungen in den LfU-Laborkläranlagen wurde deswegen das kommerziell erhältliche Gemisch aus 30% Rutil und 70% Anatas (AEROXIDE der Fa. Degussa) verwendet (Abbildung 7).

Nano-ZnO

Zinkoxid-Nanopartikel haben ein sehr breites Anwendungsspektrum. Nano-Zinkoxid besitzt antibakterielle und fungistatische Wirkung und wird als physikalischer UV-Filter in Sonnenschutzmitteln mit Lichtschutzfaktoren über 25 eingesetzt, die für die empfindliche Haut von Kindern und Allergikern geeignet sind [35]. Ummantelungen für ZnO-Nanopartikel können aus Dimethicon, pflanzlichen Fetten, SiO₂ und Fettsäuren bestehen [36]. Dadurch werden beispielsweise die Photostabilität und die Dispersionseigenschaften von Sonnenschutzmitteln verbessert. Nano-ZnO wird außerdem in der Medizin, in Textilien, Lacken, Kunststoffen, im Holz- und Möbelbereich, bei der Zement- und Gummiherstellung und als Halbleiter in verschiedenen Elektronikartikeln eingesetzt [37]. Für die Untersuchungen in den Laborkläranlagen wurden kommerziell erhältliche ZnO-Nanopartikel der Fa. Sigma-Aldrich verwendet (Abbildung 7).

Nano-CuO

Alternativ zu nanosilberhaltigen Produkten werden inzwischen Produkte mit Kupferoxid-Nanopartikeln angeboten, die ebenfalls biozide Eigenschaften besitzen. Hierbei handelt es sich vor allem um imprägnierte Textilien [38], antibakterielle Applikationen [39] und Antifoulingbeschichtungen für Schiffe [40,41]. Kupferoxid-Nanopartikel sind wesentlich billiger und einfacher zu stabilisieren als Ag- oder Cu-Nanopartikel. Sie werden außerdem als Färbepigment für Glas, Tinte, Keramik und Porzellan verwendet, als Poliermittel für die Optik, und als Katalysatoren in chemischen Prozessen [42]. Für die Laboruntersuchungen wurden kommerziell erhältliche CuO-Nanopartikel der Fa. Sigma Aldrich eingesetzt.

Abbildung 7 zeigt die REM-Aufnahmen und die Partikelgrößenverteilung der getesteten Titandioxid-, Zinkoxid- und Kupferoxid-Nanopartikel.

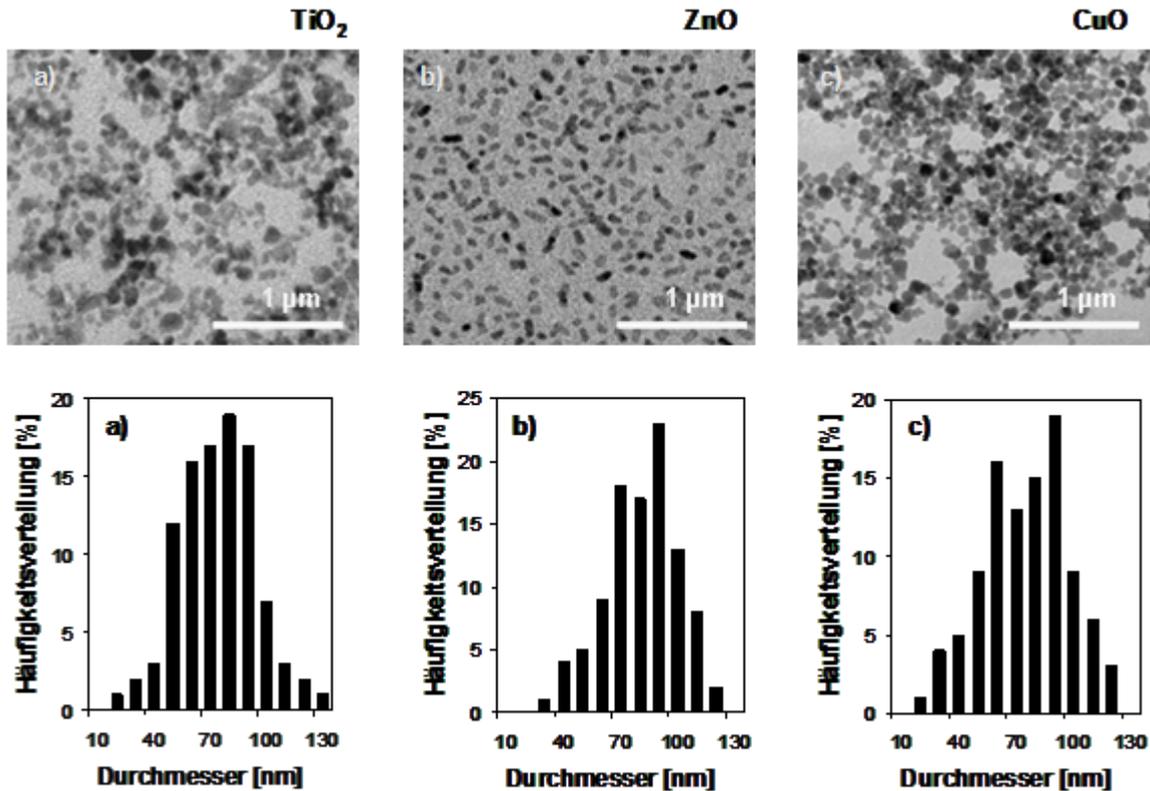


Abbildung 7: REM-Aufnahmen der TiO₂-, ZnO-, und CuO-Nanopartikel mit Größenverteilungshistogrammen (n=500)

Die Größenverteilung der eingesetzten Nanopartikel wurde mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops Hitachi S300N bestimmt. Es wurden jeweils 500 Partikel ausgewertet. Die verwendeten Nanopartikel zeigten eine breite Größenverteilung von 20 bis 130 nm Durchmesser.

3.1.1.1 Dosierung der Nanopartikel

Zum Eintrag von Nanopartikeln in das Abwasser liegen bisher noch keine Messungen vor. Die Konzentrationen von Ag-, TiO₂-, ZnO₂- und CuO-Nanopartikeln in den Zulaufen von Kläranlagen lassen sich in grober Näherung aus Messungen der Gesamtelementgehalte ableiten. Da die Zulaufe in der Regel nicht beprobt werden, liegen nur wenige Daten zu den Gehalten der untersuchten Elemente vor. *Shafer et al.* (1998) ermittelten eine mittlere Silberkonzentration von 4 µg/l im Zulauf von Kläranlagen in der Schweiz [43]. In Deutschland (2005-2006) betrug die durchschnittliche Ag-Konzentration des Zulaufs in Kläranlagen ca. 25 µg/l [44].

Die Titankonzentrationen in Zulaufen erreichen nach einer amerikanischen Studie 100 bis 3000 µg Ti/l (Durchschnitt 200-300 µg/l) [45]. Aus Deutschland gibt es nur einen veröffentlichten Messwert von 200 µg/l Titan im Zulauf eines Klärwerks in Hamburg [46].

Die Konzentrationen an Zink bewegen sich im Bereich 100-800 µg/l (Durchschnitt 500-600 µg/l) [47,48]. Die Konzentrationen an Kupfer liegen durchschnittlich im Bereich 100-300 µg/l [49,50].

Für die Untersuchungen in den Laborkläranlagen wurde eine Nanopartikel-Konzentration im Zulauf gewählt, die der realen Konzentration angenähert ist. Hierzu wurde angenommen, dass ca. 50% des Gesamtelementgehaltes in nanopartikulärer Form im Abwasser vorliegen. Damit ergeben sich die in Tabelle 2 aufgeführten Konzentrationen im Zulauf. Wegen der rasch zunehmenden Verwendung von Ag-Nanopartikeln wurde zusätzlich das häufig in der Produktion eingesetzte Nano-Ag-(PVP) in einer sehr hohen Konzentration von 150 µg/l getestet.

Tabelle 2: Nanopartikel - Konzentrationen im Zulauf

Testsubstanz	Konzentrationen im Zulauf
Nano-Ag (Emulgator)	10 µg/l
Nano-Ag (PVP)	10 µg/l; 150 µg/l
Nano-Ag (Citrat)	10 µg/l
Nano-TiO ₂	300 µg/l
Nano-ZnO	300 µg/l
Nano-CuO	150 µg/l

Die Nanopartikel wurden nach Herstellerangaben in Reinstwasser suspendiert und im Ultraschallbad behandelt (s. Anhang). Die Elementkonzentrationen der Suspensionen wurden nach Mikrowellenaufschluss mit ICP-OES-Messung bestimmt. Die Partikelgrößenverteilung wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht.

3.1.2 Versuchbegleitende Analytik

An festgelegten Tagen wurden Belebtschlammproben sowie Proben des Zu- und Ablaufs genommen. Bestimmt wurden die wichtigsten Leistungsparameter der Kläranlagen und die Gesamtelementkonzentrationen der Proben (Tabelle 3).

Tabelle 3: Analysen während des Betriebes der Laborkläranlagen

Parameter	Einmal wöchentlich	Zweimal wöchentlich
Trockensubstanz (TS) und organischer Trockensubstanzgehalt (o-TS)	Belebtschlamm	
Nicht gelöste Stoffe im Abwasser (Abfiltrierbare Stoffe)		Ablauf
Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)	Zulauf	Ablauf
Biochemischer Sauerstoffbedarf für 5 Tage (BSB ₅)	Zulauf, Ablauf	
Nitratstickstoff (NO ₃ -N)	Zulauf	Ablauf
Ammoniumstickstoff (NH ₄ -N)	Zulauf	Ablauf
Gelöster organischer Kohlenstoff(DOC)	Zulauf	Ablauf
Gesamter gebundener Stickstoff (TNb)	Zulauf	Ablauf
Mikroskopie	Belebtschlamm	
Gesamtelementkonzentration der Testsubstanz (Ag _{ges.} , Ti _{ges.} , Zn _{ges.} , Cu _{ges.})	Zulauf, Ablauf, Belebtschlamm	

Trockensubstanz (TS)

Die Trockensubstanz (TS) der suspendierten Biomasse wurde nach DIN 38414-2 bestimmt. Hierfür wurden die Belebtschlammproben (50 ml) durch einen gewogenen Glasfilter mit 0,2 µm Porenweite filtriert. Der Schlammrückstand wurde mit dem Filter im Trockenschrank bei 105°C getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und gewogen. Abzug des Filtergewichtes ergab die Trockensubstanz für 50 ml des Schlammes.

Organische Trockensubstanz (o-TS)

Die organische Trockensubstanz, die auch als Glühverlust bezeichnet wird, ist definiert als verglühbarer Anteil der Trockensubstanz. Die nach DIN 12879 durchgeführte Bestimmung erfolgte im Anschluss an die Ermittlung der Trockensubstanz (TS), indem die bei 105 °C getrocknete Probe nach dem Auswiegen für 2 h bei 550 °C im Thermoofen geblüht wurde. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde die Probe erneut gewogen. Die Differenz ergab den gesuchten Wert für o-TS.

Abfiltrierbare Stoffe

Für die Bestimmung der abfiltrierbaren Stoffe im Ablaufwasser wurde 1 Liter der Ablaufprobe durch einen gewogenen Glasfaserfilter mit 0,2 µm Porenweite filtriert. Der Filter mit Rückstand wurde bei 105°C im Trockenschrank getrocknet und nach dem Abkühlen gewogen. Abzug des Filtergewichtes ergab den Gehalt von abfiltrierbaren Stoffen im Abwasser.

Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB), Ammoniumstickstoff , Nitratstickstoff

Der CSB-Wert kennzeichnet die Menge an Sauerstoff, welche zur Oxidation der gesamten im Wasser enthaltenen organischen Stoffe verbraucht wird.

Durch Messung der Gehalte an Ammonium- und Nitratstickstoff wird die Umwandlung der Stickstoffverbindungen (Nitrifikation) erfasst.

CSB sowie die Gehalte an Ammonium- und Nitratstickstoff wurden photometrisch bestimmt. Es wurden Küvetten-Schnelltests LCK 304 (NH₄-N), LCK 339 (NO₃-N) und LCK 414 (CSB) der Fa. Hach Lange sowie ein Spektralphotometer Lasa100 verwendet [51]. Alle Proben wurden vor der Analyse durch Glasfilter mit 0,2 µm Porenweite filtriert.

Biochemischer Sauerstoffbedarf für 5 Tage (BSB₅)

Der Biochemische Sauerstoffbedarf (BSB₅) ist die Menge an Sauerstoff, die von Mikroorganismen benötigt wird, um die organischen Substanzen eines Wasserkörpers aerob abzubauen. Die BSB₅ –Bestimmung erfolgte mit der OxiTop-Methode der Fa. WTW. Diese Methode beruht auf der Druckmessung in einem geschlossenen System. Die zu untersuchenden Wasserproben (je 500 ml) wurden in Braunflaschen überführt und mit N-Allylthioharnstoff als Nitrifikationshemmer versetzt. Die Flaschen wurden mit einer CO₂-Auffangvorrichtung (befüllt mit Natriumhydroxid) und einem Magnetrührer versehen und mit Messköpfen verschlossen. Die Flaschen wurden im Thermoschrank bei 20 °C inkubiert. Die in den Proben befindlichen Mikroorganismen verbrauchen Sauerstoff und bilden dabei CO₂, das mit NaOH absorbiert wird. Der dadurch entstehende Unterdruck wird gemessen.

Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und Gesamtstickstoff (TNb)

Gesamtstickstoff TNb (Summe von organisch gebundenem Stickstoff, Ammonium-, Nitrit- und Nitratstickstoff) und DOC (*Dissolved Organic Carbon*) sind wichtige Kenngrößen für den Verschmutzungsgrad des Zu- und Abwassers. Durch die Bestimmung dieser Größen können wichtige Abbauprozesse von Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen erfasst werden. Die DOC-Analysen (DIN EN 1484) bzw. TNb-Analysen (DIN EN 12260) wurden vom Referat 73 des LfU durchgeführt.

Mikroskopie des Belebtschlamm

Um die Effekte von Nanopartikeln auf Belebtschlammorganismen zu prüfen, wurden Belebtschlammproben der Kontroll- und Prüfanlagen mikroskopisch untersucht. Die Analysen wurden mit dem Lichtmikroskop 2 AXIOSKOP 2“ der Fa. Zeiss durchgeführt. Für die digitalen Aufnahmen wurde eine an das Mikroskop gekoppelte Digitalkamera „PowerShot G2“ der Fa. Canon verwendet.

Mikrowellenunterstützter Druckaufschluss

Zur Vorbereitung der Proben für die Elementbestimmung wurde das mikrowellenunterstützte Druckaufschluss-System „MLS-ETHOS plus“ der Firma MLS GmbH eingesetzt (Abbildung 8). Feststoffproben wurden vor dem Aufschluss im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet und anschließend homogenisiert. Flüssige Proben wurden ohne Vorbehandlung aufgeschlossen. Das Probengut wurde in geschlossenen Druckgefäßen mit der jeweiligen Säuremischung (s. Anhang) erhitzt und aufgelöst.



Abbildung 8: Mikrowellenunterstützter Druckaufschluss

Für die Bestimmung der Silber-, Zink- und Kupfergehalte des Belebtschlammes wurde ein einstufiger Aufschluss mit Königswasser durchgeführt (DIN EN ISO 1146). Für die titanhaltigen Proben kam ein zweistufiger Aufschluss zum Einsatz. In der ersten Stufe wurde Königswasser zugegeben (DIN ISO 1146). Dadurch wird die organische Matrix der Proben zerstört und alle vorhandenen Metalle (außer Titan) werden in eine lösliche Form überführt. In der zweiten Stufe wurde der Titandioxidrückstand durch Zugabe von Schwefelsäure vollständig in Lösung gebracht. Die Ablaufproben und die Nanopartikel-Dosierlösungen wurden nach DIN EN ISO 11885 (AbwV BGBl. 1, Nr.74, 2002) aufgeschlossen. Zu den

titanhaltigen Wasserproben wurde zusätzlich Schwefelsäure gegeben. Die aufgeschlossenen Proben wurden in 50 ml Messkolben überführt und mit ultrareinem Wasser aufgefüllt. Es wurden Reagenzien der Qualität „supra pur“ oder „ultrapur“ verwendet. Für die Elementbestimmung im unteren Konzentrationsbereich (ng/l bis µg/l) wurde die Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS „ELAN 600“ der Fa. Perkin Elmer) eingesetzt. Die Bestimmung der Elemente im höheren Konzentrationsbereich wurde mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma- (ICP-OES „Optima 200 DV“ der Fa. Perkin Elmer) durchgeführt. Die Geräteparameter wurden vor jeder Messung mit Hilfe einer Multielement-Standardlösung optimiert.

3.2 Einfluss von Nanopartikeln auf Belebtschlammprozesse

Um weitere Erkenntnisse über die Wirkung von Nanopartikeln auf Belebtschlammprozesse zu erhalten, wurden Nitrifikations- bzw. Respirationshemmtests in einfachen Systemen („Batch-Systemen“) durchgeführt. Geprüft wurde, ob Nanopartikel (Ag, Ti, Zn und Cu) im Konzentrationsbereich von 50 – 1000 mg/kg TS zur Hemmung von Reinigungsprozessen führen können. Zum Vergleich wurden im gleichen Konzentrationsbereich Versuche mit ionischem Silber (AgNO_3), Zink ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) und Kupfer ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) durchgeführt. Für die TiO_2 -Nanopartikel wurden keine Vergleichsversuche durchgeführt, da die antibakterielle Wirkung von TiO_2 ausschließlich auf den photokatalytischen Effekt oder die nanoskalige Größe des TiO_2 zurückzuführen ist.

3.2.1 Nitrifikationshemmtest (DIN EN ISO 9509)

Die Nitrifikation ist ein wichtiger Prozess in der Abwasserreinigung [52]. Unter aeroben Bedingungen wird Ammonium über Nitrit zu Nitrat oxidiert. Verantwortlich für die Nitrifikation ist die Bakteriengruppe der Nitrifikanten. Diese lässt sich einteilen in die ammoniumoxidierenden *Nitrosomonas* und die nitritoxidierenden *Nitrobacter*. Nitrifikanten sind gramnegative, aerobe respiratorische Organismen, die im Boden und in

wässriger Umgebung leben [53]. Sie sind chemolithotroph, d. h. sie benötigen keine organischen Stoffe zum Wachstum. Der Energiegewinn durch Oxidation des anorganischen Ammoniums ist sehr gering gegenüber dem heterotropher Organismen. Nitrifikanten besitzen daher sehr lange Generationszeiten. Sie gelten als besonders empfindlich gegenüber chemischen Stressoren [54]. Eine Störung der Nitrifikation kann den Abbau des Ammoniums verhindern, wodurch es zu einem Anstieg der Ammoniumkonzentration kommt.

Beim Nitrifikationshemmtest wird die Hemmwirkung einer in verschiedenen Konzentrationen eingesetzten Testsubstanz auf nitrifizierende Bakterien im Belebtschlamm untersucht. Die Untersuchungen wurden nach DIN EN ISO 9509 durchgeführt. Die Testdauer betrug 24 h, die Inkubation wurde bei einer Temperatur zwischen 20°C und 25°C in einem Sapromat-Gerät unter ständiger Belüftung des Belebtschlamm durchgeführt (Abbildung 19a). Für die Untersuchungen mit TiO_2 -Nanopartikeln wurden UV-Lampen 100 W der Fa. Exo-Terra eingebaut (Abbildung 9b). Die Testgefäße wurden permanent gerührt, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten. Die kurze Inkubationszeit des Nitrifikationshemmtests erlaubt nur die Bestimmung des akuten Hemmeffektes.

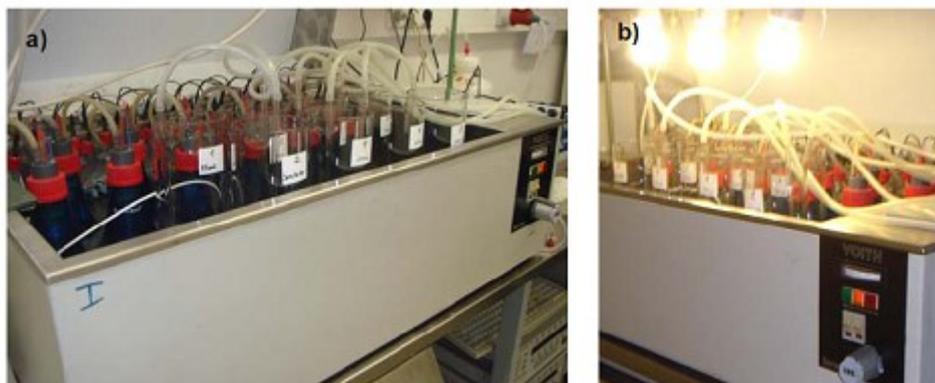


Abbildung 9: Nitrifikationshemmtest : a) Untersuchungen mit Ag-, ZnO- bzw. CuO-Nanopartikeln, b) Untersuchungen mit TiO_2 -Nanopartikeln

Für jeden Versuch wurde eine frische Belebtschlammprobe der Kläranlage Weilheim entnommen. Zur Aufbereitung wurde diese zunächst dreimal mit Trinkwasser gewaschen, um Inhibitoren sowie vorhandenes Nitrat zu entfernen. Durch Zugabe eines Ammoniumsulfat-haltigen Nährmediums (s. Anhang) wurde eine definierte Ammonium-Konzentration im Belebtschlamm eingestellt. Für jeden Testansatz wurden 1,5 g/l Belebtschlamm Trockensubstanz eingesetzt. Alle Testsubstanzen wurden in Konzentrationen von 50 bis 1000 mg (Elementkonzentration)/kg TS getestet. Jede Substanz wurde in 5 unterschiedlichen Konzentrationen getestet, als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Test-Nanopartikel bzw. Test-Ionen (Blindwert) sowie ein Referenzinhibitoransatz (mit Allylthioharnstoff als Nitrifikationshemmer).

3.2.2 Respirationshemmtest (OECD 209)

Mit dem Respirationshemmtest wird die Toxizität einer Testsubstanz gegenüber einer aeroben Belebtschlammbiozönose ermittelt. Die meisten Belebtschlammorganismen gewinnen die Energie für ihre Lebensfunktionen (wie Wachstum, Transportvorgänge und Bewegung) durch die Oxidation chemischer Verbindungen unter Verwendung von Sauerstoff [55]. Chemische Stressoren können die Bakterien in ihrem Wachstum hemmen oder die Zellen sogar abtöten, was sich in einem verminderten Sauerstoffverbrauch äußert. Durch Messung der Sauerstoffzehrung können die Auswirkung der Testsubstanzen auf aerobe Mikroorganismen geprüft werden.

Die Untersuchungen wurden nach OECD-209 durchgeführt. Für jeden Versuch wurde eine frische Belebtschlammprobe der Kläranlage Weilheim entnommen, drei Mal mit Trinkwasser gewaschen und dann sofort in Nährlösung suspendiert (s. Anhang). Alle Testsubstanzen wurden in Konzentrationen von 50 bis 1000 mg (Elementkonzentration)/kg TS getestet. Jede untersuchte Substanz wurde in 5 unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Als Kontrollen dienten ein Ansatz ohne Testsubstanzen (Blindwert) sowie ein Kontrollansatz mit Respirationshemmer (3,5-Dichlorophenol). Das Gesamtvolumen des Testmediums in jedem Gefäß betrug 0,5 l. Der Schlammgehalt lag bei 1,5 g/l. Die Inkubationen wurden bei einer Temperatur von 20°C in einem Sapromat-Gerät unter ständige Belüftung und Rühren des Belebtschlamm durchgeführt. Für die Untersuchungen mit TiO₂-Nanopartikeln wurden UV-Lampen 100 W der Fa. Exo-Terra eingebaut (Abbildung 9b). Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde die erste Sauerstoffmessung durchgeführt. Dafür wurden die Proben in eine Enghals-Glasflasche überführt und gut verschlossen. Der Sauerstoffverbrauch wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten unter Rühren mit einem Sauerstoffmessgerät (WTW Oxi ProfiLine Oxi 197i) gemessen (Abbildung 10).



Abbildung 10: Aufbau des Respirationshemmtests

Die gefüllten Messflaschen dürfen bei der Messung keinen Luftraum haben. Die Sauerstoffkonzentration im Belebtschlamm vor der Messung soll mindestens 5 mg/l

betragen. Die Messwerte wurden vom Gerät alle 20 Sekunden aufgenommen und gespeichert. Der Inhalt der Messflasche wurde nach der Sauerstoffmessung wieder in die Inkubationsgefäße zurückgegeben und der Ansatz wurde weiter belüftet. Nach 3h wurde die Sauerstoffzehrung erneut gemessen.

3.2.2.1 Verlängerter Respirationshemmtest

Mikroorganismen in aeroben Mischpopulationen variieren stark bezüglich ihrer Empfindlichkeit und Generationszeit. Kurze Versuchzeiten bergen die Gefahr, dass die Wirkungen von Nanopartikeln unterschätzt werden, da verzögert auftretende Effekte möglicherweise nicht erfasst werden. Aus diesem Grund wurde die Testdauer auf 7 Tage verlängert. Die Untersuchungen wurden nur mit Nano-Silber durchgeführt, da für diese Nanopartikel die Hemmung der Nitrifikation erwiesen worden war.

Da die beim Kurzeittest verwendete Nährlösung nicht für längere Versuche geeignet ist, wurde ein Nährmedium in Anlehnung an den Zahn-Wellen-Test (DIN EN ISO 9888) eingesetzt (s. Anhang). Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde Glucose zugegeben. Die Sauerstoffzehrung wurde nach 3 Stunden und nach 7 Tagen gemessen. Parallel zur Sauerstoffzehrung wurde die Entwicklung der Biomasse als Maß für die Vitalität der Mikroorganismen untersucht. Dafür wurden nach sieben Tagen in allen Proben die TS-Gehalte bestimmt. Zu Beginn des Versuches wurden jedem Testansatz 1,5 g TS/l zugesetzt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen in Laborkläranlagen

Um den Einfluß von Nanopartikeln auf die in Kläranlagen ablaufenden Prozesse zu untersuchen, wurden Laborkläranlagen mit verschiedenen Nanopartikeln beaufschlagt (s. Kap.3.1.2). Abbildung 11 zeigt die Elimination von Kohlenstoffverbindungen, gemessen als DOC, BSB₅, CSB sowie von Stickstoffverbindungen in Test- und Kontrollanlagen.

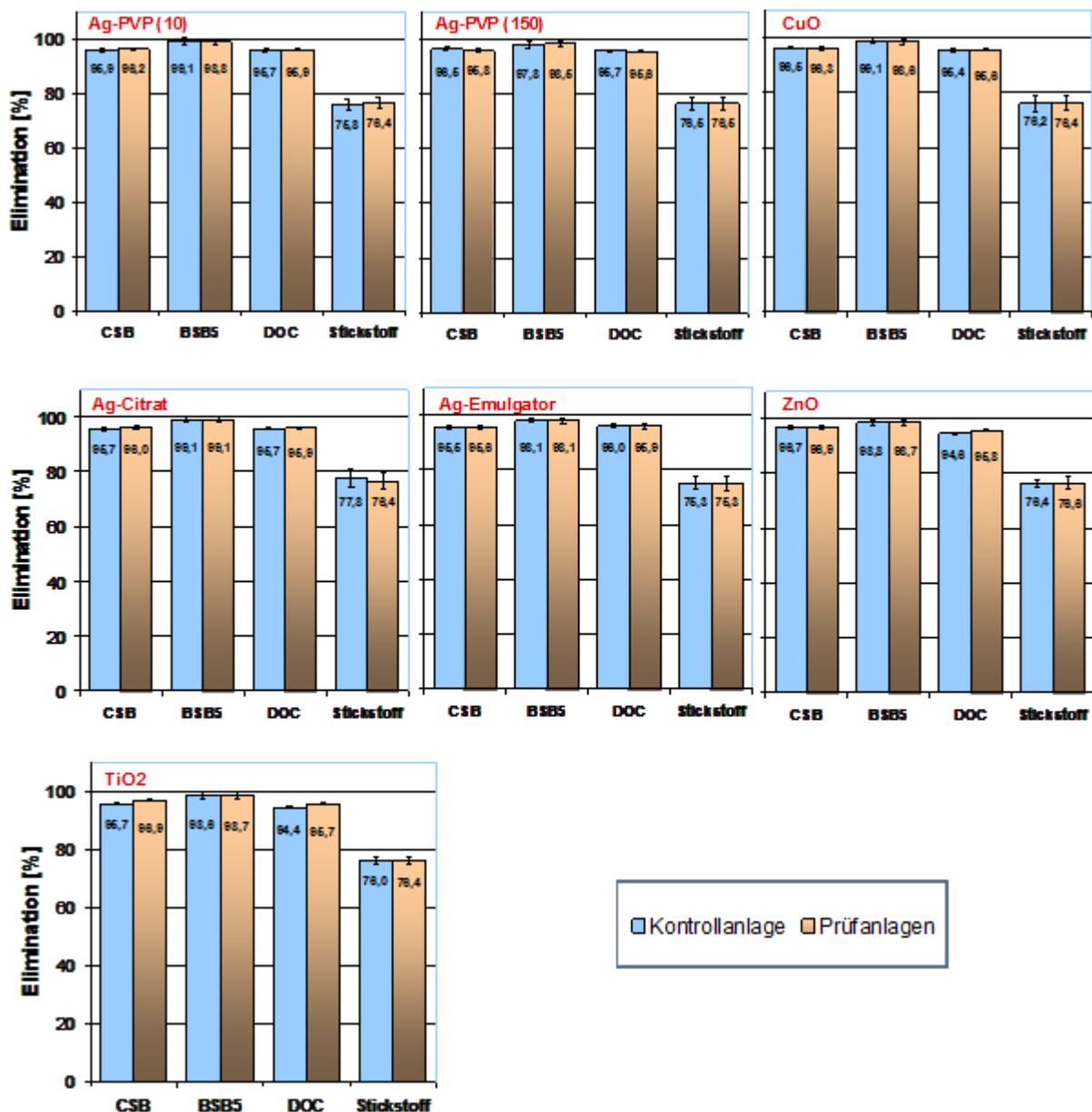


Abbildung 11: Elimination von Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen in Laborkläranlagen

Für alle Testansätze ergaben sich sehr gute Abbauleistungen über den gesamten Versuchszeitraum. Kohlenstoffverbindungen wurden zu 95-99% und Stickstoffverbindungen zu 75-77% eliminiert. Hinweise auf eine Beeinträchtigung von Belebtschlammprozessen durch biozid wirkende Nanopartikel waren nicht festzustellen. Der Gehalt an abfiltrierbaren Stoffen war bei allen Testanlagen während der gesamten Versuchsphase gering. Dies ist ein Indiz dafür, dass es im Testverlauf keine Schlammabsetzprobleme gegeben hat. Bei mikroskopischen Untersuchungen des Belebtschlammes konnte kein Einfluss der Nanopartikel auf die Zusammensetzung der Belebtschlammbiozönose festgestellt werden.

Der Befund, dass keine toxischen Wirkungen beobachtet wurden, kann möglicherweise damit erklärt werden, dass die Nanopartikel an ihren Oberflächen verschiedene Stoffe wie Huminstoffe oder Silikate adsorbieren können. Dies führt zu einer Inaktivierung der Partikeloberfläche [56,57]. Des Weiteren können Nanopartikel Aggregate bzw. Agglomerate bilden [58,59] wodurch die Wahrscheinlichkeit abnimmt, dass Organismen in Kläranlagen mit einzelnen Nanopartikeln in Kontakt kommen bzw. diese resorbieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass die biozide Wirkung von Nanopartikeln unter anderem auf der Freisetzung von Ionen beruht [60,61]. Ionen von Silber, Zink und Cu können im Kläranlagenmilieu sehr schnell schwerlösliche Verbindungen (z.B. Sulfide) bilden, wodurch sich die Toxizität ebenfalls verringert. So wurde nachgewiesen, dass Spuren von gelöstem Silber in Gegenwart von Eisensulfid sofort als Silbersulfid ausfallen [62]. In einer weiteren Untersuchung wurde gezeigt, dass der Faulprozess in Wasserwerken erst ab Kupfergehalten von 10 000 mg/kg TS gehemmt wird, da durch die Bildung von schwerlöslichem Kupfersulfid rasch eine Entgiftung eintritt [50].

4.1.1 Verteilung von Nanopartikeln in Kläranlagen

Um die Verteilung von Nanopartikeln in Laborkläranlagen quantitativ zu erfassen und zu bilanzieren, wurden die Konzentrationen von Silber, Titan, Zink und Kupfer in Zu- und Ablauf und Klärschlamm vor und während der Dosierung von Nanopartikeln gemessen. (Abbildung 12).

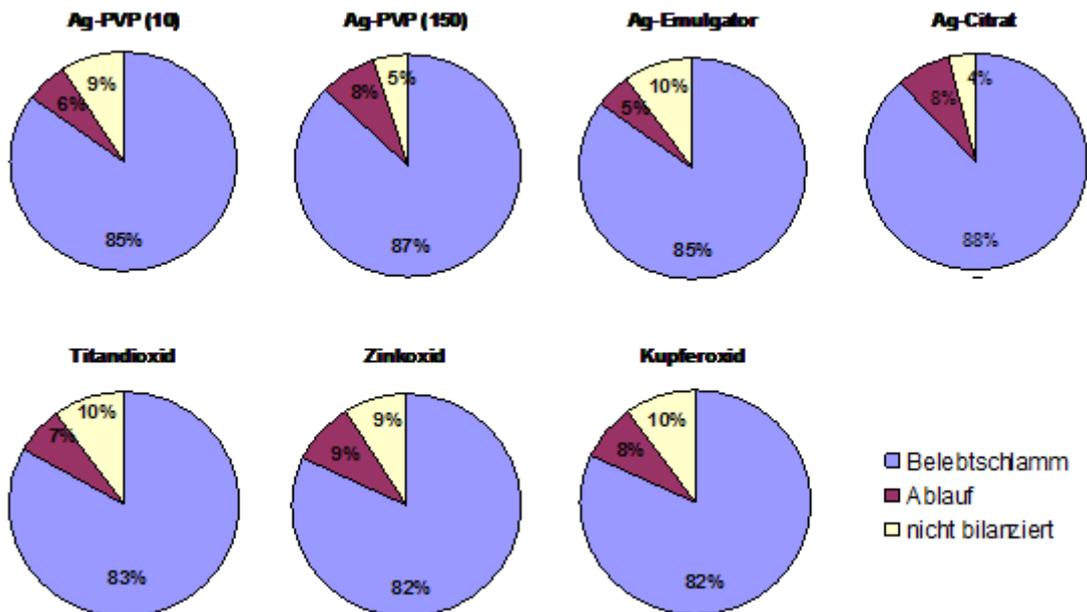


Abbildung 12: Massenbilanz der Metallgehalte nach Zudosierung von Nanopartikeln in Laborkläranlagen

Ca. 82-88% der zudosierten Nanopartikel werden im Klärschlamm zurückgehalten, ca. 5-9% gelangen in den Kläranlagenablauf. Vergleichbare Ergebnisse wurden für nanoskalige Ceroxid-Nanopartikel in Laborkläranlagen (ETH, Zürich) und für Silber-Nanopartikel in einer Pilot-Kläranlage (Eawag, Dübendorf) nachgewiesen [63, 64]. Dies bedeutet, dass die vorliegend untersuchten Nanopartikel nur zu einem geringen Anteil aus Kläranlagen in die Gewässer ausgetragen werden. Der weitaus größere Anteil verbleibt im Klärschlamm und kann bei dessen landwirtschaftlicher Verwertung auf Ackerböden gelangen.

Zur Identifizierung der Nanopartikel im Ablauf wurden zwei Ablaufproben aus Versuchen mit Ag-Citrat bei der Fa. Postnova mittels AF4-System analysiert. In beiden Proben konnten Silber-Nanopartikel im Größenbereich von 30-130 nm detektiert werden. Da zu diesem Zeitpunkt bei der Fa. Postnova kein ICP-MS-Gerät zur Verfügung stand, konnten die Konzentrationen von nanopartikulärem Silber im Ablauf nicht bestimmt werden.

4.2 Einfluss von Nanopartikeln auf Belebtschlammprozesse

4.2.1 Nitrifikationshemmtest (DIN EN ISO 9509)

Der Einfluss von Nanopartikeln auf die Funktion nitrifizierender Bakterien ist in Abbildung 13 dargestellt.

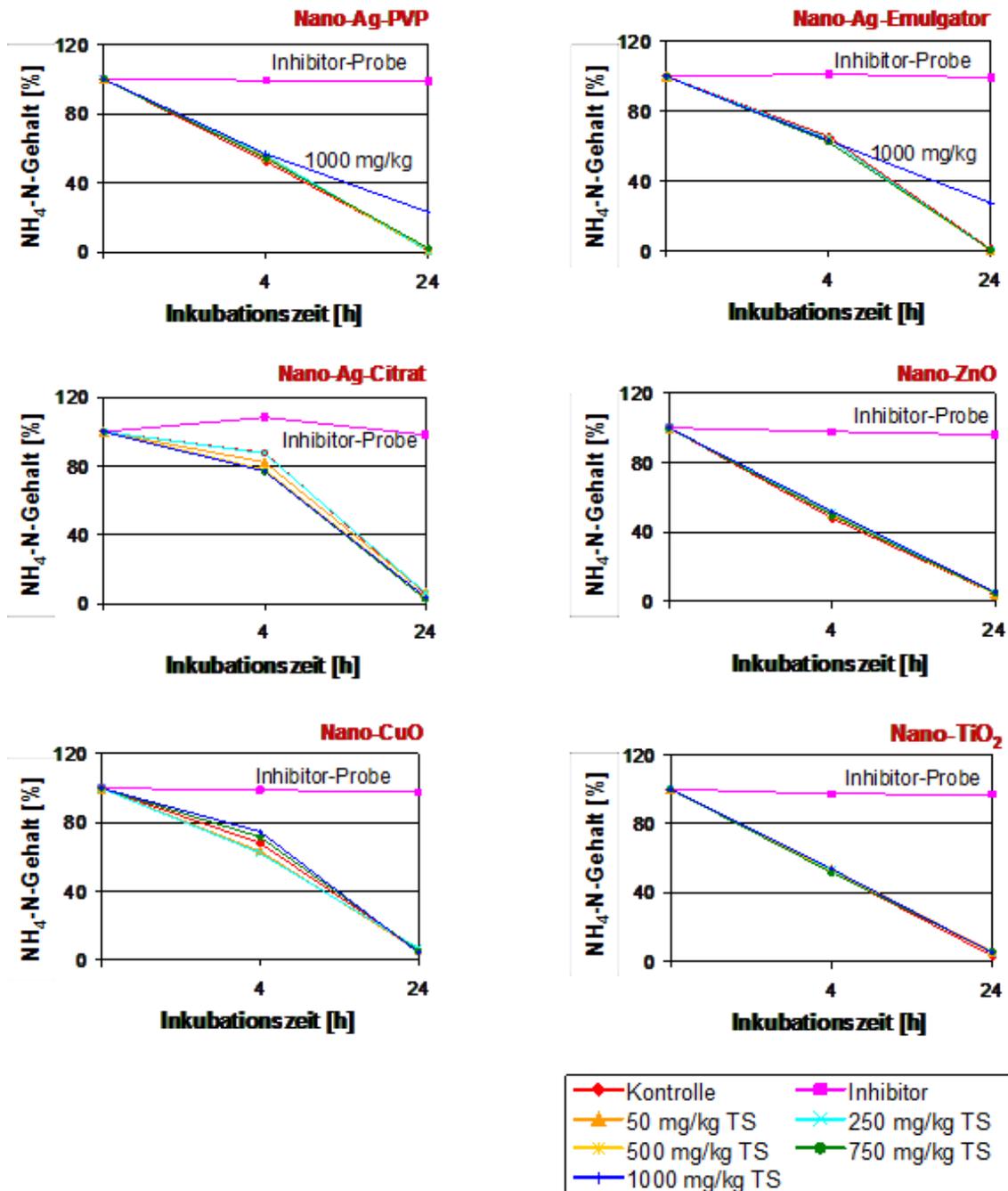


Abbildung 13: Einfluss von Nanopartikeln auf die Nitrifikation

Nach 4h Inkubationszeit ergaben sich keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Nitrifikation. Die Testansätze mit Nanopartikeln und die Kontrollen zeigten keine Unterschiede im Nitrifikationsverlauf. Nach 24h Inkubationszeit war eine deutliche Nitrifikationshemmung durch hohe Konzentrationen an Nanosilber in Form von Ag-PVP bzw. Ag-Emulgator (1000 mg Ag⁰/kg TS) festzustellen. In Gefäßen mit Ag-PVP-Nanopartikeln wurde die Elimination von Ammoniumstickstoff um 24% gehemmt, in Gefäßen mit Ag-Emulgator-Nanopartikeln um 28%. Citrat-stabilisierte Ag-Nanopartikel zeigten keine hemmende Wirkung, was darauf hinweist, dass die Oberflächenbeschichtung das Verhalten von Nanopartikeln in Kläranlagen beeinflussen kann. Mit Nano-TiO₂-, Nano-ZnO und Nano-CuO wurden im Konzentrationsbereich bis 1000 mg/kg TS keine Wirkungen auf die Nitrifikationsprozesse festgestellt. In den Ansätzen mit Nitrifikationshemmer war erwartungsgemäß eine deutliche Hemmung der Nitrifikation festzustellen.

Hohe Konzentrationen von Silberionen führten zu einer starken Hemmung der Nitrifikation (Abbildung 14).

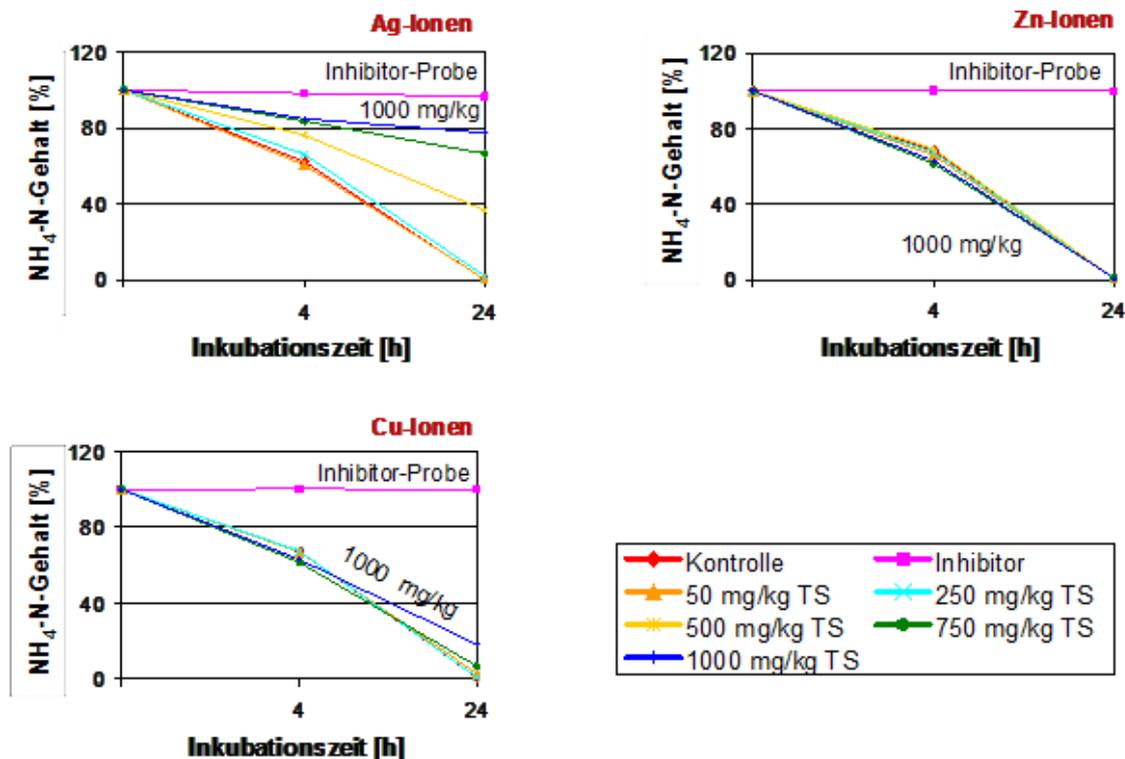


Abbildung 14: Einfluss von Metallionen auf die Nitrifikation

So wurde die Nitrifikation durch 500 mg Ag⁺/kg TS um 37%, durch 750 mg Ag⁺/kg TS um 67% und durch 1000 mg Ag⁺/kg TS sogar um 78% gehemmt. Mit Kupferionen war erst ab 750 mg Cu²⁺/kg TS eine Hemmung zu beobachten. Die Umsetzung von Ammoniumstickstoff wurde dabei um 19% gehemmt. Bei einer Cu²⁺-Konzentration von 1000 mg/kg wurde die Nitrifikation um 33% gehemmt. Mit Zinkionen wurde im Konzentrationsbereich bis zu 1000 mg Zn²⁺/kg TS keine hemmende Wirkung festgestellt.

Bei den während des Versuches durchgeführten mikroskopischen Analysen war kein Einfluss von Nanopartikeln und Metallionen auf die Belebtschlammorganismen zu erkennen. Allerdings wurden nach 24h Inkubationszeit in allen Proben mit Nanosilber ab einer Partikelkonzentration von 750 mg Ag/kg ähnliche optische Veränderungen der Schlammflocken festgestellt. Die voluminösen Schlammflocken (Abbildung 15a) wurden in kleinere Bruchstücke zerlegt (Abbildung 15b).

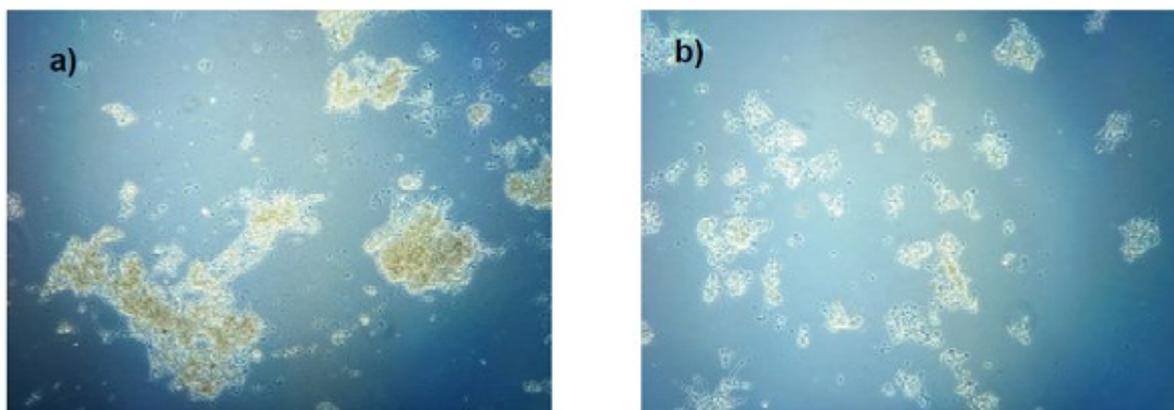


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme von Schlammflocken bei der Durchführung des Nitrifikationshemmtest bei Nano-Ag-Proben ab 750 mg/kg a) Versuchsbeginn, b) nach 24h Inkubationszeit

Nanosilberpartikel können offenbar in hohen Konzentrationen die Flockenstruktur beeinflussen. Dafür können unterschiedliche Faktoren verantwortlich sein. Als mögliche Gründe werden in der Literatur spezifische chemische Reize, Nährstoffmangel oder Nährstoffüberschuss genannt [65,66].

Für Klärschlämme kommunaler Kläranlagen werden folgende Gesamtmetallgehalte angegeben:

Silber: 25-100 mg/kg TS [67,68], Kupfer: 200-600 mg/kg TS [69], Titan: 200-600 mg/kg TS [46], Zink: 100-1200 mg/kg TS [70,71]. In diesen Konzentrationsbereichen sind aufgrund unserer Untersuchungen keine akuten Nitrifikationshemmungen oder Einflüsse auf die Belebtschlammflocken zu erwarten.

4.2.2 Respirationshemmtest (OECD 209)

Die Respiration ist ein Maß für die biologische Aktivität des Belebtschlammes. Für verschiedene Nanopartikel wurde untersucht, ob sich ein Einfluss auf die Belebtschlammatmung feststellen lässt (Abbildung 16)

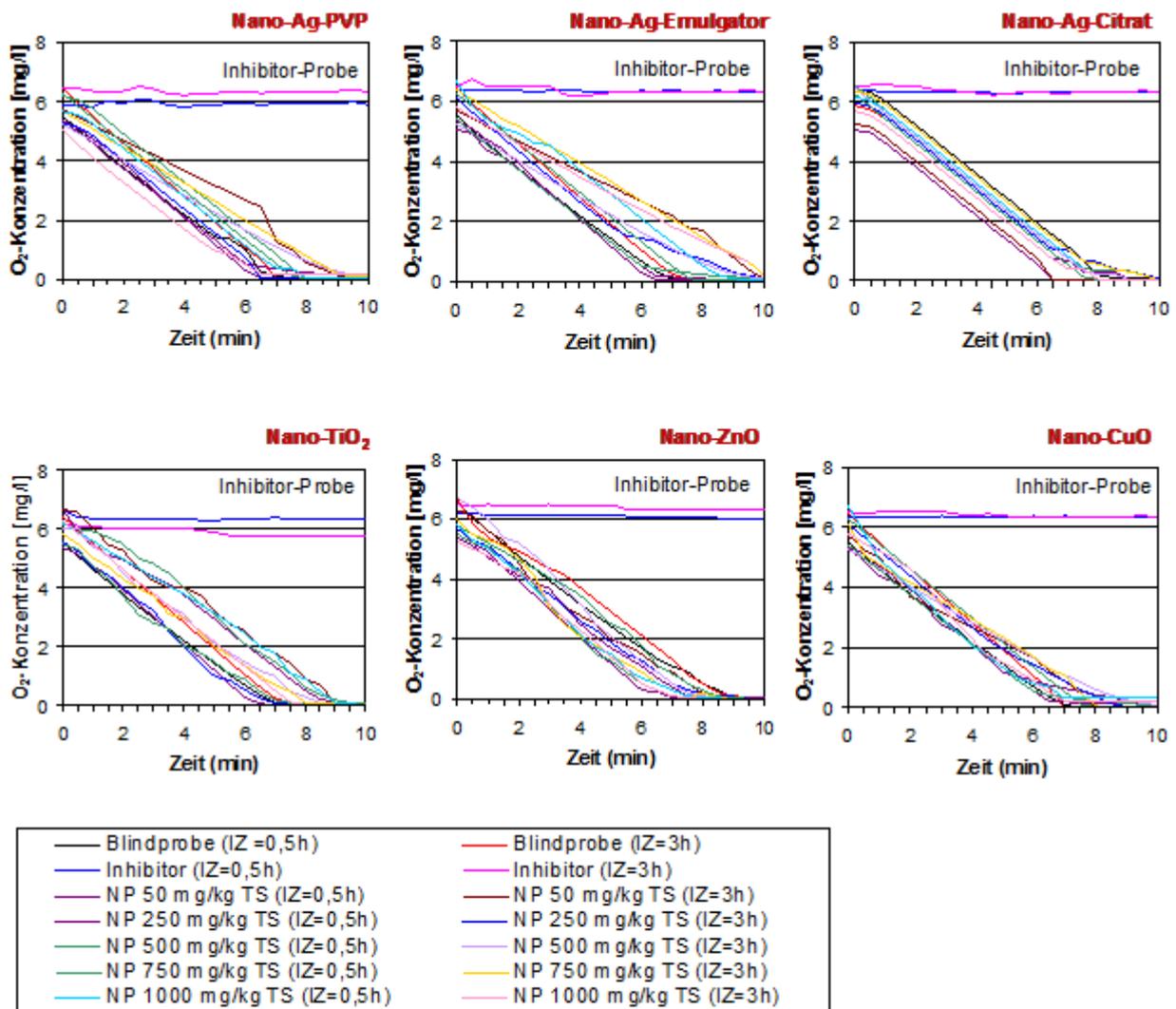


Abbildung 16: Respirationshemmtest mit Nanopartikeln

Die Messungen nach 0,5h bzw. 3h Inkubationszeit ergaben im Konzentrationsbereich von 50 – 1000 mg/kg TS keine Hinweise auf eine Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs durch Nanopartikel. Auch mit ionischen Testsubstanzen konnte keine Hemmwirkung festgestellt werden.

Verlängerter Respirationshemmtest

Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 7 Tage konnte keine Veränderung der Empfindlichkeit des Belebtschlammes gegenüber Silber-Nanopartikeln festgestellt werden. Die Trockensubstanzgehalte nahmen im Laufe der Testwoche in allen Testansätzen zu, was auf ein ungestörtes Wachstum der Biomasse schließen lässt (Tabelle 1).

Tabelle 4: Trockensubstanzentwicklung nach 7 Tagen während des Tests mit Silber-Nanopartikeln

Probe	0 mg Ag/	50 mg Ag/l	250 mg Ag/l	500 mg Ag/l	750 mg Ag/l	1000 mg Ag/l
Ag-Emulgator	-	0,2g/l	0,25 g/l	0,15 g/l	0,2 g/l	0,15 g/l
Ag-PVP	-	0,25 g/l	0,1 g/l	0,2 g/l	0,15 g/l	0,2 g/l
Ag-Citrat	-	0,1 g/l	0,2 g/l	0,15 g/l	0,15 g/l	0,2 g/l
Kontrolle	0,2	-	-	-	-	-
Inhibitor	0	-	-	-	-	-

Die Tatsache, dass nach Verlängerung des Tests selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration an Nano-Silber keine Hemmwirkungen auftrat, lässt darauf schließen, dass nur ein kleiner Teil der Belebtschlammpopulation (z.B. Nitrifikanten) gehemmt wird. Bakterien, die unempfindlich sind für Nano-Silber, können sich vermehren und werden selektiert.

4.3 Metallbelastung bayerischer Kläranlagen

Um einen Überblick über die Gesamtmetallbelastung und deren zeitliche Entwicklung in bayerischen Kläranlagen zu erhalten, wurden die Silber-, Titan-, Zink- und Kupferkonzentrationen in Klärschlammproben aus den Jahren 2008 und 2010 gemessen. Die Analyse erfolgte mittels ICP-OES nach mikrowellenunterstütztem Druckaufschluss mit Königswasser nach DIN EN ISO 1146 (s. Anhang). Die Messdaten sind in Abbildung 17 dargestellt.

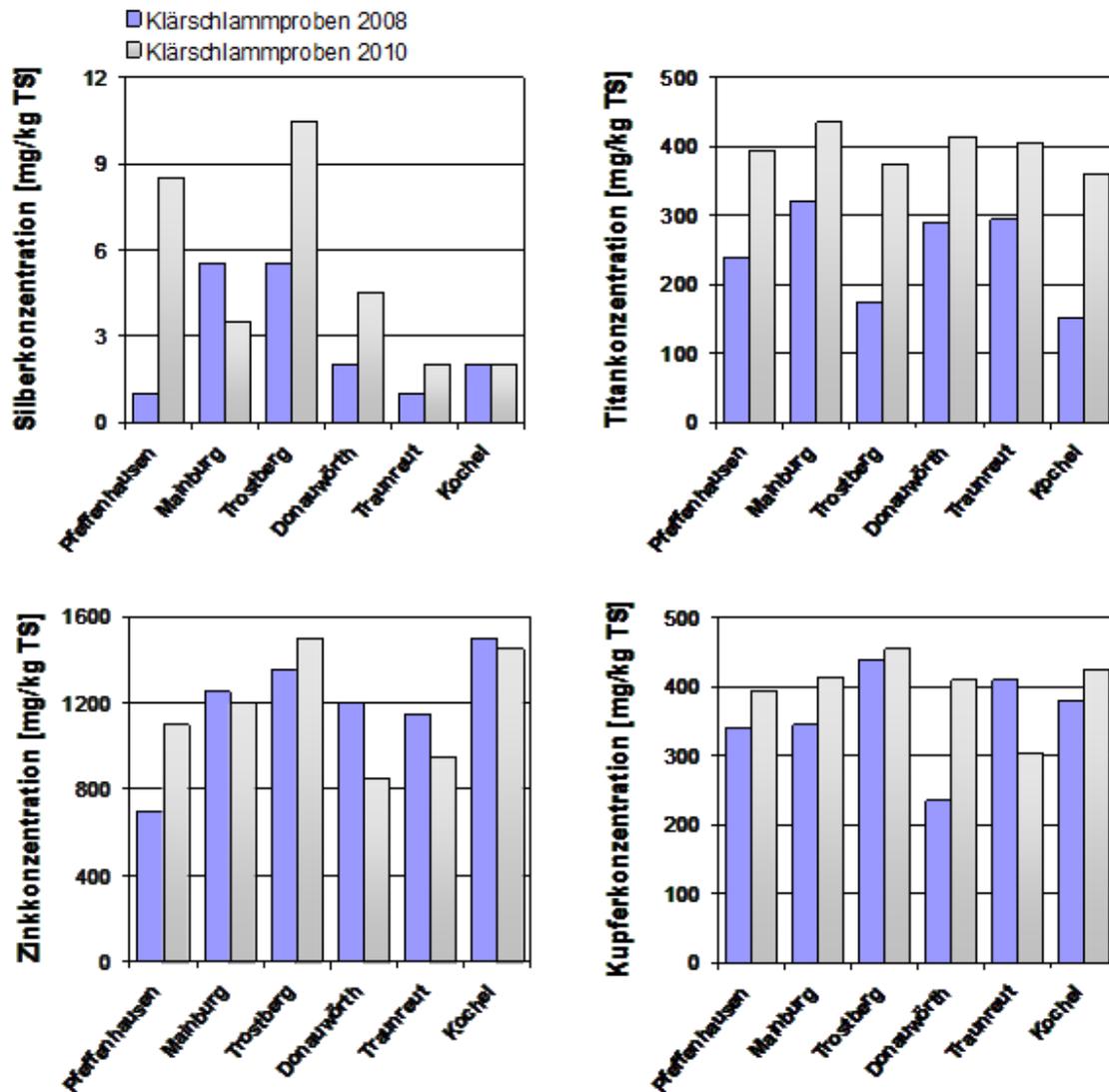


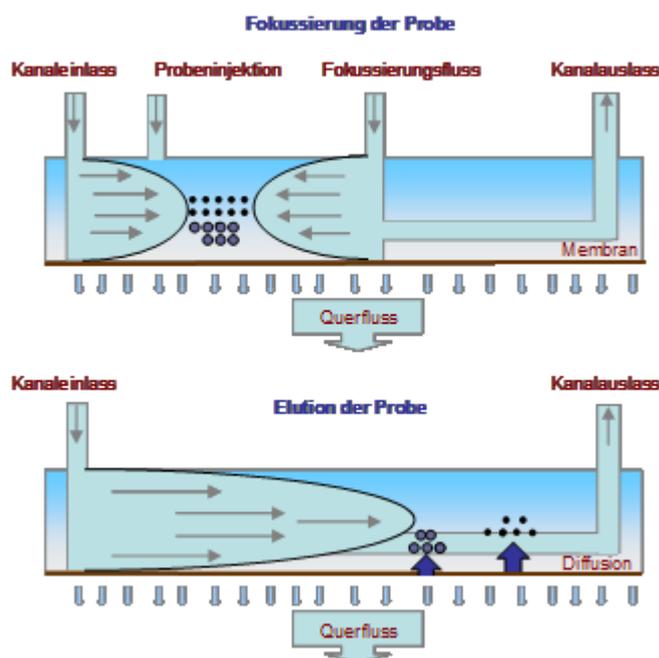
Abbildung 17: Silber, Titan-, Zink- und Kupferkonzentration in bayerischer Kläranlagen

Die Ergebnisse zeigen, dass die Silberkonzentrationen generell unter 12 mg Ag/kg TS liegen. Die Titan- bzw. Kupferkonzentrationen liegen unter 500 mg/kg TS und die Zinkkonzentrationen unter 1500 mg Zn/kg TS. Die Ag-Konzentrationen im Jahr 2010 sind in vier von sechs der untersuchten Kläranlagen deutlich höher als im Jahr 2008. Die Titan-Konzentrationen im Jahr 2010 sind in allen untersuchten Kläranlagen deutlich höher als die des Jahres 2008. Eine Ursache hierfür ist offenbar die Zunahme silber- bzw. titanhaltiger Produkte auf dem deutschen Markt [72]. Im Gegensatz dazu ist bei Zink und Kupfer kein eindeutiger Trend erkennbar, die Konzentrationen 2008 und 2010 unterscheiden sich nur geringfügig. Generell liegen die gemessenen Metallgehalte der Klärschlämme unter den in der Klärschlammverordnung festgelegten Grenzwerten.

4.4 Bestimmung von Nanopartikeln in wässrigen Umweltproben

Ein Ziel des Projektes war es, die vorhandenen Methoden hinsichtlich ihrer Eignung zur Quantifizierung und Charakterisierung der in der Umwelt vorkommenden synthetischen Nanopartikel zu prüfen. Es existieren bereits viele Verfahren zur Charakterisierung einzelner Nanoobjekte bzw. abgegrenzter nanoskaliger Bereiche (Rastersondenverfahren, Elektronenmikroskopie, Röntgenkleinwinkelstreuung, Zetapotential, Ultrafiltration) [73]. Für das Umweltmonitoring werden online-Verfahren bevorzugt, da sie automatisiert durchgeführt werden können und für die Untersuchung einer großen Anzahl von Proben geeignet sind. Dabei werden Techniken zur Trennung und Größencharakterisierung mit elementspezifischen Detektionsmethoden gekoppelt. Diese Koppeltechniken können sowohl Informationen zur Größe als auch zur chemischen Natur der Nanopartikel in einer Probe liefern. Zur Anreicherung von Nanopartikeln in Umweltproben und weiterer Größenfraktionierung mit anschließender Elementbestimmung eignet sich z.B. die asymmetrische Fluss-Feldfluss-Fraktionierung (AF4) in Kombination mit einem induktiv gekoppelten Plasma Massenspektrometrie (ICP/MS).

Mittels AF4-System werden dispergierte Nanopartikel in einem Trennkanal nach Größe, oder Dichte separiert und von den vorhandenen Ionen getrennt. Eine Fokussierung der Probe zu Beginn der Separation ermöglicht die Anreicherung von sehr stark verdünnten Lösungen (Abb. 18). Zur Trennung der Probeteilchen wird ein externes Kraftfeld angelegt, welches senkrecht zur Flussrichtung im Trennkanal wirkt. Partikel verschiedener Größe werden in unterschiedlich schnellen Schichten des parabolischen Strömungsprofils im Kanal angeordnet, wodurch die Größenseparation



erreicht wird. Durch Kombination mit UV-Absorptionsmessung oder mit Lichtstreuungsdetektoren können die Partikelgrößen bestimmt werden. Wird zusätzlich eine Detektionsmethode wie ICP-MS nachgeschaltet, kann auch die Elementzusammensetzung der Probenfraktionen ermittelt werden. Mit Hilfe der AF4/ICP-MS-Methode können Nanopartikel in wässrigen Proben quantitativ und qualitativ charakterisiert werden. Dieses Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Nanoanalytik wässriger Umweltproben getestet. Für die Untersuchung wurde die Asymmetrische Fluss-Feldfluss-Fraktionierung in ihrer technologisch weiter entwickelten

Abbildung 18: Trennprinzip der Asymmetrischen Fluss-Feldfluss-Fraktionierung.

Form AF42000 MT der Fa. Postnova gekoppelt mit einem ICP-MS „Agilent 7700“ der Fa. Agilent angewendet. Die Analysen wurden bei der Firma Postnova Analytics in Landsberg durchgeführt.

Die Proben stammten aus Flüssen in der Nähe bayerischer Industriegebiete, aus strandnahen Bereichen von Seen sowie aus einer kommunalen Kläranlage und dem LfU-Lysimeter. Angaben zu den untersuchten Proben sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Wässrige Umweltproben zur AF4-ICP/MS- Analyse

Nr.	Probenahmestelle	Datum der Probenahme
1.	Donau, Neuburg, SONAX GmbH & Co	21.06.2012
2.	Lech, Meitingen, SGL, Carbon GmbH	21.06.2012
3.	Lech, Gersthofen, Clariant GmbH	21.06.2012
4.	Ammersee, Strandbad St. Alban	21.06.2012
5.	Isar-Loisach Einmündung, zw. Wolfratshausen und Icking	21.06.2012
6.	Starnberger See, Ambacher Erholungsgebiet	21.06.2012
7.	Lysimeter-Sickerwasser, LfU Wielenbach	25.06.2012
8.	Ablauf, Kläranlage Weilheim-Ammer	25.06.2012

In allen Proben wurden zunächst die Gesamtelementgehalte mittels ICP-MS bestimmt (s. Anhang) um einen Überblick über die Zusammensetzung der Proben zu erhalten. Danach wurden die Nanopartikel in den Proben mit dem AF4/ICP-MS-System analysiert. In Tabelle 6 sind die Konzentrationen der Nanopartikel in den untersuchten Proben zusammengestellt.

Tabelle 6: Elementkonzentrationen der Nanopartikel <100 nm

Nr.	Al	Ca	Ti	Fe	Ni	Cu	Zn	Ag	Ce	Σ
	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
1. Donau	2,9	298	n.n.*	3,7	n.n.	0,05	0,2	0,2	n.n.	305
2. Lech	3,2	287	n.n.	3,3	0,02	0,04	0,2	n.n.	n.n.	294
3. Lech	2,7	272	n.n.	1,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	277
4. Ammersee	2,8	398	n.n.	2,2	n.n.	0,02	n.n.	0,1	n.n.	403
5. Isar-Loisach	9,5	241	0,2	14,7	0,01	0,1	0,2	0,01	0,02	266
6. Starnberger See	2,7	n.n.	0,1	1,3	0,03	0,1	0,2	0,01	0,03	4,5
7. Lysimeter	31,0	n.n.	1,1	18,3	0,04	0,01	0,1	0,01	0,01	51
8. KA Weilheim	6,5	519	0,1	13,2	0,02	0,1	0,2	0,03	n.n.	539

*n.n. = nicht nachweisbar

In jeder untersuchten Probe konnten Nanopartikel nachgewiesen werden, die Konzentrationen der gemessenen Elemente liegen im Bereich 0,01-519 µg/l. Die Gesamtgehalte der analysierten Nanopartikel waren am niedrigsten im Starnberger See (4,5 µg/l), der Ablauf der KA Weilheim wies mit 539 µg/l den höchsten Wert auf. Das Messverfahren wurde anhand der Ag-Wiederfindung in zwei mit Ag-Citrat-Nanopartikeln aufgestockten Kontrollproben validiert (Partikelgrößen:10-110 nm, Partikelkonzentration 1 µgAg⁰/l (Probe 1) bzw. 2 µgAg⁰/l (Probe 2). Da ca. 2% der in der Probe enthaltenen Nanopartikel größer als 100 nm sind und bei der Messung abgetrennt werden, wurden die Wiederfindungsraten entsprechend korrigiert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Ag-Wiederfindung in Kontrollproben

Nr.	Gegebene Konzentrationen	Gemessene Konzentrationen	Korrigierte Konzentrationen	Wiederfindung
1.	1 µg Ag/l	0,7 µg Ag/l	0,81 µg Ag/l	81 %
2.	2 µg Ag/l	1,8 µg Ag/l	1,88 µg Ag/l	94%

Für Silber wurde eine gute Wiederfindung in beiden Kontrollproben ermittelt, wobei die Wiederfindungsrate bei niedrigerem Nanopartikelgehalt etwa 13 % niedriger ist als bei höherem Nanopartikelgehalt. Durch die Erhöhung der Probenvolumeninjektion und die Verlängerung der Partikelfokussierungszeit (Aufkonzentrierung) lässt sich

die Messmethode für Proben mit einem Nanopartikelgehalt unter 1 µg/l noch optimieren.

Generell hat sich die AF4-ICP/MS-Methode als geeignet für Nanopartikelmessungen in wässrigen Umweltproben erwiesen, sie kann für das Nanopartikelmonitoring in Oberflächengewässern, Sickerwässern und Abläufen von Kläranlagen eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

Die rasante Entwicklung der Nanotechnologie wirft die Frage auf, in welchem Ausmaß Nanopartikel in die Umwelt gelangen und welche Risiken sich daraus ergeben. Das vorliegende Projekt befasst sich mit den Auswirkungen von Nanopartikeln auf Kläranlagen und aquatische Ökosysteme. Wegen der bioziden Wirkung der Nanopartikel sind Beeinträchtigungen der Kläranlagenfunktion nicht auszuschließen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Laborkläranlagen mit Nanopartikeln im umweltrelevanten Konzentrationsbereich beaufschlagt.

Es ergaben sich keine Hinweise, dass Nanopartikel die Funktion von Laborkläranlagen beeinträchtigen. Bei mikroskopischen Untersuchungen des Belebtschlamm war kein Einfluss von Nanopartikeln auf die Belebtschlammorganismen zu erkennen. Ca. 82-88% der Nanopartikel werden im Klärschlamm zurückgehalten, ca. 5-9% gelangen in den Kläranlagenablauf. Somit wird nur ein sehr geringer Anteil der Nanopartikel über den Kläranlagenablauf in die Gewässer ausgetragen.

Nanosilber hemmte die Nitrifikation im Belebtschlamm erst ab einer Konzentration von 1000 mg Ag /kg TS. Derartig hohe Konzentrationen von Nanopartikeln kommen in realen Kläranlagen nicht vor. TiO_2 -, ZnO- und CuO-Nanopartikeln zeigten bis zu einer Partikelkonzentration von 1000 mg/kg TS keine hemmenden Wirkungen auf die Nitrifikation. Auch die Atmungsaktivität des Belebtschlamm wurde nicht durch Nanopartikel gehemmt.

Untersuchungen der Gesamtmetallgehalte in bayerischen Klärschlammproben aus den Jahren 2008 und 2010 ergaben in mehreren Kläranlagen einen Anstieg der Silber und Titan-Werte im Jahr 2010. Eine Ursache hierfür kann die Zunahme von silber- bzw. titanhaltigen Produkten auf dem deutschen Markt sein. Bei Zink und Kupfer war kein eindeutiger Trend feststellbar.

Analytische Verfahren zur physikalischen und chemischen Charakterisierung sowie zur quantitativen Bestimmung von Nanopartikeln in Umweltproben sind eine Schlüsselvoraussetzung für die Risikobewertung. Im Rahmen dieses Projekts wurde überprüft ob die derzeit vorhandenen Methoden für die Quantifizierung und Charakterisierung der in der Umwelt vorkommenden synthetischen Nanopartikel geeignet sind. Dabei wurde die Asymmetrische Fluss-Feldfluss-Fraktionierung in Kombination mit induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (AF4-ICP/MS) getestet. Für die Nanopartikelbestimmung in wässrigen Umweltproben hat sich diese Messmethode als geeignet erwiesen.

6 Anhang

Synthetisches Abwasser zur Ernährung der Mikroorganismen

Für die Herstellung der Nährlösungen wurden Chemikalien der Reinheitsstufe „zur Analyse“ sowie vollentsalztes Wasser (VE) verwendet.

Synthetisches Abwasser wurde immer für 6 Laborkläranlagen hergestellt. Für jede Anlage wurden 2 l Nährlösung pro Woche benötigt. In Tabelle 8 ist die Zusammensetzung für 12 l Nährlösung angegeben.

Tabelle 8: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers

Nr.	Substanz	Menge
1.	Natriumchlorid	3,16 g
2.	Dikaliumhydrogenphosphat	12,6 g
3.	Harnstoff	13,5 g
4.	Fleischextrakt	49,5 g
5.	Pepton aus Casein, pankr. verdaut	72,0 g
6.	Natriumacetat	3,28

Alle Substanzen wurden nacheinander in ein 5l Becherglas eingewogen und auf einem heizbaren Magnetprüher bei ca. 60 -70 °C vollständig in Lösung gebracht. Die abgekühlte Lösung wurde auf 6 Flaschen aufgeteilt. Jede Flasche wurde dann mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 2 l aufgefüllt. Vor dem Einsatz wurden die Lösungen in einem Autoklaven bei 121 °C ca. 5 Stunden dampfsterilisiert.

Dispergierung der Nanopartikel

Stammsuspension

Zur bessere Dispergierung der pulverförmigen Nanopartikel wurde zunächst eine Stammsuspension für jede Partikelart hergestellt. Dafür wurden 300 mg der Nanopartikel in eine Porzellan-Reibschale gegeben, mit etwas Wasser übergossen und gut durchmischt. Wichtig ist, dass das gesamte Pulver gut mit Wasser bedeckt ist. Die Partikelmischung muss mindestens 48 Stunden abgedeckt stehen, damit die Partikeloberflächen durch das Wasser vollständig benetzt werden.

Danach werden die Nanopartikel in nassem Zustand mit einem Pistill zerrieben um die Agglomerate aufzubrechen. Die feinen Nanopartikel werden in einem Liter VE-Wasser suspendiert und 4 Stunden im Ultraschallbad behandelt.

Dosierlösung

Zur Herstellung der Dosiersuspension wurde die Stammsuspension entsprechend verdünnt. Vor der Verdünnung ist eine 30-minütige Ultraschallbehandlung notwendig. Wegen der niedrigeren Konzentrationen der Dosiersuspensionen sind die Nanopartikel sterisch stabilisiert und bleiben ca. 10 Tage stabil. Die Dosiersuspensionen wurden alle 6 Tage neu angesetzt.

Die Nano-TiO₂-, ZnO- und CuO- Stammsuspensionen wurden im LfU-Labor hergestellt. Die Nano-Ag-Stammsuspensionen wurden von der Fa. „Nanoparticular GmbH“ (Hamburg) bezogen.

Tabelle 9: Nanopartikel-Konzentrationen in Stammlösungen, Dosierlösungen und im Abwasser der Laborkläranlagen

Nanopartikel	Stammsuspension-Konzentration	Dosiersuspension-Konzentration	Abwasser-Konzentration
Nano-TiO ₂	300 mg Ti/l	15 mgTi/l	300 µgTi/l
Nano-ZnO	300 mg Zn/l	15 mgZn/l	300 µgZn/l
Nano-CuO	300 mg Cu/l	7,5 mgCu/l	150 µgCu/l
Nano-Ag	100 mg Ag/l	500 µgAg/l	10 µgAg/l

Mikrowellenunterstützter Druckaufschluss

Für den Aufschluss wurden Chemikalien der Reinheitsstufe „Suprapur“ verwendet, als Wasser kam Ultrapur-Wasser (UPW) zum Einsatz.

Königswasseraufschluss für Klärschlamm zur Metallbestimmung (DIN EN ISO 1146).

Der Aufschluss des Klärschlammes wurde in TFM-Aufschlussgefäßen durchgeführt. 500-1000 mg Klärschlammpulver wurden mit einer Mischung aus 9 ml HNO₃ (65 Gew.-%) und 3 ml HCl (37 Gew.-%) versetzt. Die Mischung blieb ca. eine Stunde stehen, damit die Vorreaktionen ablaufen können. Die Gefäße wurden dann verschlossen und im Mikrowellengerät aufgeschlossen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die titanhaltigen Proben geöffnet und mit 2 ml H₂SO₄ (96 Gew.-%) versetzt. Die Gefäße wurden wieder verschlossen und die zweite Aufschlussstufe gestartet. Das Aufschlussprogramm ist in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: Programm für den mikrowellenunterstützten Druckaufschluss

Nr.	Zeit	Energie	Temperatur
1.	1 min	900 W	75 °C
2.	4 min	900 W	180 °C
3.	10 min	900 W	180 °C
4.	20 min	0 W	Abkühlen

Die Aufschlusslösungen wurden in 50 ml Glasskolben überführt und mit ultrareinem Wasser aufgefüllt.

Säureaufschluss für Wasserproben (DIN EN ISO 11885: AbwV BGBl. 1, Nr.74., 2002)

Für den mikrowellenunterstützten Aufschluss der Ablauf- bzw. Dosierlösungen wurden 10-30 ml Proben, 5 ml HNO₃ (65 Gew.-%) und 2 ml H₂O₂ (31 Gew.-%) in die Aufschlussgefäße gegeben und 15 Minuten im Mikrowellengerät aufgeschlossen. Das Leistungsprogramm für den Aufschluss ist in Tabelle 10 angegeben. Die Aufschlusslösungen wurden in 50 ml Glasskolben überführt und mit ultrareinem Wasser aufgefüllt.

Nährmedium für die Nitrifikation (DIN EN ISO 9509 : 1995)

Für die Herstellung der Nährlösungen und Reagenzien wurden Chemikalien der Reinheitsstufe „zur Analyse“ verwendet und VE-Wasser.

Tabelle 11: Konzentration des Referenzinhibitors.

Nr.	Substanz	Konzentration
1.	Allylthioharnstoff	1,16 g/l

Tabelle 12: Zusammensetzung der Nährlösung.

Nr.	Substanz	Konzentration
1.	Natriumhydrogencarbonat	5,04 g/l
2.	Ammoniumsulfat	2,65 g/l

Nährmedium für den Respirationshemmtest (OECD 209 : 1984)

Für die Herstellung der Nährlösungen und Reagenzien wurden Chemikalien der Reinheitsstufe „zur Analyse“ verwendet, als Wasser kam VE-Wasser zum Einsatz.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Nährlösung

Nr.	Substanz	Konzentration
1.	Trypton/Pepton aus Casein	16,0 g/l
2.	Fleischextrakt	11,0 g/l
3.	Harnstoff	3,0 g/l
4.	Natriumchlorid	0,7 g/l
5.	Calciumchloriddihydrat	0,4 g/l
6.	Magnesiumsulfatheptahydrat	0,20 g/l
7.	Dikaliumhydrogenphosphat	2,8 g/l

Die Nährlösung wurde 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Herstellung der Referenzinhibitorlösung

Für die Herstellung der Referenzinhibitorlösung wurden 0,5 g 3,5-Dichlorphenol in 10 ml 1 N Natronlauge gelöst, und mit destilliertem Wasser ungefähr 30 ml verdünnt. Unter Rühren wurde 1 N Schwefelsäure zugegeben, bis sich ein Niederschlag zu bilden beginnt (ca. 8 ml). Die Lösung wurde mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Alle Lösungen wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt.

Verlängerter Respirationshemmtest

Das verwendete Testmedium setzt sich aus vier unterschiedlichen Lösungen zusammen. Im Allgemeinen werden für 1000 ml Testmedium 100 ml Lösung a) und je 1 ml Lösungen b) bis d) benötigt, wobei der Rest mit Reinstwasser aufgefüllt wird. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ergibt sich wie folgt:

Tabelle 14: Zusammensetzung der Nährlösung a)

Nr.	Substanz	Konzentration
1.	Kaliumdihydrogenphosphat	8,5 g
2.	Dikaliumhydrogenphosphat	21,75 g
3.	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	33,4 g
4.	Ammoniumchlorid	0,5 g
5.	Reinstwasser	auf 1000 ml auffüllen

Tabelle 15: Zusammensetzung der Nährlösung b)

Nr.	Substanz	Konzentration
1.	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	22,5 g
2.	Reinstwasser	auf 1000 ml auffüllen

Tabelle 16: Zusammensetzung der Nährlösung c)

Nr.	Substanz	Konzentration
1.	Calciumchlorid-Dihydrat	36,4 g
2.	Reinstwasser	auf 1000 ml auffüllen

Tabelle 17: Zusammensetzung der Nährlösung d)

Nr.	Substanz	Konzentration
1.	Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	0,25 g
2.	Reinstwasser	auf 1000 ml auffüllen

Gesamtmetallgehalte der untersuchten wässrigen Umweltproben

Tabelle 18: Gesamtmetallgehalte der untersuchten wässrigen Umweltproben (ICP/MS-Analyse)

Nr.	Al	Ca	Ti	Fe	Ni	Cu	Zn	Ag	Ce	Mo
	µg/l	mg/l	ng/l	mg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	ng/l	µg/l
1.	21,2	57,4	n.n	0,1	0,4	1,1	1,4	0,05	114	1,5
2.	76,9	49,0	3,2	0,1	0,4	2,1	9,1	0,01	329	1,7
3.	57,6	44,8	0	0,1	0,3	0,9	1,7	0,08	1,9	1,9
4.	136	56,0	6,3	0,1	0,5	6,6	28,7	0,01	174	0,7
5.	509	73,6	9,5	0,5	1,0	1,5	2,8	0	1,2	1,01
6.	12,1	41,0	0	0,01	0,2	1,5	2,6	0	0	0,2
7.	2886	15,5	138,0	1,3	4,4	9,6	7,9	0,03	8538	0,2
8.	113	48,3	0	0,1	1,1	11,3	13,2	0,08	163	1,2

Probenahmestellen

1. Donau, Neuburg, SONAX GmbH & Co
2. Lech, Meitingen, SGL, Carbon GmbH
3. Lech, Gersthofen, Clariant GmbH
4. Ammersee, Strandbad St. Alban
5. Isar-Loisach Einmündung, zw. Wolfratshausen und Icking
6. Starnberger See, Ambacher Erholungsgebiet
7. Lysimeter-Sickerwasser, LfU Wielenbach
8. Ablauf, Kläranlage Weilheim-Ammer

7 Verwendete Abkürzungen

AF4	<i>Asymmetric-Flow Field-Flow-Fractionation</i>
BSB ₅	biochemischer Sauerstoffbedarf für 5 Tage
c	Konzentration
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
d	Tag
DOC	gelöster organisch gebundener Kohlenstoff
DIN	Deutsches Institut für Normung
EN	Europäische Normen
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ISO	Internationale Organisation für Normung
NP	Nanopartikel
NH ₄ -N	Ammoniumstickstoff
NO ₃ -N	Nitratstickstoff
o-TS	organischer Trockensubstanzgehalt des Schlammes
PVP	Polyvinylpyrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskopie
TNb	<i>Total Nitrogen bound</i>
TS	Trockensubstanzgehalt des Schlammes
VE	vollentsalztes Wasser

8 Projektbegleitende Aktivitäten

1. Erkenntnisse aus dem Projekt sind in die Beantwortung von zwei Landtagsanfragen zur Nanotechnologie eingeflossen:
 - Landtagsanfrage „Risiken durch Nanosilber“ vom 29.07.2010
 - Landtagsanfrage „Zukunft der Nanotechnologie in Bayern: Chancen für Umwelt und Gesundheit verantwortungsvoll nutzen und fördern“ vom 14.10.2010
2. Im Projektzeitraum wurden zwei UBA-Fachgespräche besucht:
 - Umweltrisiken von Nanomaterialien: Untersuchung des Verhaltens ausgewählter Nanomaterialien unter Umweltbedingungen in Abhängigkeit von Form, Größe und Oberflächengestaltung, 14.10.2011.
 - Anwendung zweier am häufigsten verwendeter Nanomaterialien wie Titandioxid und Silber in den grundlegenden Testverfahren zur Charakterisierung dieser Substanzen. Prüfung eines ausgewählten Nanomaterials (Titandioxid) hinsichtlich seiner ökotoxikologischen Langzeitwirkung – Anpassung der Prüfverfahren, 17.11.2011.
3. Organisation und Durchführung der Fachtagung „Synthetische Nanopartikel in der Umwelt“, 27.11.2012, München
4. Veröffentlichungen:
 - M. Maier, M. Letzel, M. Wegenke: „Verhalten von Nanopartikeln in Kläranlagen“, Mitt Umweltchem Ökotox, Nr.3, 62 (2012)
5. Vorträge:
 - „Untersuchungen zum Verhalten von Silber-Nanopartikeln in der Umwelt“, LGL-Fachtagung „Chancen und Risiken der Nanotechnologie“; 13.12.2010
 - „Verhalten von Nanopartikeln in Kläranlagen“, LfU-Fachtagung „Synthetische Nanopartikel in der Umwelt“, 27,11,2012
6. Poster:
 - „Giftzwerge? Der Einfluss von Silber-Nanopartikeln auf die Umwelt“, Tag der offenen Tür, LfU-Wielenbach, 14. 07.2012
 - „Verhalten von Nanopartikeln in Kläranlagen“, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft „Wasser 2012“, 14.05.2012

9 Literatur

- [1] S. Sepur, *Nanotechnologie: Grundlage und Anwendungen*, Hannover: Vincentz, 2008.
- [2] B. Novak, T.D. Buchelli, *Occurrence, behaviour and effects of nanoparticles in the environment*, Environmental Pollution, 150 (2007) 5.
- [3] A. Scherzberg, J.H. Wendorf, *Nanotechnologie*, De Gruyter Recht Verlag, Berlin, 2008.
- [4] Amtsblatt der Europäischen Union, *Empfehlung der Kommission zur Definition von Nanomaterialien*, 18.10.2011.
- [5] Woodrow Wilson Database, <http://www.nanotechproject.org>.
- [6] Umweltbundesamt, *Nanotechnik: Chancen und Risiken für Mensch und Umwelt*, 2006. Hintergrundpapier, in <http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-presse/hintergrund/nanotechnik.pdf>, 07.01.2008.
- [7] Sachverständigenrat für Umweltfragen (SRU), *Vorsorgestrategien für Nanomaterialien*, Sondergutachten, Hausdruck, 2011.
- [8] K. Tiede, A. B. A. Boxall, S. P. Tear, J. Lewis, H. David, M. Hassellöv, M. (2008): *Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment*. Food Additives and Contaminants 25 (7) (2008) 795.
- [9] T. Kuhlbusch, C. Nickel, *Emissionen von Nanopartikeln aus ausgewählten Produkten in ihrem Lebenszyklus*, Bericht, 2010 in <http://www.uba.de/uba-info-medien/4028.html>.
- [10] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, *Toxic potential of materials at the nanolevel*, Science 311 (2006) 622.
- [11] Nanokommission der deutschen Bundesregierung, *Umgang mit Nanotechnologien*, 2008.
- [12] C. Som, B. Nowack, P. Wick, H. Krug, *Nanomaterialien in Textilien: Umwelt-, Gesundheits- und Sicherheits-Aspekte*, EMPA –Bericht, 2010.
- [13] T. M. Benn, P. Westerhoff, *Nanoparticles Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics*, Environ. Sci. Technol., 42 (11) (2008) 4133.
- [14] M. Burkhard, S. Zuleeg, B. Etter, T. Marti, J. Landert, J. Eugster, M. Boller, R. Kägi, B. Sinnet, H. Siegriest, *Nanosilber in Fassadenbeschichtungen. Auswaschung im Vergleich mit Titandioxid und organischen Bioziden*, EMPA-Bericht, 2009.
- [15] G. Fischer, *Biologie der Abwasserreinigung*, Verlag Stuttgart, 1985.
- [16] J. R. Morones, *The bactericidal effect of silver nanoparticles*, Nanotechnology 16 (2005) 2346.
- [17] S. Schrivastava, *Characterization of enhanced antibacterial effect of novel silver nanoparticles*, Nanotechnology, 18 (2007) 225103.
- [18] O. Choi, K.K. Deng, N.J. Kim, *The inhibitory effect of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride on microbial growth*, Water Research, 42 (2008) 3066.
- [19] A. G. Rincon, C. Pulgarin, *Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on E. coli K12 photocatalytic inactivation by TiO₂: Implications in solar water disinfection*. Applied Catalysis B: Environmental 51 (4) (2004) 283.
- [20] L.K. Adams, D.Y. Lyon, P.J. Alvarez, *Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions*, Water Research 40 (19) (2006) 3527.
- [21] M. Heinlaan, A. Ivask, I. Blinova, H.-C. Dubourguier, A. Kahru, *Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus*, Chemosphere, 71 (7) (2008) 1308.
- [22] G. Ren, D. Hu, E. W. C. Cheng, M. A. Vargas-Reus, P. Reip, R. P. Allaker, *Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications*, International Journal of Antimicrobial Agents, 33 (6) (2009) 587.
- [23] O. Mahapatra, M. Bhagat, C. Gopalakrishnana & Kantha D. Arunachalam, *Ultrafine dispersed CuO nanoparticles and their antibacterial activity*, Journal of Experimental Nanoscience 3 (3) (2008) 185.
- [24] L. Hartmann, *Biologische Abwasserreinigung*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1992.
- [25] K. Imhoff, K. R. Imhoff, *Taschenbuch der Stadtentwässerung*. 28. Auflage, R. Oldenbourg, Verlag München Wien, 1993.
- [26] W. Gujer, *Siedlungswasserwirtschaft*. 3. Auflage. Springer Verlag, 2007.

- [27] G. Schmid, *Large clusters and colloids-metals in the embryonic state*, Chem. Rev., 92 (1992) 1709.
- [28] A. Henglein, M. Giersig, *Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate*, J. Phys. Chem. B, 103 (1999) 9533.
- [29] Z. Zhang, B. Zhao, L. Hu, J., PVP protective mechanism of ultrafine silver powder synthesized by chemical reduction method, Solid State Chem., 121 (1995)105.
- [30] Kosmetika: faltenfrei dank Nano?, BUND, http://www.bund.net/themen_und_projekte/nanotechnologie/einsatzbereiche/kosmetika/
- [31] M.A. Green, K. Emery, D. L. King, D.L. Hisikawa, W. Warta, Progress in Photovoltaics: Research and Applikation, 14 (2006) 45.
- [32] V. Martin, G. Gregersen, Nanostrukturierte Materialien zur photokatalytischen Wasserstoffherstellung, 2012.
- [33] H.D. Jang, S.-K. Kim and S.-J. Kim, *Effect of Particle Size and Phase Composition of Titanium Dioxide Nanoparticles on the Photocatalytic Properties*, Journal of Nanoparticle Research, 3(2-3) (2001) 141.
- [34] H. Jensen, K. D. Joensen, J.-E. Jørgensen, J. S. Pedersen and G. Søgaard, *Characterization of nanosized partly crystalline photocatalysts*, Journal of Nanoparticle Research, 6(5) (2004) 519.
- [35] SCCNFP/0649/03, Opinion concerning Zink oxide, Colipan 0 S 76, Adopted by the SCCNFP during the 24th plenary meeting of 24-25 June 2003.
- [36] SCCP: preliminary opinion on safety of nanomaterials in cosmetic products, Approved by the SCCP for public consultation 12th plenary of 19 June 2007 (http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_099.pdf).
- [37] C. Hanley, J. Layne, A. Punnoose, K.M. Reddy, I. Coombs, A. Coombs, K. Feris, D. Wingett, *Preferential killing of cancer cells and activated human T-cells using ZnO nanoparticles*. Nanotechnology 19 (29) (2008), 295103.
- [38] J. Beddow, G. Singh, M. Blanes, K. Molla, I. Perelshtein, A. Gedanken, E. Joyce, T. Mason, *Sonochemical coating of textile fabrics with antibacterial nanoparticles*, International Congress on Ultrasonics, Gdansk, 2011.
- [39] G. Ren, D. Hu, E. W. Cheng, M. A. Vargas-Reus, R. P. Allaker, *Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications*, Int. J. Antimicrob. Agents., 33 (6) (2009) 587.
- [40] C. Saison, F. Perreault, F. Diagle, Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, Aquatic Toxicology, 96 (2010) 109.
- [41] F. Perreault, A. Oukarroum, L. Pirastu, L. Sirois, W. G. Matias, R. Popovic, *Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity using Chlorophyll Fluorescence Imaging in Lemna gibba*, Journal of Botany, (2010), 9.
- [42] P.B. Himelfarb, F.E. Wawner, J.A. Bieser, S. N. Vines, *Oxidation states of copper during reduction of Cupric Oxide in Methanol Catalysts*, J. Catal. 83 (1983) 469.
- [43] M.M. Shafer, J.T. Overdier, D.E. Armstrong, *Removal, partitioning, and fate of silver and other metals in wastewater treatment plants and effluent-receiving streams*. Environ Toxicol Chem., 17 (1998) 630.
- [44] M. Kemper, *Umweltexposition von biozidem Silber aus Produkten*, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (TH), 2008.
- [45] M.A. Kiser, P. Westerhoff, T. Benn, Y. Wang, J. Perez-Rivera, K. Hristovski, *Titanium Nanomaterial Removal and Release from wastewater Treatment Plants*, Environmental science & technology, 43 (17) (2009) 6757.
- [46] Broschüre „Wasser im Hamburg“, Messungen am Klärwerk Köhlbrandhörf, 2001
- [47] M. Clara, M. Denner, O. Gans, S. Scharf, G. Windhoffer, M. Zessner, *Emissionen organischer und anorganischer Stoffe aus kommunalen Kläranlagen*, Umweltbundesamt, 2009.
- [48] E. Hamel, *Untersuchungen zum Verhalten von Schwermetallen in kommunalen Kläranlagen unter besonderer Berücksichtigung der Metallanreicherung an Belebtschlamm*, Dissertation, 2001.
- [49] Broschüre „Der Filter für den Straßenablauf“, Funke Kunststoffe GmbH, http://www.sicker.de/daten/info/INNILET_Broschüre_Funke_2010.

- [50] P. Koppe, A. Stozek, *Kommunales Abwasser*, 4. Auflage, Vulkan-Verlag 1999.
- [51] Hach Lange GmbH; Küvettenschnelltests LCK (CSB, NO₃-N, NH₄-N); Düsseldorf; URL: www.hach-lange.com.
- [52] K. Mudrack, S. Kunst, *Biologie der Abwasserreinigung*. 4. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994.
- [53] B. Singleton, *Einführung in die Bakteriologie*. Quelle und Meyer, Wiesbaden, 1995.
- [54] W. Fröhling, K. Rönnpagel, W. Ahlf, *Nitrifikanten als Indikator für Bodekontaminationen - Effekte von Umweltchemikalien auf Mikroorganismen als Beurteilungsgrundlage für Toxizität und stoffliche Verfügbarkeit*. SETAC Germany, Jahrestagung, Hamburg, 2000.
- [55] T. D. Brock, J. M. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, J.: Brock *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin-Heidelberg, 2000.
- [56] I. Sondi, B. Salopek-Sondi B, *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria*. Journal of Colloid and Interface Science, 275 (2004) 177.
- [57] S. Pal, Q. K. Tak, J. M. Song J.M., *Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 1721.
- [58] P. D. Howe, S. Dobson, *Silver and silver compounds: environmental aspects*. Concise international Chemical Assessment Dokument 44, world health organisation, Geneva 2002.
- [59] E. M. Hotze, T. Rhenrat, G. V. Lowry, *Nanoparticle Aggregation: Challenges to Understanding Transport and Reactivity in the Environment*, Journal of Environmental quality, 39 (2010) 1909.
- [60] <http://www.kma-online.de/> Artikel: BioGate sieht weiterhin riesigen Markt für seine Produkte
- [61] Y. Zhang, Y. Chen, P. Westerhoff, k. Hristovski, J. C. Crittenden, *Stability of commercial metal-oxide nanoparticles in water*, Water Research, 42 (8-9) (2008) 2204.
- [62] K. Hund-Rinke, F. Marscheider-Weidemann, M. Kemper, *Beurteilung der Gesamtumweltexposition von Silberionen aus Biozid-Produkten*, Umweltbundesamt, 2008.
- [63] L. K. Limbach, R. Bereiter, E. Müller, R. Krebs, R. Gälli, W. J. Stark, *Removal of oxid nanoparticles in a model wastewater treatment plant: influence of agglomeration and surfactant on clearing efficiency*. Environmental Science & Technology 42(15) (2008) 5828.
- [64] M. Burkhardt, S. Zuleeg, R. Kägi, B. Sinnet, J. Eugster, M. Bollen, H. Siegrist, *Verhalten von nanosilber in Kläranlagen und dessen Einfluss auf die Nitrifikationsleistung in Belebtschlamm*, 22 (5) (2010) 529.
- [65] B. L. Dasinger, H. A. McArthur, J. P. Lengen, A. A. Smogowicz, *Composition and rheological properties of extracellular polysaccharids produced by Pseudomonas spec*, Appl Environ. Microbiol. 60 (1994) 1364.
- [66] J. L. Povani, M. W. Tenney, *Bacterial exocellular polymers and biological flocculation*, JWPCF 44 (1972) 414.
- [67] M. Kemper, *Umweltexposition von biozidem Silber aus Produkten*, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (TH), 2008.
- [68] H. J. Bachmann, T. Candinas, G. M. Chassot, D. Herren, T. Kupper, *Beobachtung des Stoffwechsels der Anthroposphäre im Einzugsgebiet ausgewählter Abwasserreinigungsanlagen*. Forschungsprojekt SEA. Abwasserreinigungsanlagen (SEA), Forschungsanstalt für Agrarökologie und Landbau, Institut für Umweltschutz und Landwirtschaft, Liebefeld, Bern, 1999.
- [69] *Klärschlammverordnung und .analysen*, http://geodaten.guetersloh.de/umblick_neu/index.php?id=113
- [70] *Gemeinsames Bericht der Bayer. Landesämter für Umweltschutz und für Wasserwirtschaft über die Untersuchungen der Klärschlamm-trocknungsanlage des Abwasserzweckverbands Füssen*, 2003.
- [71] Merkblatt Nr- 4.6/1, *Schwermetalle im kommunalen Abwasser und Klärschlamm*, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, 2000.
- [72] www.nanoproducts.de, *Informationsportal für Nano-Produkte*.
- [73] Hessische Ministerium für Wirtschaft , Verkehr und Landesentwicklung, *NanoAnalytik*, Anwendung in Forschung und Praxis , Band 16, www.hessen-nanotech.de

