

Freie Universität Berlin
Fachbereich Geowissenschaften

Einfluss der Klärschlammvorbehandlung durch Sulfidierung auf die Bioverfügbarkeit von Silbrenanomaterialien bei der anschließenden Klärschlammverwertung auf landwirtschaftlichen Flächen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium

Vorgelegt von
Marco Kraas M. Sc.

Berlin, 2017

1. Gutachter: Professor Dr. mult. Dr. h. c. Konstantin Terytze
Freie Universität Berlin
Fachbereich Geowissenschaften

2. Gutachter: Prof. Dr. habil. Roland Kubiak
Universität Koblenz – Landau
Fachbereich Natur- und Umweltwissenschaften

3. Gutachter: Prof. Dr. Michael Schneider
Freie Universität Berlin
Fachbereich Geowissenschaften

Datum der Disputation: 30.10.2017

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre weiterhin, dass die Dissertation bisher nicht in dieser oder anderer Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Schmallenberg, den 22.11.2017

Marco Kraas M.Sc.

Curriculum vitae

Aus Datenschutzgründen entfällt der Lebenslauf in der Online-Version.

Aus Datenschutzgründen entfällt der Lebenslauf in der Online-Version.

Aus Datenschutzgründen entfällt der Lebenslauf in der Online-Version.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. Januar. 2014 bis zum 31. Dezember 2016 am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME unter der fachlichen Betreuung von Frau Dr. Kerstin Hund-Rinke in Schmallenberg angefertigt. Besonderer Dank gilt daher Frau Dr. Hund-Rinke für die Möglichkeit meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen, für die fachliche Betreuung, die Unterstützung, ihr außerordentliches Engagement sowie ihr Vertrauen während meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. mult. Dr. h. c. Konstantin Terytze möchte ich an dieser Stelle meinen Dank dafür aussprechen, dass er meine Arbeit wissenschaftlich betreut hat und mir die Promotion in seiner Arbeitsgruppe an der Freien Universität Berlin ermöglicht hat, sowie für die Begutachtung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. habil. Roland Kubiak, Frau Prof. Dr. Wiebke Bebermeier und Herrn Prof. Dr. Michael Schneider danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation.

Den Mitarbeitern des Fraunhofer IME, ganz besonders Dr. Karsten Schlich, Theo Görtz, Katja Mock, Ruben Schlinkert, Maria Brüggemann, Franziska Wege, Katarina Kroll und Marcel Celina möchte ich sowohl für die fachliche und praktische Unterstützung im Labor als auch für das freundschaftliche Verhältnis und die angenehme gemeinsame Zeit am IME in Schmallenberg danken.

Der Deutschen Bundesstiftung Umwelt danke ich für die finanzielle Unterstützung, meinem Betreuer und Koordinator des Stipendenschwerpunktes „Integrierte Chemikalienbewertung“ Dr. Maximilian Hempel für seine Anregungen, die Leitung des Stipendenschwerpunktes, die stets unkomplizierte Kommunikation und Bearbeitung meiner Anliegen.

Herrn Dr. Ralf Kägi und Brian Sinnet von der EAWAG danke ich für die Kooperationsbereitschaft, die konstruktive Kritik und die Zusammenarbeit an den elektronenmikroskopischen Untersuchungen an der ETH Zürich. Martin Hoppe und Jonas Schubert danke ich für den fachlichen Austausch, die analytische Unterstützung und die Synthese der Nanomaterialien.

Den Praktikanten und Hilfskräften des Fraunhofer IME danke ich für die Übernahme unterschiedlichster Aufgaben, die meine Arbeitsbelastung reduziert haben.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung sowie ihr entgegengebrachtes Vertrauen und Verständnis während der Zeit der Promotion.

Glossar

Absetzbecken	Becken in der Abwassertechnik, in dem ungelöste Stoffe durch Sedimentation abgetrennt werden (Streit, 1991).
AgNM	Silbernanomaterialien.
Anaerobbecken	Entspricht: Denitrifikationsstufe.
Anoxisch	Bedingungen (v.a. in der Abwassertechnik), bei denen kein freier, molekularer Sauerstoff vorliegt (Streit, 1991).
Apoplast	In pflanzlichem Gewebe die Gesamtheit der Zellwände und des Interzellularraums.
Belüftungsbecken	Entspricht: Nitrifikationsstufe.
Biofilm	Film aus lebenden und abgestorbenen Mikroorganismen an den Grenzflächen von zwei Phasen (www.wasser-wissen.de, 2000).
Bioverfügbarkeit	Grad, bis zu dem Chemikalien im Boden durch menschliche oder ökologische Rezeptoren absorbiert oder metabolisiert werden oder für den Austausch zwischen biologischen Systemen zur Verfügung stehen (DIN EN ISO 17402, 2008).
Denitrifikationsstufe	Schritt in der Abwasseraufbereitung, bei dem, aufgrund von anoxischen bis anaeroben Bedingungen, Nitrat von denitrifizierenden Mikroorganismen zu molekularem Stickstoff reduziert wird.
DGGE	(Engl. denaturing gradient gel electrophoresis) Denaturierungsgradientengelelektrophorese; Verfahren zur Auftrennung von DNA oder RNA in Abhängigkeit von ihren Bestandteilen an Aminosäuren (Mülhardt, 2013).
Dispersantenkontrolle	Kontrollbehandlung, bei der nur der Dispersant, nicht der eigentliche Testgegenstand, geprüft wird, um einen Effekt des Dispersanten auszuschließen.
DLS	(Engl. dynamic light scattering) Dynamische Lichtstreuung; analytische Methode zur Partikelgrößenbestimmung.

DOC	(Engl. dissolved organic carbon) Gelöster organischer Kohlenstoff (Streit, 1991).
EC₅₀	Mittlere Konzentration einer Substanz, bei der 50 % des Effektes (z.B. Hemmung der Aktivität) innerhalb der Versuchsdauer auftreten (Fent, 2007).
EDX	(Engl. energy dispersive X-ray spectroscopy) Energiedispersive Röntgenspektroskopie.
Einwohnergleichwert	Auch Einwohnerwert; Wert zur Bemessung von Anlagen in der Abwasserwirtschaft (www.wasser-wissen.de , 2000).
Frischmasse	Gewicht des feuchten Bodens.
Gelelektrophorese	Verfahren zur Auftrennung von DNA oder RNA basierend auf der Anzahl der Basenpaare.
GLP-Studien	Studien, die nach den Regeln der Guten Laborpraxis (OECD No.1, 1997) durchgeführt werden.
Hydrodynamischer Durchmesser	Theoretischer Durchmesser eines Partikels, der sich aus der Sedimentationsgeschwindigkeit in einem flüssigen Medium ergibt.
ICP MS	(Engl. inductively coupled plasma mass spectrometry) Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma; Standardmethode der anorganischen Analytik.
ICP OES	(Engl. inductively coupled plasma optical emission spectrometry) Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma; Standardmethode der anorganischen Analytik.
Klärschlammdeinfektion	Entspricht: Klärschlammhygienisierung
Klärschlammhygienisierung	Sammelbegriff für Verfahren zur Reduktion pathogener Keime im Klärschlamm.
Kontrolle	Kontrollbehandlung in ökotoxikologischen Studien ohne Testgegenstand; in der vorliegenden Dissertation ein Gemisch aus Boden und nicht beaufschlagtem Klärschlamm.

Kontrolle Boden	In der vorliegenden Dissertation reiner Boden als Kontrollbehandlung in ökotoxikologischen Studien, ohne Klärschlamm und Testgegenstand.
Limittest	(Öko)toxikologische Studie, in der nur die Maximalkonzentration eines Testgegenstandes untersucht wird.
Lysimeter	Anlage zum Erfassen des Wasserhaushalts, als Grundlage zur Mengen- und Stoffbilanz in Abhängigkeit von Boden, Gestein, Bewuchs, lokalem Klima und anderen Randbedingungen (DIN 4049, 1992).
Mesophile Faulung	Klärschlammfäulung in einem Temperaturbereich von 30 bis 40°C (Resch and Schatz, 2010).
Mikroflora	Bodenflora aus Strahlenpilzen, Pilzen, Algen und Flechten, generell weniger als 0,2 mm groß (hypersoil.uni.muenster.de, 2004).
nestedPCR	Geschachtelte Polymerase-Kettenreaktion.
Nitrifikationsstufe	Schritt in der Abwasseraufbereitung, bei dem unter aeroben Bedingungen organischer Stickstoff über Ammoniak bzw. Ammonium zu Nitrat erfolgt. Gleichzeitig findet hier die gesamte aerobe Mineralisierung der organischen Substanz statt.
NM	Nanomaterial, „natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand als Aggregat oder als Agglomerat enthält und bei dem mindestens 50 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben“ (Europäische Union, 2011).
NOEC	(Engl. no observed effect concentration) Die höchste Konzentration einer Substanz, bei der gerade noch kein (schädlicher) Effekt auftritt (Greim and Deml, 2005).

PCR	(Engl. polymerase chain reaction) Polymerase-Kettenreaktion; Laborverfahren zur Vervielfältigung von DNA oder RNA.
PEC	(Engl. predicted environmental concentration) Erwartete oder berechnete Umweltkonzentration (Elstner et al., 1990).
pH-Wert	Charakterisiert den Säure-Base-Zustand von Böden (Ad-Hoc-AG, 2005).
poly dispersity index	Wert zur Charakterisierung einer Dispersion in mono- bis polydispers.
PSD	(Engl. particle size distribution) Partikelgrößenverteilung in einer Probe.
Redoxpotential	Maß für oxidierende oder reduzierende Eigenschaften eines Systems; Elektronenübertragungspotential (Oehlmann and Markert, 1997).
Schockload	Schlagartige Applikation einer großen Menge Testgegenstand, die zu einer unmittelbaren Reaktion wie Absterben führt.
SEM	(Engl. scanning electron microscopy) Rasterelektronenmikroskopie; ein Verfahren der Elektronenmikroskopie, bei dem die Oberfläche eines Objektes gescannt und über die Sekundärelektronen die Oberfläche einer Probe erfasst wird (Egerton, 2005).
Silbersulfid	(Silberglanz, Argentit) Chemische Formel Ag_2S , in Wasser unlöslich, ein schwarzgefärbtes, wichtiges, natürliches Silbermineral (Streit, 1991).
SRB	Schwefelreduzierende Bakterien, auch Schwefelbakterien genannt, sind in der Lage schwefelhaltige Verbindungen unter anaeroben Bedingungen dissimilativ zu Sulfid zu reduzieren (Streit, 1991).
Sulfidierung	Bildung von Metallsulfiden.
TEM	(Engl. transmission electron microscopy) Transmissionselektronenmikroskopie, Verfahren der

	<p>Mikroskopie, bei der Elektronen anstelle von Licht verwendet werden. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie durchdringen die Elektronen die dünne Probe und werden vom Detektor erfasst (Egerton, 2005). Damit ist es möglich, das Innere einer Probe abzubilden.</p>
TOF SIMS	<p>(Engl. time-of-flight secondary ion mass spectrometry) Bildgebende Analyseverfahren für Oberflächen; vor allem in den Materialwissenschaften angewandt (Sodhi, 2004).</p>
Trockenmasse	<p>Masse des Bodens (oder einer anderen Matrix) ohne Wasser nach Trocknung bei 105°C (Streit, 1991).</p>
Trockensubstanz	<p>Entspricht im Grunde der Trockenmasse, aber hier insbesondere die Masse des Klärschlammes ohne Wasser.</p>
WHK_{max}	<p>Die maximale Wasserhaltekapazität eines Bodens ist die Menge Wasser, die ein Boden gegen die Schwerkraft maximal halten kann.</p>

Kurzzusammenfassung

Als antibakterielle Substanz gelangen Silbbernanomaterialien (AgNM) über Klärschlamm auf landwirtschaftlich genutzte Flächen. Vor ihrer Verwertung gibt es verschiedene Möglichkeiten der Klärschlammaufbereitung, die unterschiedlich auf die Schlämme und die darin enthaltenen AgNM einwirken und potentiell zu unterschiedlichen Ag-Spezies mit veränderter Bioverfügbarkeit führen können. Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet: (I) Welchen Einfluss hat die Klärschlammaufbereitung auf die Bioverfügbarkeit von AgNM (Schwerpunkt Bodenmikroflora)? (II) Welche Faktoren beeinflussen die Sulfidierung von AgNM als „natürliche Detoxifizierung“ wobei die AgNM mit chemischen Verfahren speziiert wurden? (III) Können Laborversuche als Indikatoren für das Verhalten von AgNM im Freiland genutzt werden? Dazu wurden Kläranlagenversuche mit einem sphärischen AgNM und Ag-Referenzmaterialien mit verschiedenen Schwefel- und Silberkonzentrationen im Kläranlagenzulauf durchgeführt, die Klärschlämme unterschiedlich aufbereitet (Direktapplikation, Hygienisierung durch Kalkung, Hygienisierung durch Pasteurisierung und Klärschlammfäulung) und die landwirtschaftliche Verwertung in Labor- und Freilandversuchen simuliert. Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (TEM EDX) zeigten die Sulfidierung der AgNM bereits in der Kläranlage, die weitere Aufbereitung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Ag-Spezies und deren Bioverfügbarkeit. In allen Behandlungen der Langzeitstudien war die Nitrifikation erheblich gehemmt, nur die Hygienisierung durch Kalkung führte indirekt, durch eine Anhebung des Boden-pH-Wertes, zu weniger ausgeprägten Effekten. Dieser Einfluss muss jedoch als zeitlich begrenzte Konditionierung betrachtet werden, sodass die AgNM grundsätzlich bioverfügbar bleiben. Die aufgetretenen Effekte wurden auf instabile, in der Kläranlage sulfidierte AgNM zurückgeführt, aber auch unter Laborbedingungen hergestellte Ag₂S-NM riefen ausgeprägte Effekte hervor. Das bestätigt, dass die Sulfidierung nicht zwangsläufig zu einer vollständigen Detoxifizierung der AgNM führt und die Ökotoxizität nur über längere Versuchszeiträume erfasst werden kann, indem Schwellenwerte der Ionenkonzentration überschritten werden.

In einer Lysimeterstudie über drei Vegetationsperioden von April 2014 bis Juli 2016 traten Hemmungen der Nitrifikation und der Bodenatmung auf, deren Ausmaß zwar geringer als in Laborstudien ausgeprägt, aber über zwei Jahre konstant war und somit auf eine langfristige Wirkung hindeutet. Zudem wurde ein geringfügiger Austrag von Ag über das Sickerwasser und eine Aufnahme in Pflanzenwurzeln detektiert, eine Gefährdung des Grundwassers oder der Nahrungskette kann aufgrund der geringen Konzentrationen ausgeschlossen werden.

Abstract

Silver nanomaterials (AgNM) are used as anti-microbial substances and are immitted on agricultural areas via sewage sludge. Prior to application on the field there are several techniques to reduce pathogens in sewage sludges. These techniques affect the sewage sludges as well as the incorporated AgNM and potentially lead to different Ag-species with a different bioavailability. The following questions were addressed in this dissertation: (I) How does the sewage sludge treatment influence the bioavailability of AgNM (focus soil microflora)? (II) Which are the factors that influence the sulfidation of silver as a “natural antidote”? For this aim, the silver species was determined by chemical methods. (III) Are laboratory studies suitable indicators to assess the behavior of AgNM in the environment? For this purpose, wastewater treatment plant experiments were conducted with a spherical AgNM and various Ag-reference materials. The sewage sludges were treated by four approaches (direct application, hygienisation by liming, hygienisation by temperature and anaerobic digestion) followed by simulation of the agricultural application. Energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis coupled to a transmission electron microscopy revealed that the particles were completely sulfidized after the wastewater treatment. The sewage sludge treatment did not significantly alter their speciation and bioavailability. In all approaches the nitrification process in long-term studies was substantial inhibited, only the setups after hygienisation by liming showed reduced inhibitions, which was related to a mid-term remediation of soil-pH, the AgNM itselfs stay bioavailable. These effects were affiliated to instable AgNM after sulfidation under natural conditions. However, even Ag₂S NM produced in the laboratory led to strong effects. This confirms that the sulfidation did not inevitably lead to a complete detoxification of AgNM and shows that these effects can only be observed in studies with an extended duration, after exceeding thresholds of the ion concentration.

The lysimeter study over three growing seasons from April 2014 until July 2016 revealed an inhibition on the nitrification activity and on the respiratory activity in soils. The magnitudes of effects were less pronounced than in laboratory studies, but constant over the whole test period. Additionally, a slight discharge over the leachate and plant uptake into the roots were detected. Due to the low detected amounts the groundwater and food chain are not endangered.

Inhaltsverzeichnis

Curriculum vitae

Danksagung

Glossar

Kurzzusammenfassung

Abstract

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis:	V
Tabellenverzeichnis:	X
1. Einleitung	11
2. Zielstellungen	13
3. Aktueller Kenntnisstand	16
3.1. Einsatz von AgNM	16
3.2. Ökotoxizität von NM-300K	16
3.3. Bioverfügbarkeit von chemischen Substanzen	17
3.4. Freisetzung und Verbleib von AgNM	19
3.5. Einsatz von Klärschlamm	21
3.6. Klärschlammvorbehandlung	22
3.7. Einfluss der Klärschlammvorbehandlung auf die Bioverfügbarkeit von Silbernanopartikeln – Sulfidierung von AgNM	25
4. Material und Methoden	26
4.1. Chemikalien und Geräte	27
4.2. Nanopartikel NM-300K	27
4.3. Ag-Referenzmaterialien	28
4.4. Testboden	28
4.5. Bodenaufbereitung und Lagerung	29
4.6. Trockenmassebestimmung	30
4.7. pH-Wertbestimmung	30
4.8. Applikationsmethoden und Klärschlammaufbereitung	30
4.8.1. Klärschlammvorbereitung	30

4.8.2. Herstellung der AgNM-Suspension	31
4.8.3. Kläranlagensimulation (OECD Richtlinie 303A)	31
4.8.4. Batchapplikation	33
4.8.5. Klärschlammaufbereitung	35
4.8.6. Applikation in Böden	37
4.9. Inkubation der Böden und Boden- Klärschlammgemische im Labor	38
4.10. Freilandlysimeterversuch	39
4.11. Ökotoxikologische Untersuchungen	42
4.11.1. Funktionelle Diversität: System MicroResp™	42
4.11.2. Funktionelle Diversität: Enzymaktivitätsmuster in Bodenproben mit fluorogenen Substraten (DIN ISO/TS 22939)	44
4.11.3. Potentielle Ammoniumoxidation (ISO 15685)	45
4.11.4. Kohlenstofftransformation (OECD Richtlinie 217)	46
4.11.5. Regenwurmzucht	47
4.11.6. Regenwurmreproduktionstest (OECD Richtlinie 222)	47
4.11.7. Regenwurmflechttest (ISO 17512-1)	48
4.11.8. Pflanzentest (OECD Richtlinie 208)	49
4.12. Statistische Auswertung	50
4.13. Molekularbiologische Untersuchungen	51
4.13.1. Primer	51
4.13.2. DNA-Extraktion	51
4.13.3. RNA-Extraktion	52
4.13.4. Normalisierung der Proben	52
4.13.5. Umschreibung der RNA in cDNA	52
4.13.1. Polymerase-Kettenreaktion, verschachtelte Polymerase-Kettenreaktion und Denaturierungsgradientengelelektrophorese	53
4.14. Chemische Analytik	55
4.14.1. Aufschluss und Messung von Ag-Bodengehalten	55
4.14.1. Aufschluss und Messung von Sickerwasser, Boden- und Pflanzenproben	56
4.14.2. Aufbereitung der Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie	56
4.15. Übersicht der Versuchsreihen mit ihren Testzielen, Testsubstanzen und Konzentrationen sowie den Aufbereitungsmethoden	57

5.	Ergebnisse _____	59
5.1.	Stabilität der NM-300K Stammdispersion _____	59
5.2.	Einfluss von NM-300K, AgNO ₃ und verschiedenen Ag ₂ S auf die Funktionsfähigkeit des Abbaus in der Kläranlage _____	60
5.3.	Einfluss von verschiedenen Klärschlammaufbereitungen auf die Bioverfügbarkeit von AgNM _____	62
5.3.1.	Langzeitversuch 1 _____	62
5.3.2.	Langzeitversuch 2 _____	65
5.4.	Einfluss der verfügbaren Schwefelkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM70 _____	
5.4.1.	Batchversuche _____	70
5.4.2.	Kläranlagensimulation _____	76
5.5.	Einfluss der Ag - Einlaufkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM _____	83
5.5.1.	Ag-Bodengehalte _____	83
5.5.2.	Potentielle Ammoniumoxidation _____	84
5.6.	Bioverfügbarkeit von chemisch synthetisiertem Ag ₂ S _____	92
5.6.1.	Sulfidierung von NM-300K zu Ag ₂ S und Synthese von Ag ₂ S _____	92
5.6.2.	Applikation über Kläranlagensimulation _____	94
5.6.3.	Applikation der reinen Testgegenstände _____	97
5.7.	Übertragbarkeit von Labordaten auf Daten aus Freilandversuchen _____	102
5.7.1.	Klimabedingungen und Bodenbeschaffenheit _____	102
5.7.2.	Ag-Bodengehalte - Verlagerung der AgNM _____	103
5.7.1.	Potentielle Ammoniumoxidation _____	104
5.7.2.	Substratinduzierte Respiration _____	107
5.7.3.	Regenwurmreproduktion und Regenwurmfluchttest _____	110
5.7.4.	Pflanzenbewuchs auf den Lysimetern und Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208111 _____	
5.7.5.	Aufnahme und Verteilung von AgNM in der Pflanze _____	113
6.	Diskussion _____	115
6.1.	Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der Laborkläranlagen _____	115
6.1.1.	Einfluss der AgNM auf die Abbauleistung in der Kläranlage und deren struktureller Diversität _____	115
6.2.	Einfluss von verschiedenen Klärschlammaufbereitungen auf die Bioverfügbarkeit von AgNM _____	117

6.3.	Einfluss der verfügbaren Sulfatmenge auf die Bioverfügbarkeit von AgNM _____	119
6.3.1.	Ag- Bodengehalte und Charakterisierung der AgNM _____	119
6.3.2.	Effekte der sulfidierten AgNM auf die Bodenmikroflora _____	121
6.4.	Einfluss der Ag - Einlaufkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM _____	125
6.5.	Bioverfügbarkeit von chemisch synthetisiertem Ag ₂ S _____	126
6.6.	Übertragbarkeit von Labordaten auf Daten aus Freilandversuchen _____	127
6.6.1.	Effekte auf Bodenmikroorganismen und Pflanzen _____	128
6.6.2.	Verlagerung und Pflanzenaufnahme im Freiland _____	132
7.	Schlussfolgerungen _____	135
8.	Zusammenfassung _____	138
8.1.	Deutsch _____	138
8.2.	Englisch _____	142
9.	Literaturverzeichnis _____	145
10.	Anhang _____	153

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Verfahrensschema der Klärschlammbehandlung. _____	26
Abbildung 2: TEM-Aufnahme von NM-300K in Reinstwasser. _____	28
Abbildung 3: Skizze der Freilandlysimeter. _____	39
Abbildung 4: Zeitleiste der Lysimeterstudie unterteilt in den Freilandteil und Laborteil mit den ökotoxikologischen Bestimmungen und den Probenahmen für die Ag-Analytik der Boden- und Pflanzenproben und der Bewirtschaftung. Fotos vom Lysimeter zu unterschiedlichen Zeitpunkten: A Während der Klärschlammapplikation; B Während der Bodenprobenahme und C während der Vegetationsperiode mit Weizen. ___	40
Abbildung 5: Nachweis der Stabilität von zwei NM-300K - Dispersionen von Kläranlageneinläufen über fünf Tage durch den Vergleich der Plasmonenresonanz mit der Plasmonenresonanz von Referenzspektren. _	59
Abbildung 6: Langzeitversuch 1 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden. _____	64
Abbildung 7: Langzeitversuch 1 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle nach unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden. _____	64
Abbildung 8: Langzeitversuch 2 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden. _____	68
Abbildung 9: Langzeitversuch 2 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle nach unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden. _____	69
Abbildung 10: Langzeitversuch 3 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Direktapplikation. _____	73
Abbildung 11: Langzeitversuch 3 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Direktapplikation. _____	73

Abbildung 12: Langzeitversuch 3 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Klärschlammfäulung.	74
Abbildung 13: Langzeitversuch 3 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Klärschlammfäulung.	74
Abbildung 14: DGGE-Muster der SRB in Klärschlamm zum Start der Kläranlagensimulation, nach Abschluss der Kläranlagensimulation und nach der Klärschlammfäulung für die Kontrolle ohne und mit Sulfataufstockung sowie die AgNM-Behandlungen ohne und mit Sulfataufstockung .	77
Abbildung 15: Partikelgrößenverteilung des reinen NM-300K.	78
Abbildung 16: Verteilung der AgNM in A) Klärschlamm und B) Bodenklärschlammgemischen; C) SEM Bild zeigt die Einbindung der AgNM in die organische Bodensubstanz.	79
Abbildung 17: AgNM mit einem Durchmesser von 15 – 20 nm in einer Klärschlammprobe und; B) AgNM mit einem Durchmesser von 3 nm in einem Bodenklärschlammgemisch; C) EDX-Spektrum weist auf die vollständige Sulfidierung des Partikels in Abbildung 17 B hin.	79
Abbildung 18: Sulfidierter Ag-Partikel mit einem Durchmesser von 55 nm.	80
Abbildung 19: Ag ₂ S-Ag Partikel in einem Bodenklärschlammgemisch.	80
Abbildung 20: TEM-Aufnahme von organischer Bodensubstanz mit eingeschlossenem AgNM. Die organische Bodensubstanz ist an Tonminerale angelagert.	80
Abbildung 21: Langzeitversuch 5 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K, zwei Sulfatzugaben und unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden.	81
Abbildung 22: Langzeitversuch 5 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von zwei Sulfatzugaben und unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden.	82

Abbildung 23: Langzeitversuch 6 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Direktapplikation. _____	85
Abbildung 24: Langzeitversuch 6 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Direktapplikation. _____	86
Abbildung 25: Langzeitversuch 6 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Klärschlammfäulung. _____	87
Abbildung 26: Langzeitversuch 6 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Klärschlammfäulung. _____	87
Abbildung 27: Langzeitversuch 7 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Direktapplikation. _____	88
Abbildung 28: Langzeitversuch 7 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Direktapplikation. _____	89
Abbildung 29: Langzeitversuch 7 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Klärschlammfäulung. _____	90
Abbildung 30: Langzeitversuch 7 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Klärschlammfäulung. _____	90
Abbildung 31: Sulfidierung von NM-300K in $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2$ über 137 Minuten. Die abnehmende Plasmonresonanz zeigt die Veränderung der Ag^0 Partikel zu Ag_2S . _____	92
Abbildung 32: TEM-Aufnahme des sulfidierten NM-300Ks. _____	93
Abbildung 33: Langzeitversuch 8 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von den Testgegenständen (Referenzsubstanzen) nach Direktapplikation und nach Klärschlammfäulung. _____	96

Abbildung 34: Langzeitversuch 8 – Hemmung der Nitritproduktion durch Testgegenstände (Referenzsubstanzen) im Vergleich zur Klärschlammkontrolle nach Direktapplikation und nach Klärschlammfäulung.	97
Abbildung 35: Versuch ohne Applikation über Klärschlamm – Nitritproduktion in Abhängigkeit von den Testgegenständen (Referenzsubstanzen) nach Applikation der Reinsubstanzen.	100
Abbildung 36: Versuch ohne Applikation über Klärschlamm – Hemmung der Nitritproduktion durch Testgegenstände (Referenzsubstanzen) im Vergleich zur Kontrolle nach Applikation der Reinsubstanzen.	101
Abbildung 37: Niederschlag und Temperatur (Monatsmittelwerte) während der Lysimeterstudie.	102
Abbildung 38 Silbergesamtgehalte nach Königswasseraufschluss der vereinigten Proben der oberen vier 10 cm-Horizonte nach Klärschlammapplikation zu den drei Probenahmeterminen am (a) 08.05.2014, (b) 16.09.2014 und (c) 27.07.2017.	103
Abbildung 39: Freilandlysimeterversuch – Nitritproduktion der im Labor inkubierten Böden in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K.	105
Abbildung 40: Freilandlysimeterversuch – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle der im Labor inkubierten Böden.	105
Abbildung 41: Freilandlysimeterversuch – Nitritproduktion der im Freiland inkubierten Böden in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K.	106
Abbildung 42: Freilandlysimeterversuch – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle der im Freiland inkubierten Böden.	106
Abbildung 43: Freilandlysimeterversuch – Substratinduzierte Respiration der im Labor inkubierten Böden in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K.	108
Abbildung 44: Freilandlysimeterversuch – Hemmung der Substratinduzierten Respiration durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle der im Freiland inkubierten Böden.	108

- Abbildung 45: Freilandlysimeterversuch – Substratinduzierte Respiration der im Freiland inkubierten Böden in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K. _____ 109
- Abbildung 46: Freilandlysimeterversuch – Hemmung der Substratinduzierten Respiration durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle der im Freiland inkubierten Böden. _____ 109
- Abbildung 47: Lysimeterversuch mit Wintergerste Typee im Juli 2016. Die Kontrolle und die 7,0 mg Ag/kg-Behandlung zeigen ungleichmäßigen Bewuchs aufgrund von Schneefäulnis. _____ 111
- Abbildung 48: a) Pflanzenkeimung und b) Hemmung der Pflanzenkeimung nach 14 Tagen Wachstum in Böden aus Freilandlysimetern. c) Pflanzenbiomasse und d) Hemmung der Pflanzenbiomasse der aufgelaufenen Pflanzen. _____ 112
- Abbildung 49: Silbergesamtgehalte nach HNO_3 -Aufschluss (Ag_{HNO_3}) in A: Körner und Spross des Sommerweizens; B: Wurzeln vom Sommerweizen und Winterraps; C: Körner, Schoten und Spross des Winterrapses. _____ 114

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Charakterisierung des Testbodens RefeSol 01A (HagenAM2013).	29
Tabelle 2: Zusammensetzung des modifizierten synthetischen Abwassers.	32
Tabelle 3: Ag/S-Verhältnis bei der Batchapplikation.	34
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Substrate und der abbauenden Enzyme.	45
Tabelle 5: Temperaturprogramm der PCR für den dsr-Primer und all-bacteria-Primer.	53
Tabelle 6: Übersicht der Versuche	58
Tabelle 7: Mittlere DOC Elimination [%] ± Standardabweichung über zehn Tage Substanzzugabe während der einzelnen Kläranlagensimulationen.	61
Tabelle 8: Langzeitversuch 1 - Ag-Bodengehalte	63
Tabelle 9: Langzeitversuch 2 - Ag-Bodengehalte	66
Tabelle 10: Langzeitversuch 3 und 4 - Ag-Bodengehalte der unterschiedlichen Sulfatstufen nach Direktapplikation und Klärschlammfäulung.	71
Tabelle 11: Langzeitversuch 5 - Ag-Bodengehalte	76
Tabelle 12: Langzeitversuche 6 und 7 - Ag-Bodengehalte	84
Tabelle 13: Langzeitversuche 6 und 7 - Gegenüberstellung der Ergebnisse	91
Tabelle 14: Durchmesser der Testgegenstände NM-300K; Ag ₂ S NM-300K und Ag ₂ S NM ermittelt durch TEM und DLS.	93
Tabelle 15: Langzeitversuch 8 - Ag-Bodengehalte.	95
Tabelle 16: Versuch ohne Applikation über Klärschlamm - Ag-Bodengehalte.	98
Tabelle 17: Regenwurmvermeidungstest - Anzahl Regenwürmer nach 48 Stunden.	110
Tabelle 18: Regenwurmreproduktionstest - Anzahl der juvenilen Regenwürmer nach 56 Tagen.	110
Tabelle 19: Pflanzenbiomasse in g FM nach Ernte der Freilandlysimeter.	111

1. Einleitung

Silbernanomaterialien (AgNM) sind aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung (Morones et al., 2005) eines der am häufigsten eingesetzten Nanomaterialien (Vance et al., 2015). Derzeit werden AgNM in mehr als 430 kommerziell vertriebenen Produkten eingesetzt (Vance et al., 2015). Vor allem in der Textilindustrie (Burkhardt et al., 2011a, Benn et al., 2010, Kulthong et al., 2010, Impellitteri et al., 2009, Benn und Westerhoff, 2008) finden AgNM zur Funktionalisierung der Fasern Anwendung, aber auch in Fassadenfarben (Kaegi et al., 2010) oder Sprays (Hagendorfer et al., 2010) werden AgNM eingesetzt und ihre Freisetzung aus den Produkten nachgewiesen. Große Mengen der freigesetzten AgNM gelangen über das Abwasser in die kommunale Kläranlage. Bei der Abwasserreinigung akkumuliert der Großteil der AgNM im Klärschlamm (Voelker et al., 2015, Tiede et al., 2010, Gottschalk et al., 2009, Shafer et al., 1998), nur ein geringer Teil verbleibt in der Wasserphase.

Aufgrund der hohen Nährstoffgehalte von Klärschlamm, insbesondere der Gehalte von Phosphor, der guten Pflanzenverfügbarkeit der Nährstoffe und der großen anfallenden Klärschlammengen wird dieser in der Bundesrepublik Deutschland nach wie vor als Dünger in der Landwirtschaft oder als Bodenverbesserer bei landschaftsbaulichen Maßnahmen bei der Rekultivierung eingesetzt (Wiechmann et al., 2012). Im Vergleich zur Entsorgung stellt die landwirtschaftliche Verwertung einen kostengünstigen Weg (DWA, 2010b) des Umgangs mit den jährlich anfallenden 1,8 Millionen Tonnen Klärschlamm aus kommunalen Kläranlagen (Statistisches Bundesamt, 2016) dar. In anderen europäischen Ländern hat die landwirtschaftliche Klärschlammverwertung ebenfalls große Bedeutung (European Environment Agency, 2001).

Klärschlamm stellt eine Senke für organische und anorganische Schadstoffe sowie pathogene Keime dar, die Verwertung ist daher nicht unumstritten. Die landwirtschaftliche Klärschlammverwertung wird in der Bundesrepublik Deutschland durch die Klärschlammverordnung (AbfKlärV (1992) geregelt, die derzeit novelliert wird. Für Metalle und einige organische Schadstoffe sind in der AbfKlärV (1992) bereits Grenzwerte festgelegt, Silber, AgNM oder NM im Allgemeinen werden jedoch nicht berücksichtigt und können daher unkontrolliert in Bodenökosysteme eingetragen werden. In dem Prozess der Novellierung wird insbesondere die Hygienisierung der Schlämme zur Reduzierung von pathogenen Keimen gefordert. Dazu sind derzeit insbesondere zwei Verfahren (Klärschlammfäulung, Hygienisierung durch Kalkung) aus wirtschaftlicher Sicht interessant, die unterschiedlich physikalisch und chemisch auf die Klärschlämme und die darin akkumulierten AgNM einwirken. Die Verfahren können somit zu unterschiedlichen Ag-Spezies sowie unterschiedlicher Bioverfügbarkeit der AgNM für Bodenorganismen führen.

Besonders die natürliche Sulfidierung zu schwer löslichem Ag_2S , welches als natürliche Detoxifizierung der AgNM für ein- und mehrzellige Organismen gilt (Starnes et al., 2015, Levard et al., 2013, Reinsch et al., 2012), nimmt eine entscheidende Rolle für das Ausmaß der Effekte auf Bodenorganismen ein. Reinsch et al. (2012) wiesen mit ihren Studien nach, dass der Grad der Sulfidierung das Ausmaß der Effekte auf *Escherichia coli* bestimmte. Die Sulfidierung während der Abwasser- und Klärschlammaufbereitung wurde in Studien mit Labor- oder Technikums-Kläranlagen (Ma et al., 2014, Lowry et al., 2012, Levard et al., 2011) nachgewiesen. Auch in Klärschlämmen aus einer echten Kläranlage wurden AgNM gefunden (Kim et al., 2010). Kaegi et al. (2013) demonstrierten die effiziente Sulfidierung von AgNM bei dem Transport zur Kläranlage in einem Abwasserkanal.

Dennoch traten toxische Effekte von sulfidierten AgNM in Böden in unterschiedlichen Studien auf. So war das Wurzelwachstum von Pflanzen (Pradas del Real et al., 2016) ebenso gehemmt wie das Wachstum von Tomatenpflanzen und Mykorrhizapilzen (Judy et al., 2015). Durch Ag_2S wurde die mikrobielle Struktur in mit Klärschlamm beaufschlagten Böden verändert (Judy et al., 2015) und die Entwicklung von Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) gehemmt (Starnes et al., 2015). Schlich et al. (2013) zeigten mit ihren Studien toxische Effekte von AgNM nach Applikation über Klärschlamm aus einer Kläranlagensimulation. Die Effekte der über Klärschlamm applizierten AgNM auf Bodenmikroorganismen waren nach Inkubation von 100 bis 140 Tagen ähnlich ausgeprägt wie die Effekte der reinen, ohne Klärschlamm applizierten AgNM nach 28 Tagen. Bei einem Ansatz über zuvor gefaulten Klärschlamm deutete sich eine reduzierte Bioverfügbarkeit der AgNM an. An dieser Stelle setzt die vorliegende Arbeit an. Die von Schlich (2013) zugrunde gelegten Daten zur Bioverfügbarkeit von AgNM in Böden von Kurz- und Langzeituntersuchungen im Labormaßstab sollten, um die für die Novellierung der AbklärV angeregte Klärschlammvorbehandlung ergänzt werden.

2. Zielstellungen

Die vorliegende Arbeit baut auf derjenigen von Schlich (2013) auf. Beide Arbeiten beschäftigten sich mit der landwirtschaftlichen Klärschlammnutzung und den ökotoxikologischen Folgen einer Belastung des Klärschlammes durch AgNM. In der Arbeit von Schlich (2013) wurde gezeigt, dass AgNM-haltiges Abwasser bei der Kläranlagenpassage zu einer Ag-Belastung von Klärschlamm führt, die bei der anschließenden Zugabe des Klärschlammes in Böden signifikante ökotoxikologische Wirkungen im Vergleich zu unbehandeltem Klärschlamm hervorruft. Eine Detoxifizierung der ursprünglichen AgNM fand nicht statt. Dabei wurden alle Fragestellungen im Rahmen von Laboruntersuchungen bearbeitet. In der vorliegenden Dissertation lag der Fokus zum einen auf den Auswirkungen verschiedener gängiger Klärschlammaufbereitungsverfahren auf die Bioverfügbarkeit von AgNM bei der landwirtschaftlichen Klärschlammnutzung. Dabei war es unabdingbar, auch die Spezierung des Silbers zu berücksichtigen. Zum anderen galt es, Informationen hinsichtlich der Übertragbarkeit von Laborergebnissen auf Freilandbedingungen zu erhalten.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden daher folgende thematische Fragestellungen bearbeitet:

- Welchen Einfluss hat die Klärschlammaufbereitung auf die Bioverfügbarkeit von nanopartikulärem Silber für Bodenmikroorganismen, wenn es über den Klärschlammfad in Böden eingebracht wird? Wie hoch ist das verbleibende Risiko?

Die Bioverfügbarkeit wurde anhand von ökotoxikologischen Effekten mittels biologischer Verfahren bestimmt, nachdem die Klärschlämme unter praxis- und damit umweltrelevanten Bedingungen zunächst in Laborkläranlagen beaufschlagt und anschließend aufbereitet wurden, wobei sie unterschiedlichen physikochemischen Einflussfaktoren (Temperatur, pH-Wert, Redoxpotential) ausgesetzt waren. Um grundsätzliche Aussagen zum Verhalten der AgNM und zur Reduktion von Effekten treffen zu können, musste von aktuellen Umweltkonzentrationen abgewichen und ökotoxikologisch wirksame Ag-Bodengehalte angestrebt werden.

- Welche Faktoren beeinflussen die Sulfidierung der AgNM, die als „natürliche Detoxifizierung“ von Silber gilt? Wird bei der Abwasser- oder der Klärschlammaufbereitung Ag_2S gebildet?

Die Sulfidierung der AgNM zu Ag_2S stellte sich als entscheidender Faktor für die Bioverfügbarkeit heraus. Die für die Sulfidierung notwendigen Faktoren, der Einfluss der Menge an reduzierbarem Schwefel und der Einfluss der Silberkonzentration in der

Kläranlage, wurden in Versuchsansätzen, bei denen nur jeweils einer dieser Faktoren bei der Kläranlagensimulation angepasst wurde, mit Langzeituntersuchungen zur Bioverfügbarkeit der AgNM für Bodenmikroorganismen mittels funktioneller Verfahren untersucht. Zudem wurden die Anwesenheit und Aktivität von schwefelreduzierenden Bakterien (SRB) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kläranlagensimulation und der Klärschlammaufbereitung überprüft. Über Elektronenmikroskopie mit gekoppelter energiedispersiver Röntgenspektroskopie wurde auf die Silberspezies im Klärschlamm und in den Klärschlamm-bodengemischen rückgeschlossen. Die Effekte der natürlich entstandenen Ag₂S-Partikel wurden abschließend mit Referenzmaterialien abgeglichen, die (I) unter optimierten Laborbedingungen sulfidiert wurden, (II) die nicht nanopartikulär waren und (III) die als leicht lösliches Silbersalz direkt in Lösung gehen konnten.

- Können Laborversuche als Indikatoren für das Verhalten von AgNM im Freiland genutzt werden?

Des Weiteren wurde der ökologische Einfluss des AgNM-Eintrags in die Umwelt und die Bedeutung für die Chemikalienregulierung abgewägt. Dazu wurden die Laboruntersuchungen zur mikrobiellen Bioverfügbarkeit mit einer Freilandlysimeterstudie und Pflanzen- sowie Regenwurmstudien abgerundet. Die Lysimeterstudie sollte langfristige Wirkungen der AgNM (ungefähr zwei Jahre) auf die Bodenmikroflora unter Freilandbedingungen aufzeigen, was im Labor zum einen zeitlich, aufgrund der Ressourcenzehrung in den Böden, nicht realisierbar war und zum andern Umwelteinflüsse unberücksichtigt ließ. Über drei Vegetationsperioden wurden die Verlagerung der AgNM und die Aufnahme in landwirtschaftliche Nutzpflanzen mit gezielter Probenahme und der Bestimmung der Ag-Gesamtgehalte bestimmt.

Im Rahmen dieser thematischen Fragestellungen waren methodische Entwicklungen bzw. Anpassungen und für die Umsetzung teilweise Kooperationen mit anderen Institutionen notwendig. Dies betraf folgende Aspekte:

- Entwicklung eines Verfahrens zur chemischen Sulfidierung von AgNM und zur Synthese von Ag₂S-NM.
- Optimierung eines molekularbiologischen Verfahrens zum Nachweis von schwefelreduzierenden Bakterien.
- Methodische Übertragung von technischen Prozessen zur Klärschlammvorbehandlung auf Laborbedingungen.

- Beaufschlagung und Aufbereitung von größeren Klärschlammengen mit AgNM für die Lysimeteruntersuchungen im Freiland.
- Adaption des bestehenden Verfahrens zum Nachweis von AgNM in Klärschlamm- und Bodenproben über Elektronenmikroskopie.

3. Aktueller Kenntnisstand

3.1. Einsatz von AgNM

Gemäß der Definition der Europäischen Union (2011), die im Wesentlichen der Regulation dient, sind Nanomaterialien natürliche, anfallende oder hergestellte Materialien, die Nanopartikel in ungebundener, aggregierter oder agglomerierter Form enthalten. Von diesen Partikeln müssen mindestens 50 % in einer oder mehreren Dimensionen zwischen 1 bis 100 nm liegen.

Silbernanomaterialien (AgNM) werden vor allem wegen ihrer antibakteriellen Wirkung, aber auch wegen ihrer Leitfähigkeit (Piccinno et al., 2012) in vielen Verbraucherprodukten eingesetzt (Vance et al., 2015). Derzeit werden AgNM in mehr als 430 kommerziell vertriebenen Produkten eingesetzt (Vance et al., 2015). Vor allem in der Textilindustrie (Burkhardt et al., 2011a, Benn et al., 2010, Kulthong et al., 2010, Impellitteri et al., 2009, Benn und Westerhoff, 2008) finden AgNM zur Funktionalisierung der Fasern Anwendung, aber auch in Fassadenfarben (Kaegi et al., 2010), Sprays (Hagendorfer et al., 2010) und Kosmetika (Vance et al., 2015) werden AgNM eingesetzt. Ebenso finden sich Anwendungen in Lebensmittelverpackungen, im Sanitärbereich von Wohnungen (Blaser et al., 2008), Waschmaschinen (Farkas et al., 2011) und zunehmend mehr im medizinischen Bereich. Wundauflagen, Knochenzement und Implantate werden mit AgNM antibakteriell ausgestattet (Chaloupka et al., 2010). Die langfristige Wirkung der AgNM gegenüber anderen Bioziden bedingt den zunehmenden Einsatz in Textilien. Yuan and Cranston (2008) schätzen die weltweite Produktion von antibakteriellen Textilien auf 100.000 Tonnen für das Jahr 2000 und prognostizierten eine Zunahme von über 15%.

Die genauen Produktionsmengen und Einsatzgebiete sowie die Frage, ob es sich bei den verwendeten Materialien um NM handelt, erschweren die Abschätzung von Umweltkonzentrationen. Entgegen der Schätzung einer weltweiten jährlichen Produktion von circa 464 Tonnen und dem Einsatz von 110 bis 230 Tonnen Silber als Biozid in Europa (Blaser et al., 2008) scheinen die Produktionsmengen von AgNM erheblich geringer zu sein. Nur etwa 10 % der 110 bis 230 Tonnen Silber waren demnach nanopartikulär (Scheringer et al., 2010). Piccinno et al. (2012) schätzen nach Expertenumfragen die AgNM-Produktion für Europa, als Hauptproduzent von Nanosilber, auf unter 10 Tonnen pro Jahr.

3.2. Ökotoxizität von NM-300K

Nanopartikuläres Silber wird aufgrund seiner bakteriziden Wirkung eingesetzt. Wenige Studien zur ökotoxikologischen Wirkung wurden explizit nach nationalen oder internationalen

standardisierten Richtlinien durchgeführt, sodass die Ergebnisse der vorhandenen Studien nicht unmittelbar miteinander vergleichbar sind (Hund-Rinke et al., 2008).

Schlich (2013) wies im Rahmen seiner Doktorarbeit mit seinen Versuchen mit NM-300K eine unterschiedliche Sensitivität bestimmter terrestrischer Organismengruppen nach. Dabei reagierten Bodenmikroorganismen am empfindlichsten auf die Gegenwart von NM-300K. Die EC₁₀ für die Nitritbildung (potentielle Ammoniumoxidation, ISO 15685) lag bei 0,5 mg Ag/kg TM Boden und die der Bodenatmung (Kohlenstofftransformation, OECD 217) bei 1,67 mg/kg TM Boden. Weniger empfindlich als die Bodenmikroorganismen reagierte das Pflanzenwachstum unter Betrachtung der Biomasseproduktion. Die NOEC lagen bei 1,67 mg Ag /kg TM bei der dikotylen Mungobohne (*Phaseolus aureus*) und 1,5 mg Ag/kg TM für den monokotylen Hafer (*Avena sativa*). Der Kompostwurm (*Eisenia andrei*) zeigte sich am wenigsten sensitiv gegenüber NM-300K. Die EC₁₀ für die Reproduktion lag bei 24,2 mg Ag/kg TM Boden. Die Effekte wurden durch freigesetzte Silberionen hervorgerufen, was sich dadurch zeigte, dass die Effekte von NM-300K und AgNO₃ bei vergleichbaren Ionenkonzentrationen im Porenwasser auftraten. Im aquatischen Bereich lagen die NOEC bei 9 mg Ag/L und die EC₁₀ bei 43 mg Ag/L für Belebtschlamm im Atmungshemmtest nach OECD Richtlinie 209 (Schlich, 2013).

3.3. Bioverfügbarkeit von chemischen Substanzen

Die Wirkung einer Substanz auf einen Organismus ist nicht von der Gesamtkonzentration oder -gehalt abhängig, vielmehr wird die (öko)toxische Wirkung von einem Anteil der Substanz hervorgerufen der verfügbar ist. Dieser Anteil wird als bioverfügbar bezeichnet (DIN EN ISO 17402, 2008). Diese Bioverfügbarkeit ist substanz- und organismusspezifisch und schließt laut DIN EN ISO 17402 (2008) folgende Aspekte mit ein: Dauer der Exposition, Aufnahme der Substanz (vom Boden oder sonstigem Umgebungsmedium) in den Organismus, ggf. die Akkumulation der Substanz im Organismus und die Wirkung der Substanz.

Hierbei muss zwischen der umweltbedingten Bioverfügbarkeit, die die Aufnahme der Substanz in den Organismus beinhaltet, und der toxikologischen Bioverfügbarkeit, die die Akkumulation und/oder die Wirkung der Substanz im Organismus umfasst, unterschieden werden (Peijnenburg et al., 1997, Lanno et al., 2004) Die Bioverfügbarkeit von Substanzen ist ein wichtiger Faktor für eine realistische Gefährdungsabschätzung, daher wird von wissenschaftlicher Seite Aufwand betrieben, die Bioverfügbarkeit in der Risikobewertung und dem ausführenden Bodenschutz noch stärker zu verankern (z.B. Terytze et al., 2011, Terytze et al., 2010, Bradham et al., 2006). Bei einer Gefährdungsabschätzung kann demnach durch die Bestimmung von Gesamtgehalten im Umgebungsmedium nicht zwangsläufig auf die toxikologische Bioverfügbarkeit, bzw. die wirksame Dosis der Substanz

im Organismus geschlossen werden (Mc Carthy et al 1992). Eine Herangehensweise über Gesamtgehalte würde die Risiken überbewerten (Terytze et al., 2011, Macholz et al., 2011). Ansätze die den verfügbaren Gehalt der Substanz und ihre intrinsische Toxizität umfassen, bilden die Gefährdung durch eine Substanz realistischer ab (DIN EN ISO 17402, 2008), aber auch verfeinerte Methoden wie die Speziierung oder sequenzielle Extraktion können den bioverfügbaren Anteil nur näherungsweise widerspiegeln.

Bestimmte Einflussfaktoren auf die Bioverfügbarkeit, wie etwa die Wasserlöslichkeit oder die Polarität sind von der Substanz bedingt (Bernhard, 2013). Diese Einflussfaktoren stehen neben der Interaktion mit dem exponierten Organismus in Wechselwirkung mit den Eigenschaften des umgebenden Milieus und den klimatischen Bedingungen, was die Abschätzung der Bioverfügbarkeit sehr komplex macht (Terytze et al., 2010) und bei identischen Gehalten oder Konzentrationen einer Substanz zu unterschiedlich stark ausgeprägten Effekten führen kann (Terytze et al., 2011). Dem Boden wird hierbei besondere Aufmerksamkeit entgegengebracht, da hier neben dem chemischen Milieu, das beispielsweise die Transformation, Lösung oder Fällung der Substanz beeinflusst, physikalische Bodenparameter Einfluss nehmen. Die Korn- und Porengrößenverteilung sowie die Sorption an Bodenpartikel können die Bioverfügbarkeit von Substanzen bis hin zur irreversiblen Sorption oder Maskierung beeinflussen (DIN EN ISO 17402, 2008). Die Bodenart kann die Bioverfügbarkeit einer Substanz beispielsweise erheblich beeinflussen, so sind Feinporen Mikroorganismen nicht mehr zugänglich (Johnsen et al., 2005) und die potentiell darin enthaltene Substanz dadurch für Mikroorganismen nicht verfügbar. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Schadstoffen für Mikroorganismen betrachten häufig die Toxizität, die zu einer Änderung der strukturellen Diversität (z. B. Änderung in der Biozönose) und funktionellen Diversität (z. B. Atmung, Dehydrogenase-Aktivität, Abbau von organischer Substanz) führt (Kula and Römbke, 1998). Um generelle Aussagen zur Wirkung auf Biozöten oder die Lebensraumfunktion eines Bodens zu machen reicht die Betrachtung einer Spezies in der Regel nicht aus, es muss die Bioverfügbarkeit für unterschiedliche Organismen betrachtet werden, da sie auf unterschiedliche Weise mit der Substanz in Kontakt kommen und diese unterschiedlich wirkt (DIN EN ISO 17402, 2008).

Grundsätzlich kann die Bioverfügbarkeit gemäß DIN EN ISO 17402 (2008) über zwei Herangehensweisen bewertet werden, die sich gegenseitig ergänzen. Das umfasst zum einen spezifisch auf die Erfassung des verfügbaren Anteils ausgelegte chemische Verfahren, die auf der Extraktion und der analytischen Bestimmung der Substanz beruhen, zum anderen biologische Verfahren bei denen Organismen einer Substanz ausgesetzt werden und Effekte oder Akkumulation beobachtet werden. Im Idealfall werden beide Verfahren miteinander kombiniert, also die Effekte mit gemessenen Konzentrationen verglichen. Obwohl bei biologischen / ökotoxikologischen Verfahren die Bioverfügbarkeit per se nicht

direkt gemessen wird, kann jedoch durch die Messung der inneren Konzentration und der Korrelation mit den Effekten ein Eindruck der Bioverfügbarkeit gewonnen werden (DIN EN ISO 17402, 2008). Für Mikroorganismen ist eine analytische Quantifizierung der bioverfügbaren Substanz im Organismus nicht möglich. Nach DIN EN ISO 17402 (2008) muss jedoch, wenn Effekte auftreten, bioverfügbare Substanzen vorliegen. Nichtsdestotrotz ist die Messung der Akkumulation und der Wirkung an oder in einem speziellen Organismus die einzige Möglichkeit die Bioverfügbarkeit für den betreffenden Organismus unmittelbar abzuschätzen (DIN EN ISO 17402, 2008). Für Routineuntersuchungen sind chemische Extraktionsverfahren aufgrund des geringeren Aufwandes biologischen vorzuziehen (Macholz et al., 2011), sofern entsprechende Verfahren, die auf den zu betrachtenden Organismus und den Schadstoff abgestimmt sind, vorliegen.

3.4. Freisetzung und Verbleib von AgNM

Der Eintrag von AgNM in die Umwelt erfolgt über verschiedenste Wege, beispielsweise durch Auswaschungen aus Baustoffen wie Fassadenfarben (Kaegi et al., 2010) oder Verbraucherprodukten wie Sprays (Hagendorfer et al., 2010). Besondere Bedeutung, aufgrund des starken Einsatzes als antibakterielle Ausstattung, hat die Freisetzung von AgNM aus Textilien während der Wäsche in Haushaltsabwässer und ihr Transport in die Kläranlage. Die Freisetzung aus Textilfasern wurde in unterschiedlichen Studien nachgewiesen. Geranio et al. (2009) führte den Austrag von Fragmenten aus AgNM und Textilfasern auf mechanische Beanspruchung während des Waschvorgangs zurück, weil der überwiegende Anteil des Silbers an Bestandteilen (Textilfasern) von über 450 nm gebunden war. Der geringere Anteil von 10 bis 15 % lag im nanoskaligen Maßstab von einem bis hundert Nanometern vor. In der Studie wurde gezeigt, dass realistische Nutzungsszenarien mit Waschmittel aufgrund von Wechselwirkungen mit Waschmittelbestandteilen zu niedrigeren Auswaschungen führen als mit destilliertem Wasser. In weiteren Studien, die ein realistisches Nutzungsszenario abbildeten, wurden die freigesetzten Partikel mittels mikroskopischer Untersuchungen als AgCl, Ag₂S und metallische Ag⁰-Partikel identifiziert (Lorenz et al., 2012). In einer Studie, bei der nur destilliertes Wasser genutzt wurde, fand sich darüber hinaus ionisches Silber (Ag⁺) (Benn und Westerhoff, 2008). In allen drei Studien war der überwiegende Anteil der Partikel in einem Größenbereich über 100 nm, grundsätzlich fanden sich jedoch auch Partikel kleiner 100 nm, was der Definition von Nanomaterialien entspricht. Die Studie von Burkhardt et al. (2011b) zeigte den Zusammenhang zwischen der ausgewaschenen Menge und der Größe der Materialien und ihrer Textilapplikation. Die AgNM, die in die Faser eingearbeitet waren, wurden signifikant weniger ausgewaschen als die, die oberflächlich auf die Faser aufgebracht wurden.

In einer Studie zum Transport der AgNM über den Abwasserstrom wurden die Partikel ohne nennenswerte Verluste an den Biofilm im Abwasserkanal transportiert. Dazu wurden AgNM in einem fünf Kilometer langen Teilstück eines Abwasserkanals ohne Zu- und Abläufe unter kontrollierten Durchflussbedingungen eingesetzt und die angekommene Menge am Ende der Strecke bestimmt. Unter Berücksichtigung der analytischen Ungenauigkeit und Unsicherheiten bei der Bestimmung des Abflusses lag die Massenbilanz bei annähernd 100 %. Mikroskopische Aufnahmen zeigten dabei die Bindung der Partikel an die Schwebstoffe (Kaegi et al., 2013). Bereits in Batchversuchen mit Rohabwässern wurden die Partikel zu etwa 15 % sulfidiert. Die Autoren schlussfolgerten daraus die Sulfidierung der Partikel zu einem bestimmten Grad während des Transports im Abwasserkanal, da hier die Konzentration von säureflüchtigen Sulfiden gegenüber einem Batchversuch erhöht war (Kaegi et al., 2013). In unterschiedlichen Studien mit Batchversuchen (Kaegi et al., 2013, Tiede et al., 2010) sowie Kläranlagen im Technikums- und Labormaßstab (Schlich, 2013, Kaegi et al., 2011, Wang et al., 2012) wurde die starke Bindung von bis zu 99 % an den Klärschlamm nachgewiesen. Die Studie von Tiede et al. (2010) zeigte nach 6 Stunden im Batchversuch eine Bindung von über 90 % der eingesetzten AgNM-Menge an den Klärschlamm, die übrigen AgNM befanden sich im Überstand des Klärschlammes und besaßen noch ihre ursprüngliche Größe. In Technikumskläranlagen wurden nach 43 Tagen Laufzeit 85 % der AgNM im Klärschlamm, 5 % im Auslauf der Anlage und 5 % in der Kläranlage detektiert. Die Massenbilanz lag insgesamt bei 95 % der eingesetzten AgNM (Kaegi et al., 2011). In den vier unabhängig voneinander durchgeführten Simulationsversuchen mit Laborkläranlagen von Schlich (2013) fanden sich immer mindestens 90 % des zugeführten NM-300Ks im Klärschlamm. Die Bindung an den Klärschlamm findet unabhängig vom Coating oder der Größe der AgNM statt, so waren bei der Studie von Wang et al. (2012) mit Carboxyl gecoateten AgNM (NM-300K sterisch stabilisiert) fast 90 % an den Klärschlamm gebunden und bei der Studie von Shafer et al. (1998), der nicht nanopartikuläres Silber verwendete, wurden bis zu 99 % des eingeleiteten Silbers aus dem Abwasser beseitigt. Während der Abwasserbehandlung in Kläranlagen kommt es aufgrund von hohen Sulfidkonzentrationen, wie schon im Abwasserkanal, zur Sulfidierung der AgNM. Kaegi et al. (2011) detektierten mittels X-ray absorption spectroscopy Ag_2S als dominante Spezies im Schlamm und im Auslauf der Kläranlage. In Batchexperimenten wiesen sie die Sulfidierung der AgNM in weniger als zwei Stunden für die Denitrifikationsstufe nach, in der belüfteten Nitrifikationsstufe blieben die AgNM aufgrund der geringen Sulfidkonzentrationen metallisch (Kaegi et al., 2011). In echten Kläranlagen wurde ebenfalls die Sulfidierung von AgNM nachgewiesen, indem AgNM in einer Kläranlage zugesetzt wurden. Dabei bestätigten sich die Erkenntnisse aus den Versuchen von Kaegi et al. (2011), die Sulfidierung fand überwiegend in den anaeroben Bereichen der Anlage statt,

darüber hinaus wurde eine Sulfidierungsrate von etwa 11 bis 14 nm/h ermittelt (Kent et al., 2014). Ag₂S wurde ebenfalls als dominante Spezies in Klärschlämmen einer amerikanischen Kläranlage detektiert, die nicht künstlich mit AgNM beaufschlagt wurden (Kim et al., 2010).

3.5. Einsatz von Klärschlamm

Anfallender Klärschlamm wird in der Bundesrepublik Deutschland entweder stofflich verwertet oder entsorgt. Für die stoffliche Verwertung eignen sich die Landwirtschaft, landschaftsbauliche Maßnahmen und eine sonstige stoffliche Verwertung (z.B. Kultursubstrate). Die Entsorgung von Klärschlamm kann vor allem thermisch über eine Mono- oder Mitverbrennung als auch über Deponierung erfolgen.

In der Bundesrepublik Deutschland werden etwa 10.000 öffentliche Kläranlagen in unterschiedlichen Größenklassen betrieben (Statistisches Bundesamt, 2016, Klages et al., 2009), aus denen im Jahr 2013 rund 1,8 Millionen Tonnen Trockensubstanz Klärschlamm anfielen (Statistisches Bundesamt, 2016). Die Klärschlammverwertung in der Landwirtschaft war in den letzten Jahren leicht rückläufig, was an den steigenden Qualitätsanforderungen an die Schadstoffgrenzwerte der Klärschlämme lag. Die in der Landwirtschaft stofflich verwertete Klärschlammmenge aus der biologischen öffentlichen Abwasserbehandlung sank von circa 568.000 t Klärschlamm im Jahr 2010 auf 484.000 t Klärschlamm im Jahr 2013. Diese 484.000 t Klärschlamm des Jahres 2013 entsprechen einem Anteil von circa 27 % der Gesamtmenge aus der biologischen öffentlichen Abwasserbehandlung (1,8 Mio. t). Klärschlamm aus den nichtöffentlichen Anlagen wurde zu 12 % in der Landwirtschaft verwertet (Statistisches Bundesamt, 2016). Von der Gesamtmenge aller Abwasseraufbereitungsanlagen in der Bundesrepublik Deutschland, einschließlich der nicht öffentlichen Anlagen, (1,8 Mio. t + 1,6 Mio. t = 3,4 Mio. t) wurden im Jahr 2013 etwa 36 % stofflich verwertet, darunter fast 16 % in der Landwirtschaft, 8 % bei landschaftsbaulichen Maßnahmen (Rekultivierung) und 12 % fielen unter die sonstige stoffliche Verwertung, die Restmenge wurde überwiegend thermisch entsorgt (~48 %) (Statistisches Bundesamt, 2016).

Laut Wiechmann et al. (2012) wird in der Bundesrepublik Deutschland der Klärschlamm überwiegend in den Flächenbundesländern Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen, Rheinland-Pfalz und Schleswig-Holstein in der Landwirtschaft verwertet. In anderen europäischen Ländern hat die landwirtschaftliche Klärschlammverwertung sehr unterschiedliche Gewichtung. In Dänemark, Norwegen, Frankreich und Großbritannien wird im Gegensatz zu den Niederlanden oder Griechenland, die nur einen geringen Teil verwerten und überwiegend thermisch Entsorgen oder Deponieren, ein Anteil von über 50 % des Klärschlammes auf landwirtschaftlichen Flächen verwertet. Die European Environment Agency (2001) prognostizierte im Jahr 2001 für das Jahr 2005 einen Anstieg der in Europa

anfallenden Klärschlammmenge um 50 % aufgrund gestiegener Ansprüche an die Abwasserklärung. Gleichzeitig wird die landwirtschaftliche Verwertung aufgrund von zum Teil hohen Schadstoffgehalten kritisch hinterfragt.

Für den Einsatz von Klärschlämmen sprechen unterschiedliche Gründe (DWA, 2010b):

- Die Nutzung der hohen Nährstoffgehalte des Schlammes
- Die Schonung der begrenzten Phosphor-Ressourcen
- Die landwirtschaftliche Verwertung stellt einen Entsorgungsweg mit geringem Energieverbrauch und günstiger Klimabilanz dar und ist gleichzeitig im Vergleich zur thermischen Entsorgung ein kostengünstiger Entsorgungsweg.

Der Koalitionsvertrag der aktuellen Bundesregierung sieht vor, die Verwertung von Klärschlamm in der Landwirtschaft komplett zu unterbinden (Koalitionsvertrag, 2013). Aktuell wird die Klärschlammverwertung in Deutschland noch durch die Klärschlammverordnung (AbfKlärV, 1992) geregelt. Die AbfKlärV (1992) befindet sich gegenwärtig im Prozess der Novellierung. Dadurch sollen die bestehenden Grenzwerte für Metalle und organische Kontaminanten abgesenkt bzw. neue Grenzwerte eingeführt werden, etwa für Benzo(a)pyren oder perfluorierte Tenside. Große Bedeutung wird dabei der Hygienisierung der Schlämme beigemessen, um die Gefahr durch pathogene Keime drastisch zu reduzieren (Klages et al., 2009). Silber, Silbernanomaterialien oder Nanomaterialien im Allgemeinen werden bislang nicht berücksichtigt. Nanomaterialien wurden bislang bei der Novellierung der AbfKlärV (1992) einer Kategorie zugeordnet, die derzeit weder einen Grenzwert erhalten haben noch von einem Monitoring erfasst werden (Bergs, 2010), was derzeit analytisch auch nur sehr eingeschränkt leistbar wäre (Nowack et al., 2015), weil es bislang keine praxisgerechte Methode einer „nanospezifischen“ Silberbestimmung gibt.

3.6. Klärschlammvorbehandlung

Die rund 10.000 Kläranlagen in der Bundesrepublik Deutschland sind in fünf Größenklassen eingeteilt. Ein Drittel davon entfallen auf die kleinste Ausbaustufe, ein Drittel auf die zweite und dritte Ausbaustufe und ein Drittel auf die beiden größten Ausbaustufen (Klages et al., 2009). Die technischen Umsetzungen der Abwasserklärung, die einzelnen Aufbereitungsstufen der Kläranlagen hängen von der Größenklasse, den technischen und räumlichen Gegebenheiten und der vorherbestimmten Klärschlammverwertung bzw. Klärschlammentsorgung ab (Resch and Schatz, 2010).

Grundsätzlich erfordert der Klärschlamm aufgrund seines hohen Wassergehalts und des hohen Gehalts an leicht abbaubarer organischer Substanz und des hohen Anteils pathogener Keime verschiedene Aufbereitungsschritte zur Stabilisierung und Hygienisierung. Die Stabilisierung erfolgt in kleineren Anlagen in der Regel über das Verfahren der aeroben

Stabilisierung im Belebungsbecken der Kläranlage durch Langzeitbelüftung in Verbindung mit einem hohen Schlammalter und einer niedrigen Schlammbelastung. In größeren Anlagen mit über 20.000 Einwohnergleichwerten (Größenklassen 4 und 5) wird häufig eine anaerobe Stabilisierung mittels beheizter Schlammfäulung (mesophile Fäulung) eingesetzt. Dabei wird die Schlammmenge durch Abbau der organischen Substanz reduziert, die Entwässerbarkeit des Schlammes erhöht und das anfallende Klärgas energetisch genutzt (Resch and Schatz, 2010). Nach der Stabilisierung hat der Schlamm sehr hohe Wassergehalte von etwa 97 bis 99 % (Feststoffgehalt 1 bis 3 %). Um den Wassergehalt des Schlammes auf etwa ein Drittel zu reduzieren, was zu einem Feststoffgehalt von 3 % bis 9 % führt, wird der Schlamm nach Zugabe eines polymeren Flockungsmittels mechanisch, beispielsweise über einen Scheibeneindicker, entwässert. Damit werden die Transport- und Lagerkosten für den Schlamm erheblich reduziert (Resch and Schatz, 2010).

Bei den Größenklassen bis etwa 10.000 Einwohnergleichwerten (bis Größenklasse 3) wird der anfallende Schlamm in der Regel aerob stabilisiert und meist als Nassschlamm in der Landwirtschaft verwertet. Bei den größeren Anlagen werden die Klärschlämme meist anaerob stabilisiert. Die anfallenden Schlämme werden im Anschluss an diese Fäulung in der Regel entsorgt, aber zum Teil auch landwirtschaftlich verwertet (Klages et al., 2009).

Im Rahmen der Novellierung der AbfKlärV wird eine Pflicht zur Hygienisierung beziehungsweise Desinfektion des Klärschlammes gefordert. Die Hygienisierung von Klärschlamm hat das Ziel, Krankheitserreger durch geeignete Behandlungsmaßnahmen unschädlich zu machen (Pietsch et al., 2015). Die Zugabe von Kalk, aber auch die Pasteurisierung bilden Verfahrensschritte, die zur Hygienisierung in Kläranlagen eingesetzt werden. Die Pasteurisierung als thermische Desinfektion gilt diesbezüglich als sehr zuverlässiges Verfahren. Pathogene Bakterien, Viren und Parasitendauerstadien wie Wurmeier werden bei ausreichender Temperatur und Einwirkzeit inaktiviert (Pietsch et al., 2015). Die Hygienisierung durch Kalkung erfolgt durch die Zugabe von Kalkmilch (oder Löschkalk) bei flüssigem Schlamm und Branntkalk bei entwässertem Schlamm. Die Inaktivierung der Keime erfolgt durch die stark alkalischen Verhältnisse über pH 12. Optimale Wirkungen werden durch gleichzeitige Temperaturen über 50 °C durch Selbsterhitzung (exotherme Löschreaktion) oder Hitzezufuhr erzielt (Capizzi-Banas et al., 2004, DWA, 2010a). Zur Hygienisierung von Klärschlamm kann ebenfalls eine thermophile Fäulung mit Temperaturen zwischen 50 und 60 °C genutzt werden (DWA, 2010a).

Im Januar 2013 haben der Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) und die Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall (DWA) ihre Qualitäts- und Prüfbestimmungen für Klärschlämme herausgegeben (QLA, 2013), die der praktischen Umsetzung und der Güteüberwachung der

Klärschlammverwertung dienen, und an denen sich die im Rahmen dieser Promotion angewendeten Methoden orientieren. Zum jetzigen Zeitpunkt wird in der Praxis die Zugabe von Kalk am ehesten angewandt, da dies gleichzeitig mit einer Kalkdüngung für den Acker einhergeht. Da eine Hygienisierung noch nicht gesetzlich vorgeschrieben ist, wird die für eine zuverlässige Hygienisierung erforderliche Kalkmenge um pH 12,8 zu erreichen, aufgrund des enormen Kalkbedarfs nicht eingesetzt. Die Kalkung dient derzeit noch der Kalkdüngung für den Acker und nicht der Hygienisierung. Weil der Koalitionsvertrag der aktuellen Bundesregierung vorsieht, die Verwertung von Klärschlamm in der Landwirtschaft zu unterbinden (Koalitionsvertrag, 2013) und die politische Entscheidung über den Fortbestand der landwirtschaftlichen Klärschlammverwertung dadurch sehr ungewiss ist, verhalten sich die Kläranlagenbetreiber zurückhaltend bei der Investition in geeignete Verfahren zur Hygienisierung der Schlämme.

Für den Fortbestand der landwirtschaftlichen Klärschlammverwertung wurde eine Studie zu den „Anforderungen an die Novellierung der Klärschlammverordnung unter besonderer Berücksichtigung von Hygieneparametern“ erstellt. Die Autoren empfehlen darin, aufgrund der eingeschränkten Auswahl von Hygienisierungsverfahren für kleine Kläranlagen (bis circa 10.000 Einwohnergleichwerte; Größenklasse 3), die Ausbringung von nicht hygienisiertem Schlamm zu genehmigen, da eine Hygienisierung nicht wirtschaftlich wäre (Klages et al., 2009).

3.7. Einfluss der Klärschlammvorbehandlung auf die Bioverfügbarkeit von Silbriernanopartikeln – Sulfidierung von AgNM

Im Rahmen der Promotion von Schlich (2013) zur ökotoxikologischen Wirkung von AgNM ergaben sich Hinweise darauf, dass durch die Faulung von Klärschlamm eine langfristige Detoxifizierung von Silbriernanopartikeln bewirkt wird. Schlich (2013) konnte dabei weder näher auf die Ursachen für diese Beobachtung eingehen, noch konnten andere potentielle Einflussfaktoren, wie sie sich durch eine Klärschlammvorbehandlung ergeben würden, untersucht werden. Anaerobe oder anoxische Verhältnisse, wie sie in Abwässern oder bei der Abwasser- und Klärschlammbehandlung auftreten, führen zur Reduktion von Schwefel zu Sulfid, und, wie in Kapitel 3.4 dargelegt, zur Sulfidierung von AgNM. Auch in Süßwassermesokosmen, die aus einem aquatischen, einem subhydrischen und einem terrestrischen Kompartiment bestanden, zeigte sich in Abhängigkeit des Redoxpotentials unter anaeroben Bedingungen die Bildung von Ag₂S bzw. von Ag-Sulfhydryl-Verbindungen (Lowry et al., 2012).

Trotz analytisch nachgewiesener (Pradas del Real et al., 2016, Judy et al., 2015, Colman et al., 2013) oder angenommener (Schlich et al., 2013) Sulfidierung von AgNM durch eine Applikation über Klärschlamm treten nach wie vor Effekte auf unterschiedliche Bodenorganismen auf. Die hervorgerufenen Effekte von sulfidierten AgNM waren in unterschiedlichen Studien gegenüber einer metallischen oder ionischen Referenz reduziert (Judy et al., 2015, Starnes et al., 2015).

Auf Basis dieser Informationen ist davon auszugehen, dass die Klärschlammbehandlung mit ihren unterschiedlichen, extremen physikochemischen Bedingungen (Redoxpotential, pH-Wert, Temperatur) einen unmittelbaren Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Silbriernanomaterialien hat. Besonders nach der Aufbereitung durch die Klärschlammfäulung unter streng anaeroben Bedingungen sollten durch Sulfidierung von AgNM zu Ag₂S Effekte ausbleiben, da Ag₂S nahezu nicht wasserlöslich ($6,21 \cdot 10^{-15}$ g/L bei 25 °C) und damit nicht bioverfügbar sein sollte. Der thermische Einfluss bei der Pasteurisierung und der Einfluss des pH-Wertes bei der Hygienisierung durch Kalkung wurden bislang in keiner Studie als Faktor für die Bioverfügbarkeit von AgNM in Betracht gezogen. Die Methoden sind jedoch für die Praxis der Klärschlammaufbereitung relevant und können sich potentiell auf die Bioverfügbarkeit von AgNM, beispielsweise durch bessere Prozessbedingungen für die Sulfidierung, auswirken.

4. Material und Methoden

Die Untersuchungen dazu, inwieweit die Klärschlammaufbereitung die Bioverfügbarkeit von AgNM beeinflusst, erfolgten in einem dreigeteilten Ansatz (Abbildung 1). In **Schritt 1** wurden die Vorgänge einer Kläranlage in Laborkläranlagen simuliert, um Klärschlamm zu gewinnen, der unter realistischen Bedingungen mit AgNM versetzt worden war. Durch die Simulation der Abwasseraufbereitung werden Veränderungen oder Transformationen der Nanomaterialien in die Studien integriert und somit eine größere Umweltrelevanz im Vergleich zu einfachem Versetzen von Klärschlamm im Batchansatz erzielt. Die strukturelle Diversität der Mikroflora und die Abbauleistung des Schlammes wurde über molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen erfasst, um Aussagen über Effekte von AgNM auf die Mikroflora in der Kläranlage zu treffen und die Anwesenheit von schwefelreduzierenden Bakterien (SRB) zu überprüfen, die für eine Sulfidierung der AgNM essentiell ist.

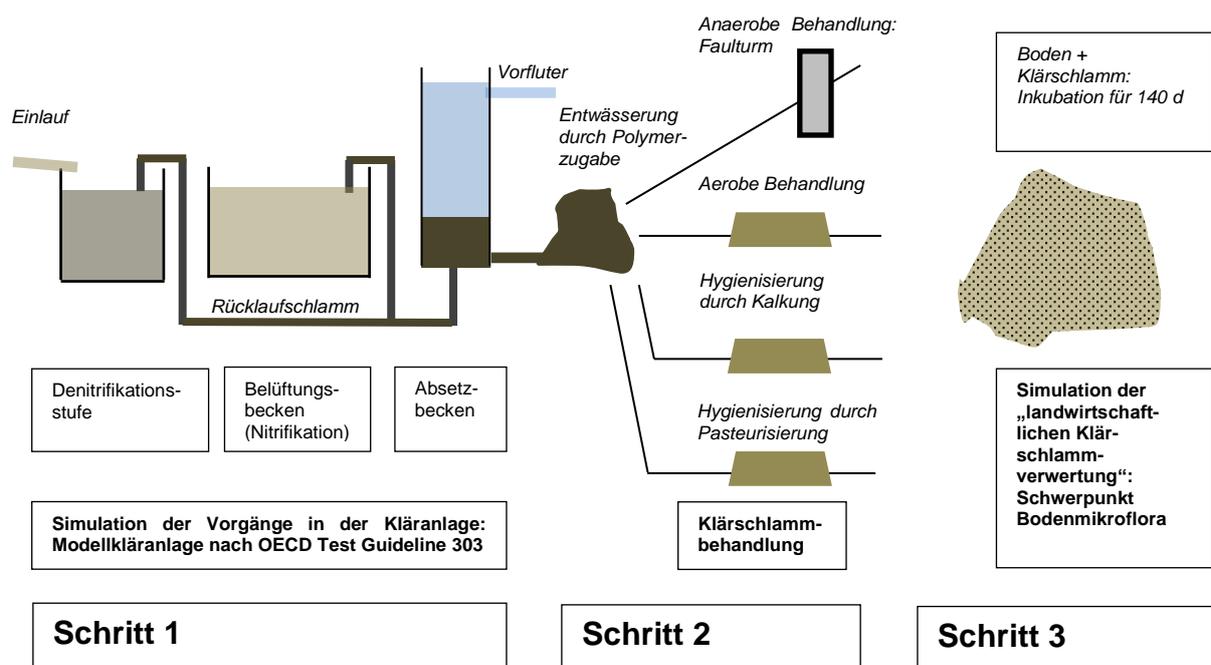


Abbildung 1: Verfahrensschema der Klärschlammbehandlung

In **Schritt 2** wurden die Behandlungen der Klärschlämme aus den Laborkläranlagen simuliert. Die Klärschlämme wurden in Anlehnung an die praxisrelevantesten Verfahren aufbereitet.

In **Schritt 3** wurde die landwirtschaftliche Klärschlammverwertung simuliert. Dazu wurden die in **Schritt 2** aufbereiteten Klärschlämme in Anlehnung an die AbfKlärV (1992) in

Testböden eingearbeitet und im Klimaschrank inkubiert. Die Bodenklärschlammgemische wurden zu bestimmten Zeitpunkten beprobt und untersucht.

Um die Laborversuche mit Freilandversuchen abzugleichen, die eine größere ökologische Relevanz haben, wurde Klärschlamm in einer Batchapplikation mit AgNM beaufschlagt, entwässert und in Böden von Freilandlysometern eingebracht. Aufgrund der benötigten Klärschlammmenge für die Lysimeter musste an dieser Stelle von der Applikation mittels der Laborkläranlagen abgesehen und eine Batchapplikation durchgeführt werden.

4.1. Chemikalien und Geräte

Im Anhang sind die wichtigsten Geräte (Anhang 1) und Chemikalien (Anhang 2), die für die Arbeiten im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendet wurden, aufgelistet.

4.2. Nanopartikel NM-300K

Als Testgegenstand wurde in allen durchgeführten Versuchen NM-300K als nanopartikuläres Silber untersucht. NM-300K ist eines der am umfassendsten untersuchten Silbernanomaterialien. Im Rahmen des „OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN) Sponsorship Programme“ wurden die physikochemischen Eigenschaften von NM-300K untersucht. Klein et al. (2011) haben die Ergebnisse in dem Bericht „NM-Series of Representative Manufactured Nanomaterials – NM-300 Silver – Characterisation, Stability and Homogeneity“ zusammengefasst.

Die vorliegende Promotion baut auf der Promotion von Schlich (2013) auf, die ebenfalls am Fraunhofer IME durchgeführt wurde. Daher überschneiden sich einige Methoden oder wurden weiterentwickelt und können deshalb in Details voneinander abweichen. Um die angewandten Methoden nach dem aktuellsten durchgeführten Stand darzustellen und dieses Kapitel übersichtlich zu gestalten, wurde bewusst auf einen einfachen Verweis verzichtet und es wurden alle Methoden detailliert beschrieben.

Die Abbildung 2 zeigt TEM-Aufnahmen von NM-300K in Reinstwasser. NM-300K weist eine primäre Partikelgröße von 15 nm mit einer engen Partikelgrößenverteilung von 99 % auf, darüber hinaus zeigt sich ein geringer Anteil an Partikeln mit einer sekundären Partikelgröße von 5 nm. Der pH-Wert von NM-300K liegt bei $\text{pH } 7,2 \pm 0,3$ bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$. NM300K hat eine Dichte von $1,2 \pm 1 \text{ g/mL}$ und den Siedepunkt bei $102 \pm 2^\circ\text{C}$.

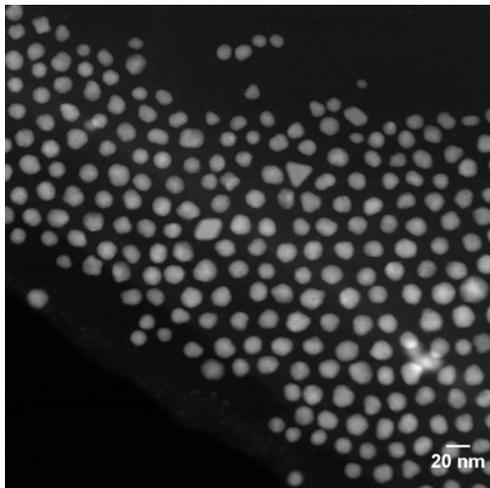


Abbildung 2: TEM-Aufnahme von NM-300K in Reinstwasser.

4.3. Ag-Referenzmaterialien

Die Ag-Referenzmaterialien wurden benötigt, um die Effekte von NM-300K im Verhältnis zu anderen Silbermaterialien abzuschätzen. Für die Studie mit den Referenzmaterialien wurde als leicht lösliches Silbersalz AgNO_3 verwendet, als Negativkontrolle nur sehr schwer lösliches, nicht nanopartikuläres gemörsertes Ag_2S (Ag_2S NonNM). Zudem wurden zwei nanopartikuläre Ag_2S Materialien am Leibnitz-Institut für Polymerforschung in Dresden hergestellt. Das Ag_2S NM wurde direkt, wie von Kumari et al. (2014) beschrieben, synthetisiert. Davon abweichend wurde der Ligand von NM-300K verwendet (NM-300K-DIS). Die Dispersion wurde auf 1000 mg Ag/L eingestellt. Zusätzlich wurde NM-300K im Labor in einer gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2$ -Lösung chemisch sulfidiert (Ag_2S NM-300K), indem 2 g NM-300K ($\sim 200 \text{ mg Ag}$) zu 198 mL der Lösung gegeben wurde (Ziel 1000 mg Ag/L). Die Analyseergebnisse der zwei hergestellten nanopartikulären Ag_2S -Materialien sind in Kapitel 5.6.1 dargestellt.

4.4. Testboden

Als Testboden wurde für alle Versuche im Rahmen dieser Promotion Refesol 01-A Boden verwendet, da bei diesem ackerbaulich genutzten Boden, aufgrund seiner vergleichsweise geringen Sorptions- und Pufferkapazität, Effekte deutlicher hervortreten als bei bindigeren Böden. Für dieses Projekt wurde eine gesonderte Charge des Refesol 01-A Boden genutzt,

um für alle Versuche Böden mit gleichen Eigenschaften zu verwenden. Diese Sondercharge wurde, da sie nicht für GLP-Studien genutzt wurde, nicht in die Dokumentation der Refesol-Böden aufgenommen und trug die Bezeichnung HagenAM2013. Die Refesolböden sind vom UBA (Umweltbundesamt) anerkannte Referenz- und Testböden für Testverfahren nach BBodSchG / BBodSchV. Der Boden ist hinreichend genau in seinen physikochemischen Eigenschaften charakterisiert. Es handelt sich bei dem Refesol 01A um eine Braunerde aus schwach lehmigem Sand, die mittel sauer und sehr schwach humos ist. Die genauen Bodencharakteristika sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Charakterisierung des Testbodens RefeSol 01A (HagenAM2013).

Parameter	RefeSol 01-A (HagenAM2013)
Bodentyp	Dystric Cambisol Braunerde
Eigenschaften	schwach lehmiger Sand, mittel sauer, sehr schwach humos
Sand [%]	62,7
Schluff [%]	22,3
Ton [%]	5,1
WHK _{max} [g/kg]	292
pH (CaCl ₂)	5,1
C _{org} [%]	1,10
N _{total} [mg/kg]	780
KAK _{eff} [mmolc/kg]	19,0
Fe _{ox} [mmolc/kg]	1,57
Al _{ox} [mmolc/kg]	0,95

Der Boden wird auf dem Gelände des Fraunhofer IME in Hochbeeten mit Edelstahleinfassung und einer Drainage am Boden der Einfassung gelagert. Es erfolgt eine in der Landwirtschaft übliche Zwischenfrucht, z.B. mit *Phacelia tanacetifolia*. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln ist ausgeschlossen.

4.5. Bodenaufbereitung und Lagerung

Die Bodenaufbereitung und Lagerung erfolgte gemäß ISO Guideline 18512 (2007). Die Böden wurden für die Verwendung in Versuchen auf eine Korngröße ≤ 2 mm gesiebt. Dafür wurden die Böden auf etwa 30 % der maximalen Wasserhaltekapazität (WHK_{max}) an der Luft ohne zusätzliche Zufuhr von Hitze getrocknet, indem sie großflächig ausgebreitet wurden. Durch regelmäßiges Wenden wurde das oberflächige Austrocknen vermieden. Die Böden wurden, sofern sie nicht direkt verwendet wurden, in feuchtem Zustand (30 % WHK_{max}) unter aeroben Bedingungen im Dunkeln bei 4 ± 2 °C für bis zu drei Monate gelagert. Bevor die

Böden für Studien Anwendung fanden, wurden sie zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur akklimatisiert, um die Aktivität der Mikroorganismen anzuregen.

4.6. Trockenmassebestimmung

Die Trockenmassebestimmung der Böden wurde gemäß DIN ISO 11465 (1996) - durchgeführt. Sie erfolgte für die Böden mit dem Halogentrockner Mettler Toledo HB 43-S Halogen oder Mettler Toledo HB 43 Halogen Moisture Analyzer, indem circa 2,5 bis 3,5 g FM Boden auf das Wägeschälchen eingewogen wurden. Die Trockensubstanzbestimmung der Klärschlämme erfolgte nach der gleichen Richtlinie, jedoch mit dem Trockenschrank (Hereaus Instruments T6060). Zum Befüllen der Laborkläranlagen wurde die Trockensubstanz (TS) der Klärschlämme aus Zeitgründen mit einem Halogentrockner mit einer Dreifachbestimmung ermittelt. Die Klärschlammmenge wurde in Abhängigkeit von der Konsistenz nach eigenem Ermessen eingewogen.

4.7. pH-Wertbestimmung

Die Bestimmung des pH-Wertes von Böden erfolgte nach DIN ISO 10390 (2005). Dazu wurden 10 g FM Boden in 50 ml Bechergläser eingewogen und mit 25 ml CaCl_2 (0,01 M) versetzt. Die Proben wurden mit einem Spatel aufgerührt, abgedeckt und über Nacht inkubiert, damit sich der pH-Wert und die Temperatur einstellen konnten. Vor der Messung wurde die Dispersion mit einem Magnetrührer aufgerührt und anschließend im Überstand gemessen. Die Bestimmung erfolgte, wie die Kalibrierung des pH-Meters (WTW pH 540 GLP), bei Raumtemperatur. Zwischen den Messungen wurde die Elektrode mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ gespült. Die pH-Werte wurden in einer Einfachbestimmung gemessen.

4.8. Applikationsmethoden und Klärschlammaufbereitung

In den folgenden Unterkapiteln werden die Klärschlammvor- und Klärschlammaufbereitung, die Applikation der AgNM in den Klärschlamm über die Kläranlagensimulation und die Batchapplikation sowie die direkte und die klärschlammgebundene Applikation der AgNM in die Böden beschrieben.

4.8.1. Klärschlammvorbereitung

Vor Versuchsstart wurde jeweils unmittelbar vor dem Einsatz der Schlämme frischer Rücklaufschlamm aus der kommunalen Kläranlage in Schmallenberg entnommen. Der pH-Wert des Klärschlammes wurde in der Kläranlage auf pH 6,7 – 7,0 eingestellt. Der Schlamm wurde auf ≤ 2 mm gesiebt, um gröbere Bestandteile und Fremdstoffe zu entfernen, und wurde bis zur Verwendung im Test unter Belüftung gerührt. Zum Animpfen der Klärschlammfäulung mit den typischen Mikroorganismen wurde Faulschlamm aus dem

Faulturm der Kläranlage Maumke verwendet. Der Faulschlamm wurde direkt aus der Anlage in PE-Flaschen mit möglichst wenig Luftüberstand abgefüllt und für die weitere Verwendung bis zu sieben Tage gelagert. Der Faulschlamm wurde, um ihn möglichst anoxisch bis anaerob zu halten, nicht weiter behandelt.

4.8.2. Herstellung der AgNM-Suspension

Zur Applikation von NM-300K wurde eine AgNM-Stammsuspension gemäß der SOP der Technische Universität Dresden (2011) hergestellt. Dazu wurden 2000 mg NM-300K, das 203,2 mg Ag (10,16 %) beinhaltet, mit 8 mL H₂O_{dem} aufgefüllt. Die Suspension wurde 1 Minute kräftig von Hand geschüttelt und 15 Minuten bei einer Frequenz von 35 kHz im Ultraschallbad (RK 510, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin) dispergiert. Für die Applikation in die Versuchskläranlagen wurden aus der Stammsuspension weitere Verdünnungen in H₂O_{dem} durchgeführt.

Die beiden nanopartikulären, sulfidierten AgNM (Ag₂S NM-300K und Ag₂S NM) wurden als Stammsuspension mit 1000 mg Ag/L ohne weitere Vorbehandlung nach erneutem Aufrühren weiter verdünnt. Die AgNO₃-Lösung wurde direkt durch eine Einwaage angesetzt. Das nicht nanopartikuläre Ag₂S ist in Wasser nicht löslich und wurde direkt abgewogen.

4.8.3. Kläranlagensimulation (OECD Richtlinie 303A)

Die Kläranlagensimulationen wurden in Anlehnung an die OECD Guideline 303A (2001) durchgeführt. Neben Effekten der NM auf die Funktionsfähigkeit der Abbauprozesse in den Kläranlagen dienen die Kläranlagensimulationen primär der Beaufschlagung von Klärschlamm mit Testgegenständen.

Es wurden in den Studien bis zu sechs Laborkläranlagen (behrotest® Laborkläranlage KLD 4N, behr Labortechnik GmbH, Düsseldorf, Deutschland) parallel betrieben. Die Anlagen bestehen aus einer Denitrifikationsstufe (Anaerobbecken), einer Nitrifikationsstufe (Belüftungsbecken) und einem Absetzbecken. Das Gesamtvolumen einer Laborkläranlage beträgt 10 L, die Nitrifikations- und die Denitrifikationsstufen haben ein Volumen von jeweils 4 L, das Absetzbecken hat ein Volumen von 2 L. Der Versuch erfüllt die Validitätskriterien, wenn die Elimination des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) in der Kontrollanlage über 80 % liegt. Hierzu wurde täglich die Menge an DOC im Ein- und Auslauf der Kläranlage gemessen (TOC V_{PCH} mit ASI-V, Shimadzu, Kyoto, Japan) und die Elimination des DOC berechnet. Zudem konnten Aussagen gemacht werden, ob und wie stark die Abbauleistung der Mikroorganismen im Klärschlamm durch den Testgegenstand beeinflusst wird.

Der Versuch wurde bei einer Raumtemperatur zwischen 20 und 25°C durchgeführt. Über Sauerstoffelektroden und eine Belüftung wurde der Sauerstoffgehalt in den

Nitrifikationsbecken durchgängig zwischen 2,0 und 4,5 mg O₂/L gehalten. Synthetisch angesetztes Abwasser wurde als Nährmedium für die Mikroorganismen über den Kläranlageneinlauf zugeführt. Abweichend von der Richtlinie wurde die DOC-Konzentration von maximal 100 mg/L auf 150 mg/L durch einen angepassten Anteil Pepton und Fleischextrakt erhöht, um die pH-Werte in den Laborkläranlagen konstant zu halten und damit die Bildung von „Blähschlamm“ zu reduzieren. Das Leitungswasser in Schmollenberg weist nur eine sehr geringe Pufferkapazität auf, was den pH-Abfall begünstigt, sodass die erhöhte DOC-Fracht ein geeignetes Mittel zur Stabilisierung darstellte. Fünfzehn Liter modifiziertes synthetisches Abwasser wurden zehnfach konzentriert in H₂O_{dem} angesetzt (Tabelle 2) und während der Versuche im Kühlschrank bei 4°C vorgehalten.

Tabelle 2: Zusammensetzung des modifizierten synthetischen Abwassers (~150 mg/L DOC).

Komponente	Menge (einfache Konzentration) [mg/L]
Pepton	210
Fleischextrakt	150
Harnstoff	30
K ₂ HPO ₄	28
NaCl	7
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	4
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	2

Auch die Suspensionen bzw. Lösungen der jeweiligen Testgegenstände wurden zehnfach konzentriert angesetzt und im Kühlschrank vorgehalten. Die Testgegenstände und das synthetische Abwasser wurden über ein Schlauchsystem in die Anlagen dosiert. Zunächst wurde Leitungswasser aus Vorlagebehältern in das Schlauchsystem gepumpt. Über Zweiwegeverteiler wurde kontinuierlich erst das konzentrierte synthetische Abwasser in das Leitungswasser hinzu dosiert und im zweiten Schritt die Suspensionen / -lösungen eingeleitet, um die Konzentrationen um 1:10 auf die Zielkonzentration im Kläranlageneinlauf zu verdünnen. In die Kontrollanlagen wurde nur synthetisches Abwasser eingeleitet. Die Einlaufkonzentrationen des DOC in das Nitrifikationsbecken lagen bei 150 mg/L, die der Testgegenstände betragen entweder 0,4 mg Ag/L oder 1 mg Ag/L. Die Zuflussrate der Anlagen wurde täglich über die Pumpen auf 18 L/d angepasst, was einer hydraulischen Retentionszeit im Nitrifikationsbecken von etwa viereinhalb Stunden entspricht. Das nicht nanopartikuläre Ag₂S ist als Dispersion nicht ausreichend stabil. Deshalb wurde dieser Testgegenstand täglich abgewogen und dem Denitrifikationsbecken zugeführt. Die Einwaage entsprach der Tagesdosis Ag von NM-300K (18 mg Ag).

Der Klärschlamm wurde, wie in Kapitel 4.8.1 beschrieben, vorbehandelt und der TS-Gehalt (Trockensubstanzgehalt) des Klärschlammes bestimmt. Wenn der TS-Gehalt im Klärschlamm außerhalb von 5 bis 10 g TS/L lag, wurde er durch Abdekantieren oder Zuführen von Überstandwasser aus dem Klärschlamm angepasst. Der TS-Gehalt der Anlage sollte bei Testbeginn bei 2,5 g TS/L in der Laborkläranlage (25 g Klärschlamm / 10 L) liegen, dazu wurde auf Grundlage der TS-Bestimmung die benötigte Menge Klärschlamm zu gleichen Teilen in das Nitrifikations- und Denitrifikationsbecken gegeben und mit Leitungswasser verdünnt. In der Einlaufphase wurde die Kläranlage mit reinem synthetischem Abwasser betrieben. Wenn der DOC-Abbau in allen Anlagen gleichermaßen bei über 90 % lag, dies war innerhalb von fünf Tagen der Fall, wurde über die Dauer von 10 Tagen kontinuierlich der Testgegenstand über den Kläranlageneinlauf hinzu dosiert (Ag_2S NonNM wurde direkt eingewogen). Der DOC-Gehalt und der pH-Wert in den Ein- und Ausläufen sowie in den Reinigungsstufen der Kläranlagen wurden täglich bestimmt.

4.8.4. Batchapplikation

Die Batchapplikation bietet die Möglichkeit entweder Testgegenstände in größeren Ansatzmengen oder mehr als sechs parallele Ansätze zu applizieren. Deshalb wurden für die Langzeitversuche drei und vier sowie die Lysimeterstudie die Klärschlämme nicht mit Hilfe der Laborkläranlagen beaufschlagt, sondern in einem vereinfachten Ansatz über eine Batchapplikation.

Für die Applikation von NM in den Klärschlamm wurde der vorbehandelte Klärschlamm in ein ausreichend großes Gefäß gegeben (für die Langzeitversuche 800 mL-Bechergläser; für die Lysimeterstudie 80 L-Speißfässer). Darin wurde der Ansatz mit Magnetrührern oder einem Überkopfrührwerk gerührt und mit Hilfe von porösen Belüftersteinen mit Umgebungsluft belüftet, um komplett anaerobe Verhältnisse durch die starke Sauerstoffzehrung und damit die Faulung des Klärschlammes in dem gesamten Gefäß zu reduzieren. Anschließend wurde eine Trockensubstanzbestimmung mit dem Halogentrockner (Mettler Toledo HB 43, Columbus, USA) durchgeführt, um die gewünschte Trockensubstanz durch Zugabe oder Entnahme von Wasser einzustellen. Diese sollte 10 g/L nicht überschreiten, damit der Schlamm fließfähig bleibt und eine gleichmäßige Belüftung gewährleistet wurde. Die Klärschlamm-trockensubstanz wurde abschließend in einer Dreifachbestimmung untersucht.

Die Anpassungen der TS pro Liter, bzw. der absoluten Klärschlamm-trockensubstanz, erfolgten entweder direkt im Applikationsgefäß bei den Applikationen der Lysimeterstudie oder in einem ersten Ansatzgefäß (PE-Eimer), um den Klärschlamm anschließend in die Applikationsgefäße (Bechergläser) zu überführen. In den Applikationsgefäßen wurde der Klärschlamm ebenfalls gerührt und belüftet. Basierend auf der Klärschlamm-trockensubstanz in den Applikationsgefäßen wurde die gewünschte Menge Stammsuspension (20 mg Ag/mL)

zugegeben. Die Zugabe wurde über vier Stunden gestaffelt durchgeführt, um einen Schockload und damit eine abrupte Hemmung der Mikroorganismen zu vermeiden. Anschließend folgte eine Nährstoffgabe über synthetisches Abwasser und eine Inkubationszeit von 16 Stunden bis zur Aufbereitung des Schlammes, um eine gleichmäßige Verteilung der AgNM in dem Klärschlamm zu gewährleisten und die Verweildauer in der Abwasseraufbereitung einschließlich der Kanalisation und der Kläranlage zu berücksichtigen. Prozessen, wie beispielsweise der Sulfidierung der Partikel, stand dadurch eine möglichst realitätsnahe Zeitspanne für den Ablauf zur Verfügung.

Die Langzeitversuche drei und vier galten der Frage, ob bei den Kläranlagensimulationen ausreichend reduzierbarer Schwefel für die vollständige Sulfidierung der Partikel zur Verfügung steht. Dazu wurde die Studie mit jeweils vier Schwefelkonzentrationen in der Kontrolle und einer ökotoxikologisch relevanten NM-300K-Konzentration angesetzt. Neben dem Schwefel des MgSO_4 und dem organisch gebundenen Schwefel (Pepton und Fleischextrakt) in dem synthetischen Abwasser diente Na_2SO_4 als zusätzliche Schwefelquelle, da dies in großen Mengen über Waschmittel in Haushaltsabwässer eingetragen wird. Die Tabelle 3 zeigt das molare Ag / S- Verhältnis des nicht organisch gebundenen Schwefels, wonach selbst in der geringsten Behandlung ausreichend Schwefel in dem zugeführten synthetischen Abwasser für die vollständige Sulfidierung des Silbers zu Ag_2S vorhanden war.

Tabelle 3: Ag/S-Verhältnis bei der Batchapplikation. Selbst ohne zusätzliche Schwefelzugabe ist die vorhandene Schwefelmenge theoretisch ausreichend, um die AgNM vollständig zu sulfidieren und damit in Ag_2S zu überführen.

Behandlung	Ag/S-Verhältnis [mol/mol]
0 SO_4^{2-} -NM300K	2,0
100 SO_4^{2-} -NM300K	0,7
200 SO_4^{2-} -NM300K	0,3
500 SO_4^{2-} -NM300K	0,1

Für die Lysimeterstudie wurde der Klärschlamm auf 10 ± 1 g TS/L eingestellt. Die Zugabe der AgNM erfolgte auf Grundlage der TS-Bestimmung. Nach der Applikation und der Inkubationszeit von 16 Stunden wurden 3,5 ml Flockungsmittel pro Gramm Klärschlamm Trockensubstanz zugesetzt (siehe Kläranlagensimulation) und der Überstand abdekantiert. Die weitere Klärschlamm aufbereitung folgt im nächsten Kapitel.

4.8.5. Klärschlammaufbereitung

Nachdem die Kläranlagensimulationen oder die Applikationen im Batch beendet waren, wurden die Klärschlämme mit 8 ml Flockungsmittel pro Liter Klärschlamm (Entspricht in etwa 1,5 ml/g TS Klärschlamm) versetzt. Nach fünf Minuten wurde der Überstand abdekantiert. Das Flockungsmittel war auf 0,2 % vorverdünnt und wurde von der kommunalen Kläranlage in Schmallenberg bezogen. Bei dem Flockungsmittel handelte es sich um das kationische Polyacrylamid SEDIFLOC 154 Polymer (Kemira, Helsinki, Finnland). Die Aufwandmenge des Flockungsmittels orientierte sich an den Mengen der Kläranlage Schmallenberg. Der Klärschlamm wurde nach dem Dekantieren aufgeteilt und je nach Studie unterschiedlichen Aufbereitungsvarianten zugeführt, die in der Praxis bereits Anwendung finden oder als praxisrelevante Aufbereitungsvariante diskutiert werden (QLA, 2013).

Direktbehandlung: Die Direktbehandlung stellte als aerobe minimale Behandlung die Referenzbehandlung dar. Die Klärschlämme wurden nach dem Abdekantieren des Überstands durch Zentrifugieren (20 min, 10.000 x g; Avanti J-26S, Beckman Coulter, Brea, USA) und erneutes Abdekantieren des Überstandes weiter entwässert.

Pasteurisieren: Durch Pasteurisieren sollte der Einfluss der Temperatur auf die Bioverfügbarkeit der AgNM untersucht werden. Dazu wurden die Klärschlämme auf einem Magnetrührer mit Heizung und Temperaturfühler (C-MAG HS 7 und PT 1000, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) bei 70° C gerührt (400 rpm). Es wurden zwei unterschiedliche Einwirkzeiten berücksichtigt. Um eventuell auftretende Einflüsse auf die Bioverfügbarkeit zu sehen, wurde die Einwirkzeit der Temperatur erhöht. Die Klärschlämme wurden für eine bzw. drei Stunden pasteurisiert, wobei eine Stunde der Praxis entspricht. Anschließend wurden die Klärschlämme durch Zentrifugieren (30 min, 10.000 x g) und Abdekantieren, wie unter dem Punkt Direktbehandlung beschrieben, weiter entwässert.

Kalkung: Die Einflüsse durch den pH-Wert und Calcium auf die Bioverfügbarkeit der AgNM sollten durch die Klärschlammhygienisierung durch Kalken betrachtet werden. Die Klärschlämme wurden mit 0,6 g CaO / g TS auf mindestens pH 12,8 eingestellt. Die pH-Werte konnten sich über Nacht einstellen und wurden am folgenden Tag kontrolliert. Danach wurden die Klärschlämme, wie unter den Punkten Pasteurisierung und Direktbehandlung beschrieben, unter ständigem Rühren (400 rpm) für 3 Stunden auf 55° C erhitzt und durch Zentrifugieren weiter entwässert.

- Faulung:** Um den Einfluss von anaeroben Verhältnissen auf die Toxizität der AgNM zu untersuchen, wurden die Klärschlämme einer Klärschlammfaulung unterzogen. Die Klärschlämme wurden für 25 und 35 Tage bei $35\pm 2^\circ\text{C}$ bei anaeroben Verhältnissen gerührt. Der praxisrelevante Wert der mesophilen Faulung liegt bei etwa 20 bis 25 Tagen. Die 35 tägige Faulung sollte als Extrembehandlung eventuelle Unterschiede zur 25 tägigen Faulung herausstellen. Die Faulung wurde in Bechergläsern auf Magnetrührern (Ika RH basic 2, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) bei 400 rpm in temperierten Vakuumbrottschränken (Heraeus VT5050EK, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Die Bechergläser waren mit einer nach innen eingewölbten und perforierten Alufolie abgedeckt, um den Feuchtigkeitsverlust zu reduzieren. Die Luftatmosphäre in dem Inkubationsschrank wurde zum Beginn der Faulung im Wechsel fünf Mal auf 600 mbar evakuiert und anschließend mit N_2 geflutet. Anschließend wurde die Atmosphäre in dem Inkubationsschrank arbeitstäglich einmalig evakuiert und mit N_2 geflutet. Nach zwei Tagen wurde der Schlamm mit 10 ml Faulschlamm (Kläranlage Maumke, Lennestadt) angeimpft und die Atmosphäre in dem Inkubationsschrank fünf Mal durch N_2 ersetzt. Um einen gemeinsamen Teststart der gefaulten Behandlungen zu ermöglichen, wurden die 25 Tage gefaulten Klärschlämme nach der Faulung für zehn Tage bei $4\pm 1^\circ\text{C}$ im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Klärschlämme, wie unter dem Punkt Direktbehandlung beschrieben, durch Zentrifugieren weiter entwässert.
- Lysimeterstudie:** Da die Klärschlammmenge zu groß war, um sie zu zentrifugieren, wurde der Wassergehalt mechanisch weiter reduziert. Dazu wurde der Klärschlamm in Gaze (200 μm Maschenweite) eingeschlagen und weiteres Wasser herausgepresst ohne dabei Schlamm durch die Gaze zu drücken.

4.8.6. Applikation in Böden

Die Applikation der Testgegenstände erfolgte gebunden an Klärschlämme. Zudem wurden für eine Studie die Testgegenstände direkt, ohne den Weg über den Klärschlammfad, in die Böden eingebracht.

Die im **zweiten Schritt** aufbereiteten Klärschlämme wurden auf Böden appliziert und die längerfristige Wirkung der sich in den stabilisierten oder hygienisierten Klärschlämmen befindenden Ag-NM auf die Bodenmikroflora untersucht. Der Klärschlammzusatz orientierte sich an der AbfKlärV (1992), nach der innerhalb von 3 Jahren maximal 5 t Klärschlammrockensubstanz pro Hektar aufgebracht werden dürfen. Bei einer Einarbeitungstiefe von 20 cm (Pflugtiefe) und einer mittleren Bodendichte von 1,5 g/cm³ entspricht dies einer Menge von 1,67 g Klärschlammrockensubstanz pro Kilogramm Bodentrockenmasse. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die erlaubte Höchstmenge einmalig und nicht gestaffelt in die Böden eingebracht wird. Die Bodengehalte der Testgegenstände ergaben sich also aus den Konzentrationen der Kläranlageneinläufe, dem Ausmaß der Sorption an die Klärschlämme und der angefallenen Klärschlammmenge nach den Klärschlammaufbereitungen und waren somit nicht präzise einzustellen.

Für sämtliche Versuche wurde aufbereiteter HagenAM2013-Boden verwendet (Kapitel 4.4 und Kapitel 4.5). Unmittelbar vor Testansatz war eine Trockenmassebestimmung der Böden und der Klärschlämme durchgeführt worden. Daraus wurden die benötigten Mengen Frischmasse (FM) von den Böden und den Klärschlämmen sowie die Mengen H₂O_{dem} als Ansatzwasser berechnet, um einen Wassergehalt von 50 % WHK_{max} der Böden zu erhalten. Bei der Applikation der Klärschlämme auf die Böden wurde die benötigte Menge an Klärschlamm (1,67 g TS pro kg TM Boden) in einem Becherglas in einem Teil des Ansatzwassers (~80 %) mit einem Magnetrührer aufgeschlämmt. Im Anschluss wurden die Klärschlammgemische gleichmäßig auf die in Edelstahlwannen ausgebreiteten Böden aufgetragen. Die Böden wurden mit einer Kelle mehrmals gut durchmischt, um eine möglichst homogene Verteilung zu gewährleisten. Mit dem restlichen zur Verfügung stehenden Wasser (~20 %) wurden die Bechergläser durchgespült und ebenfalls den Böden zugeführt. Die Böden wurden erneut durchmischt bis sie gleichmäßig feucht waren, dann wurde von einer gleichmäßigen Verteilung der Klärschlämme mit den darin enthaltenen AgNM ausgegangen. Die Wassergehalte wurden abschließend überprüft und falls notwendig auf 50 % WHK_{max} nachgestellt.

Die Referenzsubstanzen wurden, zusätzlich zur Applikation über eine Kläranlagensimulation, auch ohne den Weg über den Klärschlammfad in die Böden eingebracht. Dafür wurden die Substanzen, die als Suspension vorlagen (NM-300K, Ag₂S NM, NM-300K Ag₂S), auf 5 % (m/m) des luftgetrockneten Bodens in Glasschalen in der gewünschten Menge per Pipette

vorappliziert und mit einem Spatel untergemischt. Anschließend wurden die vorapplizierten Böden auf die restlichen 95 % des in Edelstahlwannen ausgebreiteten Bodens (950 g TM) gleichmäßig verteilt und zunächst ohne Wasserzugabe vermischt. Anschließend wurde das benötigte Ansatzwasser zum Einstellen der Böden auf 50 % der WHK_{max} gleichmäßig mit einem Drucksprüngerät (GLORIA Haus- und Gartengeräte GmbH, Witten, Deutschland) aufgetragen und die Böden erneut durchmischt bis sie gleichmäßig feucht waren, dann wurde von einer gleichmäßigen Verteilung der AgNM ausgegangen. Die Wassergehalte wurden abschließend überprüft und falls notwendig auf 50 % WHK_{max} nachgestellt.

Für die Applikation der Klärschlämme in die Böden der Lysimeter wurden 405 g TS von den aufbereiteten, wasserreduzierten Klärschlämmen auf etwa 25 kg TM-Boden (~55 % WHK_{max}) aus den oberen 20 cm der Lysimeter vorappliziert und 30 Minuten mit einem Zwangsmischer vermengt. Damit wurde die Applikationsmenge erhöht und somit eine homogenere Verteilung der Klärschlämme mit den inkorporierten AgNM im Lysimeter gewährleistet. Die Bodenklärschlammgemische wurden gleichmäßig, flächig auf die Lysimeter aufgetragen und 20 cm tief mit einem Spaten und einem „Dreizack“ eingearbeitet, um das Pflügen zu simulieren. Da die Böden durch die Klärschlämme sehr feucht wurden, wurden die Lysimeter zum Abtrocknen und zum Schutz vor Niederschlag eine Woche lang mit einer Holzplatte abgedeckt und täglich 20 cm tief durchmischt um eine gleichmäßigere Verteilung zu erhalten.

4.9. Inkubation der Böden und Boden- Klärschlammgemische im Labor

Die Böden wurden nach der Applikation, je nach Ansatzmenge, in 1,0 L Braunglasflaschen, 1,5 L Einmachgläser oder 5,0 – 18 L Polypropylen-Eimer (lebensmittelecht) gefüllt und mit einem Deckel oder Alufolie verschlossen. Um einen Gasaustausch zu gewährleisten, wurden die Deckel und die Alufolie mit einer Kanüle leicht perforiert. Die Inkubation erfolgte bei $20^{\circ}\pm 1$ C in Inkubationsschränken (Universalschrank Dishwasher UFP800DW Memmert, Schwabach, Deutschland). Die Füllhöhe der Gefäße hat 15 cm nicht überschritten, um die Bildung anaerober Zonen zu vermeiden. Der Wasserverlust wurde jede zweite Woche über eine Waage (PM32, MettlerToledo, Columbus, USA; oder MSE5203S-100-RD, Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen, Deutschland) kontrolliert und ausgeglichen. Die Böden wurden dabei durchmischt, so dass es zu einer Durchlüftung und Lockerung kam.

Aufgrund der Nährstoffzufuhr über die Klärschlammzugabe konnte die Inkubationszeit abweichend von den einschlägigen Richtlinien (z.B. OECD Guideline 217, 2000, OECD Guideline 216, 2000) auf über 140 Tage ausgedehnt werden. Die Probenahmen erfolgten in der Regel nach 60, 90 und 140 Tagen, bei dem zweiten Langzeitversuch erfolgte eine zusätzliche Probenahme nach 196 Tagen.

4.10. Freilandlysimeterversuch

Um Labordaten mit umweltrelevanteren Freilanddaten zu vergleichen, wurde ein Lysimeterversuch mit NM-300K durchgeführt. Dazu wurde Klärschlamm im Batchversuch mit AgNM versetzt und auf Böden in Lysimetern aufgebracht. Die Lysimeter waren der Witterung ausgesetzt und wurden gemäß der guten landwirtschaftlichen Praxis bewirtschaftet. Die Klärschlammmenge orientierte sich, wie bei den Laborstudien auch, an der AbklärV (1992). Es wurden 0,405 kg TS Klärschlamm als einmalige Gabe aufgebracht, was der erlaubten Applikationsmenge über drei Jahre entspricht.

Die Lysimeter hatten eine Grundfläche von 90 * 90 cm und eine Tiefe von 90 cm. Der Lysimeterkorpus bestand aus Edelstahl. Als unterste Schicht wurden 10 cm Drainagekies (Körnung: 8 – 16 mm) eingebracht, darüber befanden sich 70 cm HagenAM2013-Böden. Die unteren 50 cm waren unbehandelt, die oberen 20 cm wurden mit 200 g CaO-Dünger aufgekalkt, um die Böden auf landwirtschaftlich relevante pH-Werte eines Ap-Horizontes von etwa pH 6,0 anzuheben (Abbildung 3).

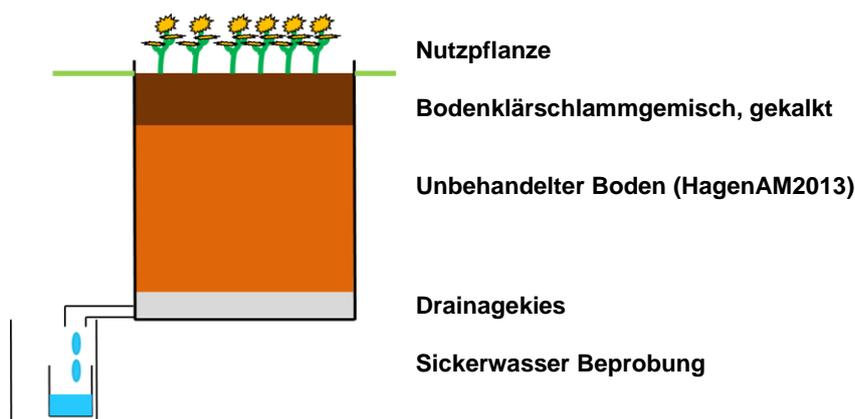


Abbildung 3: Skizze der Freilandlysimeter.

Die Lysimeterstudie umfasste jeweils ein Replikat als Kontrolle, die mit nicht beaufschlagtem Klärschlamm behandelt wurde und zwei AgNM-Behandlungen mit den mittleren Ag-Bodengehalten von 1,8 mg Ag/kg TM und 7,0 mg Ag/kg TM. Aufgrund der Größe der Lysimeter (Volumen und Oberfläche) und des enormen Arbeitsaufwands wurde nur ein Replikat je Behandlung angesetzt. Durch die Größe mit fast einem Quadratmeter Oberfläche und fast einer Tonne Bodeninhalt wurde erwartet trotz der Heterogenität des Boden-Klärschlammgemisches repräsentative Aussagen zu erhalten. Über eine flächendeckende Verteilung von 10 Teilproben für die ökotoxikologischen Fragestellungen und 5 Teilproben für die analytischen Fragestellungen zum Verbleib der AgNM wurden Abweichungen durch Bodenheterogenität gemittelt. Durch die Größe der Lysimeter werden Randeinflüsse und kleinere innere Störstellen wie z.B. präferenzielle Fließwege durch Regenwurmgänge nur gering gewichtet. Schlich (2013) zeigte, dass der Dispersant NM-300K DIS auf die potentielle

Ammoniumoxidation und die Substratinduzierte Respiration nicht toxisch wirkt. Die Effekte der AgNM werden immer auf die Klärschlammkontrolle bezogen, daher wurde auf eine Dispersantenkontrolle und eine reine Bodenkontrolle verzichtet.



Abbildung 4: Zeitleiste der Lysimeterstudie unterteilt in den Freilandteil (Freil.) und Laborteil (Lab.) mit den ökotoxikologischen Bestimmungen (potentielle Ammoniumoxidation, substratinduzierte Respiration) und den Probenahmen für die Ag-Analytik der Boden- und Pflanzenproben und der Bewirtschaftung. Fotos vom Lysimeter zu unterschiedlichen Zeitpunkten: Während der Klärschlammapplikation; B Während der Bodenprobenahme (Kreise deuten die Rotation der Einstiche zu den unterschiedlichen Beprobungszeitpunkten an) und C während der Vegetationsperiode mit Weizen.

Die Lysimeter wurden mit einer Abfolge von landwirtschaftlichen Pflanzen bewirtschaftet, die für die Düngung mit Klärschlamm relevant sind (AbfKlärV §6 Absatz 1, 1992). Das Saatgut war für Forschungszwecke ungebeizt. Im Juni 2014 wurde ein Sommerweizen (*Triticum aestivum* 'Tybalt A' Saaten Union GmbH Isernhagen, Germany) ausgesät, gefolgt von einem Winterraps (*Brassica napus* 'Treffer' KWS Saat SE, Einbeck, Germany) im September 2014 und abschließend einer Wintergerste (*Hordeum vulgare* 'SY Typee' Syngenta, Maintal, Germany) im August 2015. Die genaue Bewirtschaftung und Beprobung ist in Abbildung 4 dargestellt.

Die Pflanzendichte richtete sich nach den Herstellerangaben, die Pflanzen wurden arbeitstäglich bonitiert. In Trockenphasen wurden alle Lysimeter mit der gleiche Menge Leitungswasser gegossen. Aufwachsendes Unkraut wurde unmittelbar herausgezogen, verblieb aber im Lysimeter, um weder Nährstoffe noch Silber auszutragen. Bei der Ernte wurden etwa 25 % der Pflanzen mit ihrer Wurzel entnommen, die übrigen 75 % der Pflanzen wurden etwa 5 cm über der Bodenoberfläche abgeschnitten, ihre Wurzeln verblieben in den Lysimetern als Nährstoffquelle gemäß der landwirtschaftlichen Praxis und um keine AgNM, die sich potentiell in den Wurzeln befinden könnten, aus dem System zu entfernen. Die geernteten Pflanzen wurden in Wurzeln, Spross und Frucht (Ähre, Schote, bzw. Samen) differenziert, die Frischgewichte wurden erfasst und die Pflanzenteile für die Analytik der Gesamtgehalte bei 4°C gelagert.

Nach der Pflanzenernte wurden fünf Bodenproben je Lysimeter mit einem Pürckhauer-Bohrstock über eine Tiefe von 40 cm genommen. Die Bohrpunkte richteten sich nach einem bestimmten Muster und rotierten zwischen den Probenahmen, damit zu jedem Probenahmezeitpunkt eine „ungestörte“ Probe genommen werden konnte (Abbildung 4). Die Bodenproben wurden in Segmente von 10 cm Horizonten untergliedert und an der Luft getrocknet. Der unbelastete Teil der Bohrlöcher (20 - 40 cm) wurde anschließend mit HagenAm2013-Boden verfüllt, damit durch das anschließende Umarbeiten kein kontaminierter Boden eingetragen wurde. Das Befüllen der oberen 20 cm war somit nicht notwendig und die Menge des Bodenverlustes zu vernachlässigen. Für die ökotoxikologischen Untersuchungen wurden mit einer Schaufel etwa 500 g TM Boden entnommen. Abschließend wurden die obersten 20 cm der Böden umgegraben und die Folgefrucht eingesät. Nach dem Winterraps wurde für die Wintergerste eine Bedarfsdüngung gemessen an dem Stickstoffbedarf der Gerste mit einem Universaldünger (Hakaphos® soft plus 14+6+24+3; Compo GmbH, Münster, Germany) vorgenommen.

Das Sickerwasser wurde permanent in Polypropylen-Eimern (lebensmittelecht) aufgefangen, arbeitstäglich wurde die Sickerwassermenge bestimmt und in einem Kühlschrank (Comfort Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland) bei 4 ± 1 °C zu einer Mischprobe vereinigt. Wenn circa 15 L Sickerwasser vereinigt worden waren oder nach spätestens zwei Wochen, wurden 20 mL Probe für die chemische Analytik entnommen und mit 200 µL 69 % HNO₃ suprapur (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) angesäuert bevor sie aufgeschlossen und die Ag-Konzentrationen gemessen wurden. Einmal pro Monat oder nach Starkregenereignissen wurden Frischwasserproben entnommen und unmittelbar analysiert. An den Probenahmeterminen wurden Wasserparameter wie pH-Wert, DOC und EC (Elektronische Leitfähigkeit) bestimmt.

Um Daten aus Laborstudien direkt mit den Daten aus der Freilandlysimeterstudie abzugleichen, wurden 6 kg Boden vor der Einsaat als Mischprobe von verschiedenen Stellen aus den Lysimetern (0-20 cm) entnommen und im Labor inkubiert. Die Böden wurden auf eine Korngröße von unter 2 mm gesiebt und die Böden auf 50 % der WHK_{max} eingestellt. Die Böden wurden für 180 Tage, wie in Kapitel 4.9 beschrieben, bei $20^{\circ}\pm 1$ C im Labor inkubiert und nach 0, 30, 60, 90, 129, 154 und 180 Tagen auf Effekte durch AgNM auf Bodenmikroorganismen untersucht. Die Effekte von AgNM auf die Bodenatmung wurden mit der substratinduzierten Respiration (OECD Guideline 217, 2000) untersucht, die Effekte auf die Nitrifikation wurde mit der potentiellen Ammoniumoxidation (ISO Guideline 15685, 2004) untersucht.

Die in den Lysimetern inkubierten Böden wurden mit den gleichen Methoden zu den Erntezeitpunkten untersucht (Abbildung 4). Die Untersuchungen nach 129 Tagen fanden parallel statt und die Werte von Tag 0 waren gleichzeitig die Startwerte für die im Labor- als auch die in den Lysimetern inkubierten Böden. Die Lysimeterböden wurden fünf Tage vor der Untersuchung entnommen und wie die im Labor inkubierten Böden aufbereitet. Um den Einfluss des Temperaturwechsels zu minimieren, wurden die Böden nach dem Sieben und dem Einstellen der Wassergehalte bis zur Untersuchung im Labor bei $20^{\circ}\pm 1$ C inkubiert.

4.11. Ökotoxikologische Untersuchungen

Die inkubierten Böden wurden zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten ökotoxikologisch untersucht. Der erste Langzeitversuch wurde in einem größeren Umfang, neben der potentiellen Ammoniumoxidation mit zwei weiteren Testsystemen untersucht, die mit einem Ansatz mehrere Stoffumsätze untersuchen, also die funktionelle Diversität betrachten. Diese Methoden erwiesen sich als wenig sensitiv und daher ungeeignet, daher wurden sie bei den folgenden Langzeitversuchen nicht weiter berücksichtigt. Bei der Lysimeterstudie wurden die substratinduzierte Respiration und die potentielle Ammoniumoxidation untersucht. Zusätzlich wurden in den Böden der Lysimeter Pflanzentests und Regenwurmversuche durchgeführt.

4.11.1. Funktionelle Diversität: System MicroResp™

Der Abbau spezifischer Kohlenstoffquellen in Böden wurde mit dem System MicroResp™ untersucht. Dabei werden den Böden in Microtiterplatten Nährlösungen mit gelösten Kohlenstoffverbindungen zugesetzt und die dadurch induzierte Respiration kolorimetrisch auf Indikatorplatten erfasst.

Vor Testansatz wurden die Indikatorplatten hergestellt. Hierzu wurden die Indikatorlösung und eine 3 prozentige Agarlösung angesetzt. Für die Indikatorlösung wurden 18,75 mg des Farbstoffs Kresol Rot, 16,77 g KCl und 0,315 g $NaHCO_3$ in 1000 mL H_2O_{dem} bei geringer

Temperatur (< 65 °C) gelöst. Für die Agarlösung wurden 3 g Agar in 100 mL H₂O_{dem} gelöst und anschließend 20 min bei 121 ± 3 °C autoklaviert (DX 65, Systec GmbH, Linden, Deutschland). Bei einer Temperatur von 60 °C wurden zwei Teile Indikatorlösung mit einem Teil Agarlösung auf einem Magnetrührer bei 250 rpm gemischt und anschließend 150 µL der Lösung je Well mit einer Transferpipette in klare Kunststoff 96-Well-Platten (96 wells-F, sterile Fa. VWR Leuven, Belgien) überführt. Die Indikatorplatten wurden im nächsten Schritt abgedunkelt in einem Exsikkator bei Raumtemperatur mit Natronkalk als CO₂-Falle und einem Becher Wasser für 2 – 3 Tage gelagert, dann mit Parafilm versiegelt und in CO₂-freier Atmosphäre weiter in einem Exsikkator gelagert.

Ein Tag vor Versuchsdurchführung wurden für alle Böden die Wassergehalte bestimmt, da diese maßgebend für die Konzentration der Substratlösung sind. Die Böden wurden danach mit der zum System gehörenden Vorrichtung in Deepwell-Platten (Deepwell Platte 96-well, PP, 1,2ml, U-Boden, Low Profile, unsteril, Fa. Brand Wertheim, Deutschland) eingefüllt und die mittlere Füllmasse der Wells ermittelt. Die Platten wurden anschließend mit Parafilm versiegelt für 24 Std bei 25,0±0,5 °C in einem Klimaschrank (Heratherm Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) inkubiert. Sofern sich die Wassergehalte der zu beprobenden Böden nicht wesentlich voneinander unterschieden, wurde der mittlere Wassergehalt zur Berechnung der Substratlösungen herangezogen. Diese wurden so angesetzt, dass 30 mg Substrat auf 1 g Bodenwasser gelangen, wenn 25 µL Substratlösung pro Well zugeführt werden.

Am folgenden Untersuchungstag wurden die Substratlösungen auf die in die Deepwell-Platten vorliegenden Böden pipettiert und mit der Dichtungsmatte verschlossen. Unmittelbar danach wurde die Absorption der Indikatorplatten bei 570 nm mit einem Plattenphotometer (Epoch Mikroplatten-Spektralphotometer Fa. BioTek Winooski, United States) gemessen. Sofern der Variationskoeffizient der Absorptionen der gemessenen Indikatorplatte kleiner 5 % betrug, wurde die Platte auf die Oberseite der Dichtmatte gedrückt und mit der Spannvorrichtung luftdicht verschlossen. Die Ansätze wurden für 6 Std bei 25 °C inkubiert und die Absorptionen der Indikatorplatten erneut gemessen. Die Berechnungen der CO₂-Produktion erfolgten nach den Herstellerangaben des Systems.

4.11.2. Funktionelle Diversität: Enzymaktivitätsmuster in Bodenproben mit fluorogenen Substraten (DIN ISO/TS 22939)

Der Einfluss von AgNM auf die funktionelle Diversität der inkubierten Böden wurde durch den Abbau spezifischer Substratklassen ermittelt. Die Messung erfolgte nach DIN ISO/TS 22939 (2010) Bodenbeschaffenheit – Messung von Enzymaktivitätsmustern in Bodenproben mit fluorogenen Substraten in Microtiterplatten. Dabei wird eine Bodendispersion mit ausgewählten fluorogenen Substratlösungen inkubiert (Tabelle 4). Durch die Aktivität der Enzyme werden die Substrate abgebaut und die frei werdenden Fluorogene in Form von Fluoreszenz messbar. Die Messungen wurden nach Anhang A der Richtlinie „Anleitung zur Verwendung frisch angesetzter Substratlösungen“ (DIN ISO/TS 22939, 2010) durchgeführt.

Ein Tag vor Versuchsdurchführung wurden, aufgrund der geringen Einwaage der Böden, für alle Böden die Wassergehalte bestimmt. Für den Versuch wurden 2 g TM in 250 ml Schottflaschen eingewogen und mit 200 ml autoklaviertem Ultra High Quality Wasser (UHQ) für drei Minuten mit einem Ultra Turrax® bei 9600 rpm homogenisiert. Damit die Probe nicht überhitzt, wurde sie währenddessen mit Eis gekühlt. Für den Versuch wurden zwei Pufferlösungen benutzt, der 2-(N-Morpholino) Ethansulfonsäure (MES)-Puffer mit einem pH-Wert von 6,1 und der Trizma-Puffer mit einem pH-Wert von 7,8. Die MES-Pufferlösung ist sowohl für die Enzyme des Kohlenstoffkreislaufs als auch für die der Phosphatase und Sulfatase zu verwenden. Diese Substrate enthalten 4-Methylumbelliferyl-Phosphat (MUF) als fluoreszierende Verbindung. Der Trizmapuffer dient der Bestimmung der Peptidasen. Die Substrate enthalten 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) als fluoreszierende Verbindung (Tabelle 4).

Die Pufferlösungen wurden am Vortag angesetzt und 20 min bei 121 ± 3 °C autoklaviert. Für den MES-Puffer (0,1 M) wurden 22,1 g MES pro Liter gelöst, für den Trizma-Puffer (0,05 M) wurden 0,985 g Trizma-Base und 2,66 g Trizma-HCl in 0,5 l H₂O gelöst.

Für die Substratlösungen mit einer Konzentration von 10 mmol in 10 ml Kolben, wurden die eingewogenen Substrate in 300 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und mit UHQ aufgefüllt. Anschließend ist jeweils 1 ml mit der Pipette abgenommen und mit der dem Substrat entsprechenden Pufferlösung auf 10 ml aufgefüllt worden, um eine Konzentration von 1 mmol/l zu erhalten. Für Reaktionen auf MUF- bzw. AMC-Basis wurden die Substanzen für den Standard in DMSO mit einer Konzentration von 5 mmol/l gelöst und mit MES-Pufferlösung (MUF) und Trizma-Pufferlösung (AMC) auf 50,0 µmol/l verdünnt. Daraus wurden Konzentrationsreihen von 0,1 / 0,5 / 1,0 / 5,0 / 10,0 / 25,0 / 50,0 µmol/l hergestellt. Um auszuschließen, dass die Substrate abiotisch zerfallen, wurden Wells mit 100 µL Pufferlösung und mit 100 µL Substratlösung befüllt.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Substrate und der abbauenden Enzyme (Quelle ISO TS 22939, 2010).

Enzym	Substrat	Element	Abgebautes Makromolekül
Arylsulfatase	4-MUF-sulfat	Schwefel	Mineralisation von org. Schwefel
α -Glucosidase	4-MUF- α -D-glucopyranosid	Kohlenstoff	Stärke und Glykogen
Cellobiosidase	4-MUF- β -cellobiopyranosid	Kohlenstoff	Cellulose
Lipase	4-MUF-nonanoat	Kohlenstoff	Lipide
β -Xylosidase	4-MUF- β -D-xylopyranosid	Kohlenstoff	Xylan, Xylobiose
β -Glucosidase	4-MUF- β -D-glucopyranosid	Kohlenstoff	Cellulose
Phosphodiesterase (PDE)	bis-(4-MUF)-phosphat	Phosphor	Hydrolyse von Phosphatdiestern
Chitinase	4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminid	Kohlenstoff	Abbau von Chitin durch Aufspaltung von β -1-4glycosidischen Bindungen zu N-Acetyl-glucosaminid und Chitobiose
Phosphomonoesterase (PME)	4-MUF-phosphat	Phosphor	Hydrolyse von Phosphatestern
Leucin-aminopeptidase	L-Leucin-AMC	Stickstoff	Hydrolyse von Oligopeptiden \rightarrow Aminosäuren
Alanin-aminopeptidase	L-Alanin-AMC	Stickstoff	Hydrolyse von Oligopeptiden \rightarrow Aminosäuren

Die Messung wurde in 96-Well-Microtiterplatten (96F nontreated white microwell, Fa. Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 50 μ l Bodensuspension und 50 μ l autoklavierte Pufferlösung (MES oder Trizma) in jedes Well pipettiert und 100 μ l der Substratlösung hinzugegeben. Im Anschluss an die Zugabe der Substratlösung in die Wells wurde direkt der Nullwert gemessen. Die Platten wurden für drei Stunden bei $30 \pm 2^\circ\text{C}$ in einem Schüttelinkubator bei 700 rpm inkubiert bevor sie wieder gemessen wurden. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm mit einem Plattenphotometer (Synergy MX, BioTek Germany, Bad Friedrichshall, Deutschland).

4.11.3. Potentielle Ammoniumoxidation (ISO 15685)

Die Messung der potentiellen Ammoniumoxidation wurde in Anlehnung an die ISO Guideline 15685 (2004) durchgeführt. Bei der potentiellen Ammoniumoxidation wird der erste Schritt der Nitrifikation in Böden betrachtet, bei dem nitrifizierende Mikroorganismen (u. A. *Nitrosomonas*) Ammonium (NH_4^+) oder Ammoniak (NH_3) zu Nitrit (NO_2^-) oxidieren. Der Zweite Schritt, die weitere Oxidation zu Nitrat (durch u. A. *Nitrobakter*) wird dabei durch Natriumchlorat gehemmt, sodass Nitrit in Böden akkumuliert und gemessen werden kann.

Bei der potentiellen Ammoniumoxidation wird die Nitritbildungsrate eines Bodens bestimmt. Dazu wird der Boden in einer Nährlösung mit Ammonium als Substrat aufgeschlämmt, die so viel Natriumchlorat enthält, dass es die Nitritbildung nicht beeinflusst, aber den zweiten Schritt der Nitrifikation, die weitere Oxidation zu Nitrat (NO_3^-). Die Messung der Nitritkonzentration erfolgte über vier Replikate mit jeweils vier Einzelmessungen an einem Epoch Mikroplatten-Spektralphotometer (BioTek Winooski, United States). Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 530 nm bestimmt. Der Versuch gilt als valide, wenn der Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle maximal bei 15 % liegt.

Für den Versuch wurden 25 g TM der jeweiligen Böden in 250 mL Erlenmeyerkolben eingewogen und mit einem Prüfmedium aus Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Natriumchlorat (NaClO_3) und Diammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) aufgeschlämmt. Bei größeren Ansätzen konnte die Einwaage am Vorabend erfolgen, die Kolben wurden dann ohne Prüfmedium mit einem Zellstoffstopfen verschlossen und in einem Klimaschrank bei 21 ± 1 °C inkubiert. Die Böden wurden mit Prüfmedium so aufgefüllt, dass das Prüfmedium zusammen mit dem Bodenwasser 100 mL ergaben. Anschließend wurden die Proben in einem Inkubationsschüttler (Multitron Pro, Infors Ag; Bottmingen, Schweiz) bei $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ mit 175 rpm inkubiert und nach zwei und sechs Stunden beprobt. Dazu wurden jeweils 5 mL Probe entnommen und mit 5 mL einer vier molaren KOH-Lösung versetzt. Im Anschluss wurden die Proben 5 Minuten bei 10.000 X g zentrifugiert (Avanti J-26S, Beckman Coulter, Brea, USA). Für die Farbreaktion, die durch Nitrit ausgelöst wird, wurde eine Pufferlösung mit NH_4Cl und eine Farbreagenz aus Sulfanilamid, Phosphorsäure und N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamine-Dihydrochlorid hergestellt. Für die Kalibration der Messung wurde mit Natriumnitrit eine Eichreihe von 0 – 0,8 (1,6) $\mu\text{g N/mL}$ angesetzt.

Je 150 μL des Filtrates und der Eichreihe wurden mit 150 μL der zwei Farbreagenzien vermischt. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten auf einem Schüttelinkubator bei 150 rpm (Celltron Infors Ag; Bottmingen, Schweiz) inkubiert, bevor die Nitritkonzentration der Proben bestimmt wurde.

4.11.4. Kohlenstofftransformation (OECD Richtlinie 217)

Die Bestimmung der Kohlenstofftransformation erfolgte gemäß OECD Guideline 217 (2000) Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test als Substratinduzierte Respiration. Dabei wird durch die Zugabe eines Glucose-Talkum-Gemisches (1:6 G:T) die Dissimilation der aeroben Mikroorganismen angeregt und die CO_2 -Zehrung, bzw. O_2 -Produktion detektiert. Die Bestimmung erfolgte in Dreierreplikaten. Der Versuch gilt als valide, wenn der Variationskoeffizient zwischen den Replikaten der Kontrolle ≤ 15 % liegt.

Je Replikat wurden 100 g TM in ein Probenglas eingewogen und 2,64 g Glukose-Talkum-Gemisch durch Schütteln in den Boden eingearbeitet. Die Probengefäße wurden mit Natronkalkplätzchen als CO₂-Falle versehen und verschlossen. Die Gefäße wurden ca. 30 Minuten im Wasserbad bei 20 °C vortemperiert, bevor sie an das Messsystem angeschlossen wurden. Die Respiration wurde über 24 Stunden mittels Sapromat (Fa. IBUK, Königsbrunn, Deutschland) detektiert.

Bei der substratinduzierten Respiration wird bei einer konstanten Temperatur in einem geschlossenen System (Sapromat) die Atmungsaktivität eines Bodens als O₂-Aufnahme bestimmt. Der Boden, bzw. die darin enthaltenen aeroben Mikroorganismen, verbrauchen während der Respiration O₂ und produzieren gleichzeitig CO₂, welches durch Natronkalk aufgefangen wird. Es kommt zu einem Druckungleichgewicht zwischen Probengefäß, Sauerstoffzeuger und Schaltmanometer, der Stromkreis im Schaltmanometer schließt sich. Der dadurch bedingte elektrolytisch nachgelieferte Sauerstoff wird in Form der anfallenden Strommenge, die für einen Druckausgleich nötig ist, als Milligramm produzierter Sauerstoff über die gesamte Testdauer aufgezeichnet.

Für die Auswertung wurden die Atmungsraten während der linearen Phase, zwischen der Adaptions- und Wachstumsphase herangezogen. In dieser Phase sind alle beteiligten Mikroorganismen aktiv, ohne dass Populationswachstum die Atmung verfälscht.

4.11.5. Regenwurmzucht

Für die Versuche mit Ringelwürmern wurde der Kompostwurm *Eisenia andrei* verwendet. Die Zucht am Fraunhofer IME besteht schon seit über 20 Jahren. Die Würmer werden unter definierten Bedingungen gezüchtet. Sie werden in einem Zuchtsubstrat aus 69 % [w/w] Weißtorf, 24 % [w/w] Kaolin und 7 % [w/w] CaCO₃ gezüchtet. Der pH-Wert des Zuchtsubstrats wird mit CaCO₃ auf pH 6,5 bis 7,0 eingestellt. Die Raumtemperatur der Zucht liegt bei 20±2°C und der Raum wird mit einem Tag- / Nacht-Rhythmus von 16 / 8 Stunden beleuchtet. Die Tiere werden wöchentlich nach Bedarf mit kontrolliertem Pferdedung (ohne Wurmkur der Pferde) gefüttert.

4.11.6. Regenwurmreproduktionstest (OECD Richtlinie 222)

Der Regenwurmreproduktionstest wurde wie in der OECD Guideline 222 (2004) beschrieben durchgeführt. Bei dem Regenwurmreproduktionstest werden als Endpunkte die Veränderung der Biomasse bzw. Mortalität der adulten Würmer nach 28 Tagen sowie die Anzahl der juvenilen Würmer nach 56 Tagen erfasst. Die Validitätskriterien des Versuchs sind erfüllt, wenn in jedem Replikat der Kontrolle mindestens 30 juvenile Würmer vorhanden sind und der Variationskoeffizient der Reproduktion unter 30 % liegt. Zudem darf die Mortalität der adulten Tiere aller Kontrollreplikate nicht über 10 % liegen.

Vor jedem Versuch wurden Tiere mit einem Clitellum und Frischgewicht zwischen 250 und 600 mg aus den Zuchtgefäßen separiert. Diese Tiere wurden an den Versuchsboden HagenAM2013 (nicht aus den Lysimetern, ohne Klärschlamm) mit den entsprechenden Versuchsbedingungen (50 % WHK_{max}) über drei Tage adaptiert. Für die Tiere wurde eine ausreichende Menge an Futter in die Böden eingearbeitet, um einen stressbedingten Gewichtsverlust zu verhindern. Das Futter bestand wie das Futter der Zucht aus kontrolliertem, antibiotika- und wurmkurfreien Pferdedung. Der Dung wurde zuvor getrocknet und auf < 2 mm gemahlen. Vor der Futtergabe wurde der Pferdedung mit H₂O_{dem} im Verhältnis von 1:5 (H₂O_{dem}:Pferdedung) angefeuchtet.

Der Versuch wurde mit acht Replikaten der Kontrolle und jeweils 4 Replikaten der AgNM-beaufschlagten Böden durchgeführt. Für den Versuch wurden jeweils 625 g TM der Lysimeterböden (pH-Werte ~5,6) in Gefäße aus Polypropylen (Bellaplast GmbH, Alf, Deutschland) eingewogen und 10 Tiere eingesetzt, nachdem ihr Gewicht bestimmt worden war. Das Gewicht der Würmer wurde individuell erfasst und notiert. Die Gefäße wurden mit perforierten Deckeln aus Polypropylen verschlossen, um die Flucht der Tiere und zu starkes Austrocknen der Gefäße zu unterbinden. Der Test wurde mit einem 16/8-Tag/Nacht-Rhythmus (400 - 800 Lux) bei einer Temperatur von 20±2°C inkubiert. Der Wassergehalt der Gefäße wurde wöchentlich über Wägung überprüft, der Wasserverlust ausgeglichen und 25 g FM Pferdedung gefüttert.

Nach 28 Tagen wurde der Wassergehalt nachgestellt und die adulten Würmer aus den Gefäßen entnommen, gezählt (auf Mortalität geprüft) und die Gewichtsveränderung über 28 Tage bestimmt. Anschließend wurden die Böden letztmalig mit 25 g FM Pferdedung als Futter für die Juvenilen gefüttert. Bis zu Tag 56 erfolgte keine weitere Fütterung, sondern nur der Ausgleich des Wasserverlustes. Nach 56 Tagen wurde die Anzahl der juvenilen Würmer in den Testgefäßen bestimmt.

4.11.7. Regenwurmfluchttest (ISO 17512-1)

Zusätzlich zu dem Regenwurmreproduktionstest wurde in den Böden der Lysimeter ein Regenwurmfluchttest nach ISO Guideline 17512-1 (2008) durchgeführt. Dieser Test untersucht, ob die Würmer, die über ihre Haut und den Verdauungstrakt in unmittelbarem Kontakt zu ihrem Umgebungsmedium stehen, die AgNM in Böden wahrnehmen und ihnen ausweichen. Dazu werden 10 Würmer in Gefäße gesetzt, die auf der einen Seite mit Kontrollboden und der anderen Seite mit Testboden befüllt sind. Die Tiere können sich frei in den beiden Böden bewegen und gegebenenfalls den Testboden meiden. Der Test gilt als valide, wenn die Anzahl der fehlenden Würmer in der Kontrolle ≤ 10% liegt und wenn in den Kontrollen (Kontrolle vs. Kontrolle) die Verteilungen je Seite im Mittel zwischen 40 % und 60 % liegen.

Der Versuch wurde mit fünf Replikaten durchgeführt, es wurden jeweils Kontrollböden und die zwei AgNM-Behandlungen als Testböden zusammen mit Kontrollböden als Ausweichmöglichkeit für die Würmer getestet. Es wurden in Schalen aus Polypropylen (Bellaplast GmbH, Alf, Deutschland) je Seite 350 g TM Boden in die Schalen eingefüllt, die durch eine Trennscheibe in gleichgroße Bereiche unterteilt waren. Die Trennscheibe wurde anschließend entfernt, sodass die Böden Kontakt zueinander hatten und je Testgefäß zehn gleichgroße Würmer mit einem Gewicht zwischen 300 bis 600 mg mittig auf die Trennlinie der Böden gelegt. Die Gefäße wurden mit perforierten Deckeln verschlossen und mit einem 16/8-Tag/Nacht-Rhythmus (400 - 800 Lux) bei $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Nach genau 48 Stunden Inkubationszeit wurde die Trennscheibe wieder mittig in die Gefäße hineingedrückt und die Anzahl der Tiere je Seite erfasst. Die Tiere, die durch die Trennscheibe geteilt wurden, wurden unabhängig von der Größe der Segmente als halber Wurm pro Seite gewertet.

4.11.8. Pflanzentest (OECD Richtlinie 208)

Die Pflanzentests wurden, wie in der OECD Guideline 208 (2006) beschrieben, in den Böden der Lysimeter durchgeführt. Die Versuche wurden mit jeweils sechs Replikaten der Kontrolle und vier Replikaten der AgNM-Behandlungen mit den Pflanzensorten des Lysimeterversuchs durchgeführt. Es wurde das Keimen, bzw. die Mortalität der Pflanzen, sowie deren Biomasse nach 14 Tagen erfasst. Die Validitätskriterien des Versuchs sind ab einer Keimrate von mindestens 70 % der Samen und anschließender Überlebensrate von 90 % sowie durch das Ausbleiben phytotoxischer Merkmale in den Kontrollen erfüllt.

Die Studie wurde parallel mit allen drei Pflanzenarten des Lysimeterversuchs (Kapitel 4.10) unter definierten Bedingungen ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 25\%$ Luftfeuchtegehalt, Tag/Nacht-Rhythmus 16/8 Stunden, von etwa 8.000-12.000 Lux Lichtintensität und 400 – 700 nm Wellenlängen) in einer Klimakammer (Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen, Deutschland) durchgeführt.

In Pflanztöpfe (TB 9; Polypropylen, Soparco, Condé-sur-Huisne, Frankreich) wurden 20 cm lange Glasfaserdochte zur späteren Bewässerung durch das mittlere Loch der Töpfe geführt und ein Filterpapier auf den Boden der Töpfe gelegt. Die Töpfe wurden mit 280 g TM der aufbereiteten Böden aus den Lysimetern befüllt und mit einem Stempel fünf Vertiefungen (5 mm) für die Pflanzensamen in die Böden gedrückt. Die Samen wurden eingesetzt, die Vertiefungen mit dem Finger zugeedrückt und die Ansätze mit 10 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ befeuchtet.

Die Ansätze akklimatisierten für 24 Stunden in der Klimakammer auf Gitterrosten, bevor die Dochte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ angefeuchtet wurden und in die dafür darunter bereitgestellten Wasserschalen gehängt wurden. Es wurde darauf geachtet, dass den unterschiedlichen Behandlungen unterschiedliche Wasserschalen zur Verfügung standen. Die Wasserschalen

waren mit einer Düngertlösung („Compo Grünpflanzendünger“ (Compo GmbH, Münster, Deutschland) 1 mL/L H₂O_{dem}) befüllt und wurden nach Wasserbedarf der Pflanzen nachgefüllt, sodass die Pflanzen immer ausreichend Wasser und Nährstoffe hatten.

Die Ansätze wurden arbeitstägig hinsichtlich Keimung, Absterben, Nekrosen, Chlorosen und sonstiger Anomalien bonitiert und ausgetrocknete Bodenoberflächen mit H₂O_{dem} benetzt. Der Versuchstag 1 bezeichnet den Zeitpunkt, an dem mindestens die Hälfte der Pflanzen in den Kontrollansätzen gekeimt war. Nach 14 Tagen wurden die Studien aufgelöst und die oberirdische Pflanzenfrischmasse je Pflanze bestimmt.

4.12. Statistische Auswertung

Die Auswertung der ökotoxikologischen Daten wurde mit dem Statistikprogramm ToxRat Professional (ToxRat Solutions GmbH, Online Version 2.09 und 2.10) durchgeführt. Das Programm wurde für die routinemäßige Auswertung toxikologischer und ökotoxikologischer Testsysteme nach OECD- oder DIN- bzw. ISO-Richtlinien entwickelt. Es bietet, neben vorgegebenen Tests für Varianzanalysen, Varianzhomogenität, paarweisen Vergleichen, multiplen Vergleichen und Ausreißer-Tests, auch verschiedene Möglichkeiten Dosis-Wirkungs-Kurven zu erstellen.

Die Auswertung der ökotoxikologischen Untersuchungen, nach Testung der Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test und der Varianzhomogenität mit dem Levene's Test, erfolgte mittels Student's t-Test für homogene Varianzen und mittels Welch-t-Test für nicht homogene Varianzen. Die beaufschlagten Behandlungen wurden jeweils gegen die Kontrolle getestet. Die Testung wurde einseitig kleiner, mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ durchgeführt. Alle signifikanten Unterschiede wurden in den Abbildungen mit Sternchen versehen (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$), die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Behandlungen dar.

4.13. Molekularbiologische Untersuchungen

In den Klärschlämmen, die für die Langzeitversuche 3, 5 und 8 verwendet wurden, wurde zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten die Abundanz von SRB untersucht. Für den Langzeitversuch 3 erfolgte die Untersuchung in den Faulschlämmen exemplarisch in den höchsten und geringsten Sulfatstufen der Kontrolle und der AgNM-Behandlung mit einer nestedPCR. Die Langzeitversuche 5 und 8 wurden zum Start und nach Abschluss der Kläranlagensimulationen und nach Abschluss der Faulung mittels DGGE untersucht. Dazu wurde jeweils DNA, bzw. RNA für den Nachweis der gesamten Bakterien, aus den Klärschlämmen extrahiert. Die genauen, detaillierten Beschreibungen der Arbeitsschritte sind in der Bachelorarbeit von F. Wege (2016. Einfluss von Silber-Nanomaterial auf die Zusammensetzung der Klärschlammmikroflora in verschiedenen Stufen der Abwasserreinigung und der Klärschlammaufbereitung. B, Hochschule Ostwestfalen-Lippe; <https://www.ime.fraunhofer.de/>) beschrieben.

4.13.1. Primer

Um schwefelreduzierende Bakterien zu bestimmen, wurden DGGE-Primer auf Grundlage der Sequenz des *dsr*-Gens B konzipiert. Bakterien, die das *dsr*-Gen besitzen, sind in der Lage, über ein Enzym Sulfat dissimilativ zu reduzieren. Die DGGE-Primer wurden mit dem Programm CLC Sequence Viewer 7.0.2 (Qiagen, Hilden, Deutschland) auf Grundlage von sieben verschiedenen SRB-Gattungen, die in europäischen Abwasserhabitaten und Böden vorkommen, konzipiert (Primersequenz: *dsrF-GC-2*: 5'-GGC GGC TCC GGC TCC AAC CTG CG-3' / *dsrF-GC-5*: 5'-GGA CTG GTG GAT GGA AGA AGG CAA GAA CCG-3'). Die ausgewählten Gattungen waren: *Desulfovibrio*, *Desulfococcus*, *Desulfobulbus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomicrobium*, *Desulfotomaculum*, *Desulforhabdus* (DNA-Sequenzen NCBI, 2016).

Für die Gesamtheit der Bakterien wurde ein Standard-all-bacteria-Primer, der auf der ribosomalen RNA basiert, genutzt. Für die nestedPCR wurde der bereits genannte all-bacteria-Primer (ohne GC-Klammer, dieser verhindert die komplette Denaturierung der DNA-Sequenzen) im ersten Schritt verwendet. Anschließend folgten gruppenspezifische Primer für die SRB (Anhang 3).

4.13.2. DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mit dem PowerFecal DNA-Isolations-Kit (Mo Bio, Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei diesem DNA-Isolations-Kit werden die Zellen nicht nur durch eine chemische oder enzymatische Lyse aufgespalten, sondern zusätzlich durch mechanische Beanspruchung mit Beads. Vor der Extraktion wurden 50 ml der Klär- und Faulschlämme in 50 mL Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht, Deutschland)

für 15 min bei 13.000 * g zentrifugiert und der Überstand abdekantiert, um den Wassergehalt zu reduzieren. Die Probe, in diesem Fall Klärschlamm, wurde anschließend direkt in das Dry PowerBead Tube (500 mg FM) eingewogen. Anschließend wurde die C1-Lösung, die die Zelllyse einleitet, hinzugegeben. Die Inhalte der Probenröhrchen wurden mit einem Beater (FastPrep®-24 Instrument, Santa Ana, USA) für 10 Minuten homogenisiert und anschließend entgegen der Herstellerangaben 1 min bei 13.000 * g zentrifugiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren auf den SpinFilter gegeben, dort bindet die DNA an die Membran. Anschließend wurden mehrere Waschschriffe mit Ethanollösungen durchgeführt, um Verunreinigungen durch Zell- und Proteinreste zu beseitigen. Zum Schluss wurde die DNA in Puffer eluiert. Die DNA-Konzentration wurde am Spectrometer (NanoDrop2000, Wilmington, USA) bestimmt und bei -20°C gelagert

4.13.3. RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mit PowerMicrobiome (Mo Bio, Carlsbad, USA) RNA-Isolation-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Wie bei der DNA-Extraktion beschrieben, wurden die Klärschlämme durch Zentrifugieren eingedickt, in BeadTubes eingewogen, homogenisiert, lysiert und anschließend die Nukleotide an eine Membran gebunden. In einem weiteren Schritt wurden durch die Zugabe von DNase letzte DNA-Fragmente beseitigt. Nach weiteren Waschschriffen wurde die RNA in Puffer eluiert. Bei der Arbeit mit RNA wurde darauf geachtet, dass die Proben immer auf Eis gekühlt wurden. Die DNA-Konzentration wurde am Spectrometer (NanoDrop2000, Wilmington, USA) bestimmt und bei -80±1°C (Herafreeze basic, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gelagert.

4.13.4. Normalisierung der Proben

Die DNA- und RNA-Extrakte wurden auf eine gemeinsame Konzentration normalisiert, damit die einzelnen Proben im DGGE-Bild eine ähnliche Menge DNA aufweisen und das Bild nicht überladen wird. Nach der Extraktion von DNA und RNA wurden die Proben auf 50 ng/µL mit DNase freiem Wasser verdünnt.

4.13.5. Umschreibung der RNA in cDNA

Da RNA durch eine PCR (Polymerase-Kettenreaktion) nicht unmittelbar amplifiziert werden kann, muss die RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden. Dieser Schritt erfolgte durch das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, Primern und dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphat) wird aus einem RNA-Strang die dazu komplementäre cDNA hergestellt.

4.13.1. Polymerase-Kettenreaktion, verschachtelte Polymerase-Kettenreaktion und Denaturierungsgradientengelelektrophorese

Für die verschiedenen PCR-Durchgänge wurden Ansätze von 50 µL gewählt. Dafür wurde jeweils ein Master-Mix (48 µL) vorbereitet. Dieser Master-Mix enthielt: 0,5 µL 5PRIME Taq Polymerase, 5 µL 5PRIME Taq 5x Puffers und jeweils 2 µL Primer (forward und reverse; 10 pmol) und 38,5 µL H₂O_{dem}. Von dem Master-Mix wurden jeweils 48 µL in 0,2 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht, Deutschland) pipettiert und abschließend 2 µL DNA oder cDNA als Template hinzu pipettiert. Anschließend wurden die PCR-Ansätze in den Thermocycler (Prime Full Size, Techne Staffordshire, UK) gestellt und das Temperaturprogramm der Tabelle 5 mit 30 Zyklen gestartet.

Tabelle 5: Temperaturprogramm der PCR für den dsr-Primer und all-bacteria-Primer.

		Temperatur [°C]	Zeit [min.]
Initiale Denaturierung		94	5
Denaturierung	30 Zyklen	94	0,5
Annealing		55	0,5
Elongation		72	1
End-Elongation		72	5

Bei der DGGE werden die DNA-Stränge in Abhängigkeit ihres GC-Gehaltes aufgetrennt. Dieser bestimmt die Laufstrecke der DNA-Stränge in dem Gel und somit können Unterschiede in der DNA bestimmt werden und auf mikrobielle Gruppen (Arten) geschlossen werden. Die DGGE wurden nach den Ergebnissen aus Vorversuchen mit einem Gradienten zwischen 30 % und 80 % denaturierender Substanz durchgeführt.

Für die denaturierenden Lösungen wurde TAE-Puffer angesetzt (50fach konzentriert). Dieser bestand aus 242 g Tris (hydroxymethyl-) Amionmethan, 82 g wasserfreiem Natriumacetat (C₂H₃NaO₂) und 18,5 g NatriumEDTA (C₁₀H₁₄O₈N₂Na₂), welche eingewogen und mit circa 800 ml H₂O_{dem} versetzt wurden. Mit Essigsäure (C₂H₄O₂) wurde der pH-Wert auf 7,8 eingestellt und anschließend auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt. Von der dreißigprozentigen und der achtzigprozentigen Lösung für die Polyacrylamidgele wurden jeweils 100 mL angesetzt. Für die 30%ige Lösung wurden 1 ml des TAE Puffers (50fach konzentriert) sowie 22,5 mL Polyacrylamid (40 %) mit den denaturierenden Komponenten 12,6 g Urea und 12 mL Formamid versetzt und anschließend auf 100 mL aufgefüllt. Für die 80%ige Lösung wurden die Konzentrationen der denaturierenden Komponenten auf 33,6 g Urea und 32 mL Formamid erhöht und anschließend auf 100 ml aufgefüllt.

Die Glasscheiben des DGGE Systems wurden mit Ethanol gereinigt und danach nach den Herstellervorgaben zusammengesetzt. Die ausgewählten Gradientenlösungen wurden mit

50 µL APS (20 %ig) und 5 µL Temed versetzt und in ein „Zwei-Säulen-System“ gegeben. Dieses mischt die zwei unterschiedlich konzentrierten Lösungen und leitet sie zu einem gleichmäßigen Gradientengel zwischen die Glasplatten ein. Nach dem Gießen der Gele wurde der 50fach konzentrierte Puffer zu 7 L einfach konzentriertem Puffer verdünnt, in den Puffertank des Systems gefüllt und auf 65°C temperiert. Nach etwa einer Stunde waren die Gele ausgehärtet und wurden mit einem „Trenngel“ über dem 30%igen Gel beladen. In dieses Gel wurden mit einem Kamm (Form) die Taschen für die Ansätze geformt. Das Trenngel (0,04 mL TAE Puffer (50fach konzentriert); 0,9 mL 40 % Polyacrylamid; 3,06 H) enthält keine denaturierenden Komponenten aber einen höheren Anteil APS (40 µL) und Temed (4 µL) als die Gradientengele zur schnellen Polymerisation der Gele und diente einem gleichmäßigen Start der DNA. Nach zehn Minuten wurde der Kamm entfernt und die Gele in die entsprechende Vorrichtung des Systems eingesetzt. Diese wurden in den Puffertank gehängt und die Taschen des Trenngels vor dem Beladen mit dem warmen Puffer geflutet. 20 µL der jeweiligen Probe wurden zum Beladen der Taschen mit 10 µL Orange G-EDTA-Glycerin-Gemisch versetzt, um die Probe anzufärben und damit das Pipettieren zu erleichtern. Die Proben wurden in die Taschen der sich im Puffer befindenden Gele pipettiert.

Die Gelelektrophorese wurde über 16 Stunden bei 120 V bei 60 °C des Puffers über Nacht durchgeführt, danach wurden die Gele aus der Vorrichtung genommen und die obere Glasscheibe sowie das Trenngel entfernt. Die Gele wurden anschließend für 30 Minuten in SYBR® Gold Lösung (50 µL SYBR®Gold (Invitrogen, Carlsbad, USA), 10 mL TAE Puffer (50fach) auf 500 mL mit H₂O_{dem} aufgefüllt) angefärbt. Anschließend wurden die Gele für zehn Minuten in einer Wanne mit H₂O_{dem} entfärbt, bevor die Gele in der UV-Kammer (Gene Flash, Syngene, Cambridge, UK) abgelichtet wurden.

Bestimmte Banden der Gele wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA mit dem Gen Elute Gel extraction-Kit (Sigma-Aldrich, St, Louis, USA) extrahiert und die DNA zur Sequenzierung zum Fraunhofer IME MB nach Aachen versendet.

Die nestedPCR wurde nach einer RNA-Extraktion und anschließendem Umschreiben in cDNA mit der DNA von vier schwefelreduzierenden Bakterien als Positivkontrollen durchgeführt. Die Methode basierte auf der Veröffentlichung von Sacaca C. et al. (2009). Das PCR-Programm ist in der Tabelle in Anhang 4 dargestellt. Da die verwendeten Primer nicht DGGE-ges geeignet waren, wurde eine Reverse Transcriptase (RT)-PCR und im Anschluss eine Agarose-Gelelektrophorese in 1 %igem Agarosegel durchgeführt (40 V, 40 Min.), bevor die Gele in der UV-Kammer abgelichtet wurden. Alle Bandenintensitäten wurden mit Gene Tools (Version 4.03.05.0; Philomath, USA) erfasst, aber nur die Intensitäten der Banden auf Höhe der jeweiligen Positivkontrolle miteinander verglichen, sodass eine Aussage zur Anwesenheit der jeweiligen Spezies getroffen werden konnte.

4.14. Chemische Analytik

Die Analytik beschränkt sich auf die Messung der Ag-Gesamtgehalte und die Elementanalyse der Partikel bei den TEM-Untersuchungen.

4.14.1. Aufschluss und Messung von Ag-Bodengehalten

Der Aufschluss der Bodenproben erfolgte nach ISO Guideline 11466 (1995). Vor der Extraktion wurden die Bodenproben bei 105 °C getrocknet und anschließend für 5 Minuten in einer Stößelmühle (RM 100, Retsch Technology GmbH, Haan, Deutschland) gemahlen. Anschließend wurden 3 g des gemahlene Materials in 250 mL Gefäße eingewogen, mit 28 mL Königswasser (21 mL HCl (30 % J.T.Baker) plus 7 mL HNO₃ (69 % suprapur; Carl Roth GmbH & Co. KG) versetzt und über Nacht für 16 Stunden ohne Wärmezufuhr inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze über zwei Stunden bei 140 °C in einer Schwermetall-Aufschlusseinheit mit Rückfluss und Schwermetallkühlfallen (0,5 M HNO₃) (SMA20A, Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter Deutschland) gekocht. Zu Beginn des Kochvorgangs wurden die Ansätze beobachtet, um sie bei Aufschäumen von der Heizplatte zu entfernen, zusätzlich wurde der stark organische Referenzboden CRM 026 050 (RTC, Laramie, USA) mit fünf Tropfen 1-Oktanol versehen, was die Oberflächenspannung und damit das Aufkochen reduzierte.

Die Königswasserextrakte wurden auf Raumtemperatur gekühlt, die Schwermetallkühlfallen in die 250 mL Gefäße und anschließend der gesamte Extrakt in 100 mL Kolben überführt und vorsichtig mit HCl (3 %) auf 100 mL aufgefüllt. Vor der Analyse wurden die Proben filtriert (0.45 µm, Spritzenfiltervorsätze, Polyethylenterephthalat- (PET-) Membran, Graphic Controls, Buffalo, NY, USA). Zusammen mit den Bodenproben wurden Referenzböden CRM 026 050 (RTC) und Blanks (reines Königswasser) aufgeschlossen, um den Aufschluss zu verifizieren.

Die gelösten Silberkonzentrationen der extrahierten Proben wurden mit ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry; Agilent 7700, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) als Isotop 107Ag im Kollisionsgasmodus mit Helium oder mit ICP-OES (inductively coupled plasma- optical emission spectrometry; Agilent 720, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bei Wellenlängen von 328.068 nm gemessen. Alle Proben wurden als Dreierreplikat analysiert. Die Geräte wurden mit Verdünnungen von zertifizierten Silber ICP-Standard mit 1000 mg Ag/L in 10 % HNO₃ kalibriert und während der Messungen mit Hilfe von Standards (multi-element Merck IV Standard (Merck)) auf Messabweichungen überprüft, um diese gegebenenfalls zu identifizieren und zu korrigieren. Alle Standards hatten eine finale Konzentration von 10 % HNO₃ (suprapur® (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,

Deutschland). Das verwendete Wasser war mit dem ELGA Pure Lab Ultra water purification system (purified water resistivity >18 M Ω .cm) aufbereitet.

4.14.1. Aufschluss und Messung von Sickerwasser, Boden- und Pflanzenproben

Die Boden- und Pflanzenproben wurden bei der BGR (Bundesanstalt für Geowissenschaften in Hannover) aufgeschlossen und deren Ag-Gehalte bestimmt. Das Pflanzenmaterial (Wurzeln, gewaschene Wurzeln, Sprosse, Samen (Raps) und Korn (Getreide)) wurde getrocknet, gemahlen und anschließend mit Salpetersäure aufgeschlossen (65 % HNO₃, Suprapur, Merck, Darmstadt, Deutschland) (Lowry et al., 2012). Die Menge an konzentrierter HNO₃ wurde dabei von 1,5 mL auf 4,0 mL erhöht, um eine komplette Lösung der stärkereichen Körner zu gewährleisten. Die Bodenproben wurden mittels Königswasseraufschluss gemäß DIN 38414-7 (1983) aufgeschlossen. Die Sickerwasserproben wurden unmittelbar nach der Probenahme filtriert (0.45 μ m, Graphic Controls, Buffalo, NY, USA) und mit 0,2 % konzentrierter HNO₃ (HNO₃ Suprapur; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) angesäuert (DIN 38402-11, 2009). Die Ag-Konzentrationen in den Boden- und Pflanzenaufschlüssen sowie den Sickerwasserproben wurden entweder mit ICP MS (ICP-MS, 7500 Series, Agilent, Santa Clara, California, USA) oder ICP-OES (Ciros Vision, Spectro, Kleve, Deutschland) gemessen.

4.14.2. Aufbereitung der Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie

Die AgNM in den Faul- und Klärschlämmen bzw. den Böden (Bodenklärschlammgemischen), die für den Langzeitversuch 5 verwendet wurden, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten elektronenmikroskopisch mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht. Die Untersuchungen wurden in den Klärschlämmen nach Abschluss der Kläranlagensimulation und der Klärschlammfäulung und in den Böden nach der Inkubation über 140 Tage durchgeführt. Damit das Flockungsmittel den Nachweis der AgNM nicht beeinflusst, wurde für diese Untersuchungen eine Teilmenge ohne Flockungsmittel zentrifugiert. Jeweils etwa 3 g der Klärschlamm- und Bodenproben wurden gefriergetrocknet (Alpha 1-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) und bis zur Weiteraufbereitung bei der EAWAG (Dübendorf, Schweiz) unter N₂-Atmosphäre konserviert.

Die Proben wurden mit einem Achatmörtel zu feinem Pulver gemahlen und 10 mg Klärschlamm oder 100 mg Boden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß (Polypropylen; Eppendorf Hamburg, Deutschland) eingewogen und mit 1,5 mL H₂O_{dem} aufgefüllt. Die Proben wurden mit einer Vialtweeter sonotrode (6*10 Sek Ultraschall / 10 Sek Pause; 6 – 7 W; VialTweeter sonotrode, ultrasonic processor UP200St, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland) behandelt. Die Proben wurden jeweils 1:10.000 (Klärschlamm) und 1:100

(Boden) in 1:10 Schritten verdünnt, jeweils mit einer Ultraschallbehandlung vor jedem weiteren Verdünnungsschritt. Grobe Sandpartikel in den Bodenproben sedimentierten dabei zu Boden und wurden nicht weiter in die folgenden Verdünnungsschritte mit einbezogen.

Den Oberflächen der TEM-Grids (Carbon coated Cu grids, Quantifoil GmbH oder holey carbon Cu grids, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden mit einem "glow discharge system" (ELMO (<10⁻¹ mbar, 2,5 mA, 30 Sek), Cordouan Technologies, Pessac, Frankreich) hydrophile Eigenschaften gegeben, bevor die Suspensionen der letzten Verdünnungsstufe mittels Zentrifugation und Tropfendeposition auf die TEM-Grids aufgebracht wurden.

Die AgNM wurden in Reaktionsgefäßen (PP, Eppendorf Ag, Hamburg, Deutschland) mit einem besonderen Gridhalter, der sich in der Suspension befand, für eine Stunde bei 14.000 * g bei 15 °C in einem Ausschwingrotor auf die Grids zentrifugiert. Für die Tropfendeposition wurden 5 Tropfen der finalen Konzentration auf die TEM-Grids gegeben und einzeln mit einem fusselfreien Papiertuch durch das Grid gesaugt. Nach dem Aufbringen der AgNM wurden die TEM-Grids in drei Tropfen H₂O_{dem} gewaschen, um Verunreinigungen durch Salzkristalle zu vermeiden.

Die Proben wurden mit einem scanning TEM (HD-2700-Cs, Hitachi Ltd. Corporation, Chiyoda, Japan) untersucht und die Aufnahmen anschließend mit dem Bildauswertungsprogramm FIJI (Schindelin et al., 2012) ausgewertet. Die Elementanalysen der einzelnen AgNM wurden mit Digital Micrograph (Gatan Inc.) über ein energy dispersive X-ray (EDX) System (EDAX, Mahwah, USA), das an das Mikroskop gekoppelt war, aufgezeichnet.

4.15. Übersicht der Versuchsreihen mit ihren Testzielen, Testsubstanzen und Konzentrationen sowie den Aufbereitungsmethoden

Eine Übersicht der Versuchsreihen für die vorliegende Dissertation mit den angestrebten Ag-Zielkonzentrationen und – Zielgehalten, den angewendeten Aufbereitungsvarianten sowie den Versuchsinhalten ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Übersicht der Versuche (LZ = Langzeitversuch; StdV = Standardversuch (ohne Applikation über Klärschlamm); D = Direkt; P = Pasteurisiert; K = Kalkung; F = Faulung; SRB = Schwefelreduzierende Bakterien; AgNM = Silbernanomaterialien)

Versuch	Ag-Zielgehalte: Einlauf (Boden) [mg Ag/kg; mg Ag/L]	Aufbereitung	Versuchsinhalt
LZ1	1,0 (4,0)	D; P; K; F	Screening aller Aufbereitungsvarianten mit einer ökotoxikologisch wirksamen Ag-Konzentration im Kläranlageneinlauf → Einfluss von verschiedenen Klärschlammaufbereitungen auf die Bioverfügbarkeit von AgNM
LZ 2	0,4; 1,0 (1,6; 4,0)	D; P; K; F	Bestätigung der Ergebnisse aus LZ 1 und Testung einer geringeren Ag-Konzentration, um eventuelle Reduktion der Hemmungen zu erfassen → Einfluss von verschiedenen Klärschlammaufbereitungen auf die Bioverfügbarkeit von AgNM
LZ 3	1,0 (4,0)	D; F	Batchapplikation, um den Einfluss der verfügbaren reduzierbaren Schwefelmenge zu erfassen, Applikation im Batch als Vorversuch für LZ 5, da die Ansatzvarianten die vorhandene Anzahl an Laborkläranlagen überstiegen → Einfluss der verfügbaren Schwefelkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM
LZ 4	(4,0)	D; F	Batchapplikation, zur Bestätigung der Ergebnisse aus LZ 3 und Nachweis von SRB → Einfluss der verfügbaren Schwefelkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM
LZ 5	(4,0)	D; K; F	Versuch nach Applikation über Kläranlagensimulation mit erhöhter Umweltrelevanz, Nachweis von SRB und elektronenmikroskopische Untersuchung der AgNM → Einfluss der verfügbaren Schwefelkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM
LZ 6	0,1; 1,0 (4,0)	D; F	Untersuchung des Einflusses der „hohen“ Ag-Konzentrationen im Kläranlageneinlauf auf die Bioverfügbarkeit der AgNM über reduzierte Ag-Konzentrationen im Einlauf und im Gegenzug erhöhte Klärschlammengen in Böden → Einfluss der Ag - Einlaufkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM
LZ 7	0,1; 1,0 (4,0)	D; F	Bestätigung der Ergebnisse aus LZ 3 und Nachweis von SRB → Einfluss der Ag - Einlaufkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM
LZ 8	1,0 (4,0)	D; F	Abgleich der Bioverfügbarkeit von unter unterschiedlichen Bedingungen sulfidierten AgNM und anderen Ag-Materialien → Bioverfügbarkeit von chemisch synthetisiertem Ag ₂ S
StdV	(0,56; 1,67; 5,0)	–	Untersuchung der gleichen Ag-Mat. wie in LZ 8 ohne Kläranlagensimulation → Bioverfügbarkeit von chemisch synthetisiertem Ag ₂ S
Lysi-meter	(1,8; 9,0)	D	Untersuchung der Effekte über mehr als zwei Jahre mit zwei Methoden, Verlagerung und Pflanzenaufnahme → Übertragbarkeit von Labordaten auf Daten aus Freilandversuchen

5. Ergebnisse

Der Einfluss der Klärschlammvorbehandlung auf die Bioverfügbarkeit von Silbernanomaterialien wurde in einem dreigliedrigen Ansatz betrachtet. Im ersten Schritt wurde in Laborkläranlagen Klärschlamm mit AgNM versetzt, um diesen im zweiten Schritt mit unterschiedlichen Aufbereitungsvarianten zu konditionieren. Der aufbereitete Klärschlamm wurde im dritten Schritt in Böden eingearbeitet und in Langzeitversuchen inkubiert.

5.1. Stabilität der NM-300K Stammdispersion

Für NM-300K wurde exemplarisch die Stabilität der auf 1 mg Ag/L verdünnten Stammdispersion nachgewiesen (Abbildung 5). Der Nachweis sollte zum einen eine gleichmäßige Ag-Konzentration über zehn Tage im Kläranlageneinlauf sicherzustellen, zum anderen die unveränderten metallischen Eigenschaften der AgNM nachweisen. Dazu wurde die Plasmonenresonanz in zwei Dispersionsansätzen über jeweils fünf Tage Einlaufzeit überprüft (Abgebildet sind nur die Spektren nach Ansatz der jeweiligen Dispersion und nach fünf Tagen Einlaufzeit (Ansatz 1: D1 bis D5₍₁₎; Ansatz 2 (D5₍₂₎ bis D10)).

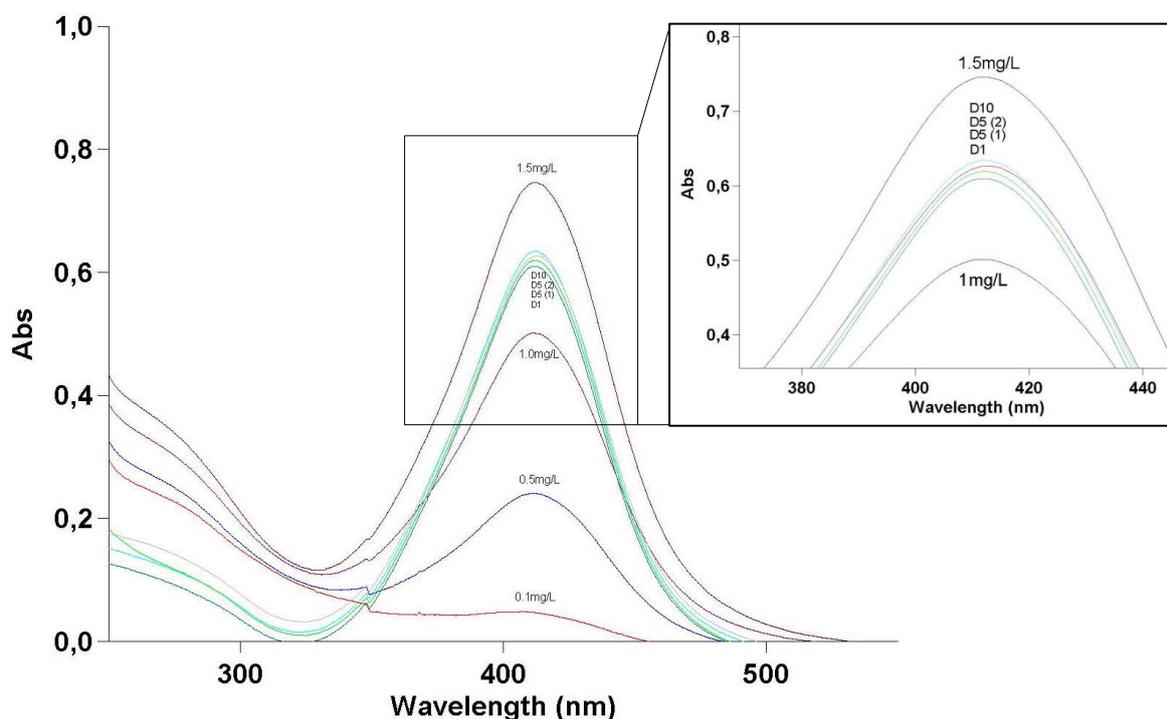


Abbildung 5: Nachweis der Stabilität von zwei NM-300K - Dispersion von Kläranlageneinläufen über fünf Tage (Ansatz 1: D1 – D5₍₁₎; Ansatz 2: D5₍₂₎ – D10) durch den Vergleich der Plasmonenresonanz mit der Plasmonenresonanz von Referenzspektren (0,1mg Ag/L – 1,5mg Ag/L).

Diese zwei Ansätze wurden für die Applikationsdauer von zehn Tagen für eine Kläranlagensimulation genutzt. Die zwei Dispersionen veränderten sich über den Zeitraum von fünf Tagen nicht. Der zweite Ansatz war identisch mit dem ersten. Die vier abgebildeten Spektren (D1, D5₍₁₎, D5₍₂₎, D10) zeigten die gleiche Lage und den gleichen Verlauf.

Die Ag-Konzentration kann mit dieser Methode nur grob abgeschätzt werden, daher verlaufen die Graphen zwischen denen der Referenzen (1,0 mg Ag/L und 1,5 mg Ag/L). Für die weiteren getesteten AgNM (sulfidierte AgNM und AgNO₃) ist der Stabilitätsnachweis der Dispersion mit dieser Methode nicht möglich, da die Plasmonenresonanz nano- und materialspezifisch ist.

5.2. Einfluss von NM-300K, AgNO₃ und verschiedenen Ag₂S auf die Funktionsfähigkeit des Abbaus in der Kläranlage

Um den Einfluss von verschiedenen AgNM auf die Funktionsfähigkeit der Kläranlage zu untersuchen wurde täglich die Elimination des über das synthetische Abwasser zugeführten DOC gemessen. Hier zeigte sich bei keiner getesteten Konzentration ein Einfluss durch den Testgegenstand. Die über die Applikationsdauer von 10 Tagen gemittelten Eliminationen des DOC lagen bei den Kläranlagensimulationen in allen Behandlungen bei mindestens 95 % (Tabelle 7). Darüber hinaus wurden in regelmäßigen Abständen NO₂⁻, NO₃⁻ und NH₄⁺ im Auslauf der Laborkläranlagen gemessen. Hier zeigte sich ebenfalls bei keinem Testgegenstand ein auffälliger Unterschied zur Kontrollbehandlung (Daten nicht abgebildet).

Tabelle 7: Mittlere DOC Elimination [%] ± Standardabweichung über zehn Tage Substanzzugabe während der einzelnen Kläranlagensimulationen.

Testgegenstand und nominale Einlaufkonzentration [mg Ag / L]	Kontrolle			NM-300K						Ag ₂ S NM	Ag ₂ S NM-300K	Ag ₂ S NonNM	AgNO ₃
	-	-	-	0,1	0,1	0,4	0,4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Kläranlagensimulation 1	97,0 ±1,1	96,9 ±1,0	-	-	-	-	-	97,0 ±0,6	97,2 ±0,6	-	-	-	-
Kläranlagensimulation 2	97,4 ±0,4	97,3 ±0,5	-	-	-	97,5 ±0,4	97,4 ±0,7	97,3 ±0,6	97,4 ±0,7	-	-	-	-
Kläranlagensimulation 3	96,5 ±0,8	96,7* ±0,5*	-	-	-	-	-	96,9 ±0,6	97,1* ±0,5*	-	-	-	-
Kläranlagensimulation 4*	97,6* ±0,1*	97,6* ±0,2*	97,5* ±0,3*	97,6* ±0,2*	97,6* ±0,2*	-	-	-	-	-	-	-	-
Kläranlagensimulation 5*	96,9* ±0,5*	-	-	-	-	-	-	96,7* ±0,5*	-	96,9* ±0,5*	94,5* ±7,2*	96,8* ±0,6*	97,0* ±0,5*
Kläranlagensimulation 6*	96,1* ±0,6*	96,2* ±0,5*	-	96,3* ±0,4*	96,4* ±0,5*	-	-	96,4* ±1,1*	-	-	-	-	-

* Schwefelkonzentration um 200 mg/L angehoben

5.3. Einfluss von verschiedenen Klärschlammaufbereitungen auf die Bioverfügbarkeit von AgNM

Um den Einfluss der vier unterschiedlichen Aufbereitungsvarianten des Klärschlamms zu prüfen, wurden zwei Langzeitversuche mit aufbereitetem Klärschlamm aus Kläranlagensimulationen angesetzt. Der erste Versuch wurde mit einer nominalen Konzentration von 1 mg Ag/L NM-300K im Kläranlageneinlauf angesetzt, die zu einem ökotoxikologisch wirksamen Bodengehalt von etwa 5 mg Ag/kg TM führen sollte. Der zweite Versuch wurde mit der gleichen Konzentration angesetzt, um die Ergebnisse des ersten Versuchs zu validieren und um eine niedrigere Konzentration von 0,4 mg Ag/L im Einlauf ergänzt, die zu einem Bodengehalt von etwa 2 mg Ag/kg TM führen sollte.

5.3.1. Langzeitversuch 1

Der erste Langzeitversuch war als Limittest mit einer Kontrolle und einer Einlaufkonzentration von 1 mg Ag/L angesetzt und sollte den direkten Vergleich der Verfahren zur Klärschlammaufbereitung ermöglichen, da derselbe Boden und Klärschlamm mit gleichen Nanosilberkonzentrationen genutzt wurden. Die Bodenansätze des Langzeitversuchs wurden mit unterschiedlichen ökotoxikologischen Methoden auf einen Einfluss von NM-300K untersucht.

5.3.1.1. Bodengehalte

Die Ag-Gehalte der Böden des ersten Langzeitversuchs sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Der reine Boden hatte einen Ag-Gehalt von 0,04 mg Ag/kg TM und wurde durch die Einarbeitung der Kontrollklärschlämme nicht erhöht. Der Ag-Gehalt der Direktbehandlung lag bei 5,1 mg Ag/kg TM. Die unterschiedlichen Aufbereitungen des Klärschlamms führten zu unterschiedlichen Bodengehalten. Der mit gekalktem Klärschlamm beaufschlagte Boden wies einen Ag-Gehalt von 4,2 mg Ag/kg TM auf, die Pasteurisierung und Faulung führte zu erhöhten Ag-Gehalten von etwa 6,3 mg Ag/kg TM bis 7,4 mg Ag/kg TM.

Tabelle 8: Langzeitversuch 1 - Ag-Bodengehalte

	Kontrolle	NM-300K 1,0 mg/L
Behandlung	[mg Ag/kg TM]	[mg Ag/kg TM]
Boden	0,04	
Direkt	0,04	5,07
Kalk	0,03	4,16
Pasteurisieren 1h	0,03	6,30
Pasteurisieren 3h	0,03	7,37
Faulung 25d	0,03	6,75
Faulung 35d	0,03	7,15

5.3.1.2. Potentielle Ammoniumoxidation

Die Nitritproduktion der potentiellen Ammoniumoxidation des ersten Langzeitversuchs ist in der Abbildung 6 dargestellt, die berechneten Hemmungen gegenüber der spezifischen Kontrolle finden sich in Abbildung 7. Die Ergebnisse der potentiellen Ammoniumoxidation zeigen, dass, abgesehen von der Klärschlammkontrolle der Kalkbehandlung, sämtliche Klärschlammkontrollen auf einem Niveau lagen und dieses Niveau über die Inkubationsdauer von 140 Tagen abnahm. Die Werte sanken von etwa 160 bis 180 ng NO₂-N/gTM*h an Tag 60 auf etwa 125 ng NO₂-N/gTM*h. Gegenüber den spezifischen Kontrollen zeigten sich alle AgNM-Behandlungen, bis auf die der Kalkbehandlung, statistisch signifikant gehemmt. Die Nitrifikanten waren an Tag 60 ca. 20 % gehemmt; an Tag 90 stieg diese Hemmung auf etwa 40 %. Die 35 Tage gefaulte Behandlung zeigte nach 90 Tagen eine mit über 60 % etwas stärkere Hemmung. Nach 140 Tagen Inkubation der Bodenklärschlammgemische glichen sich die Hemmungen auf etwa 70 – 80 % gegenüber ihrer spezifischen Klärschlammkontrollen an.

Die Klärschlammkontrolle der Kalkbehandlung zeigte sich über die gesamte Versuchsdauer inaktiver als die Kontrollen der anderen Ansätze. Die Aktivität der Klärschlammkontrolle der Kalkbehandlung blieb gegenüber den anderen Klärschlammkontrollen etwa 20 % zurück. Die mit AgNM beaufschlagte Kalkbehandlung lag an allen Untersuchungstagen etwa auf dem Niveau der Klärschlammkontrolle. Daher zeigte sich über den gesamten Zeitraum keine Hemmung. In einem separaten Wiederholungsversuch für die Kalkbehandlung (gleicher Boden und gleicher Klärschlamm) wurden die Daten aus Langzeitversuch 1 bestätigt. Diese Daten sind nicht dargestellt.

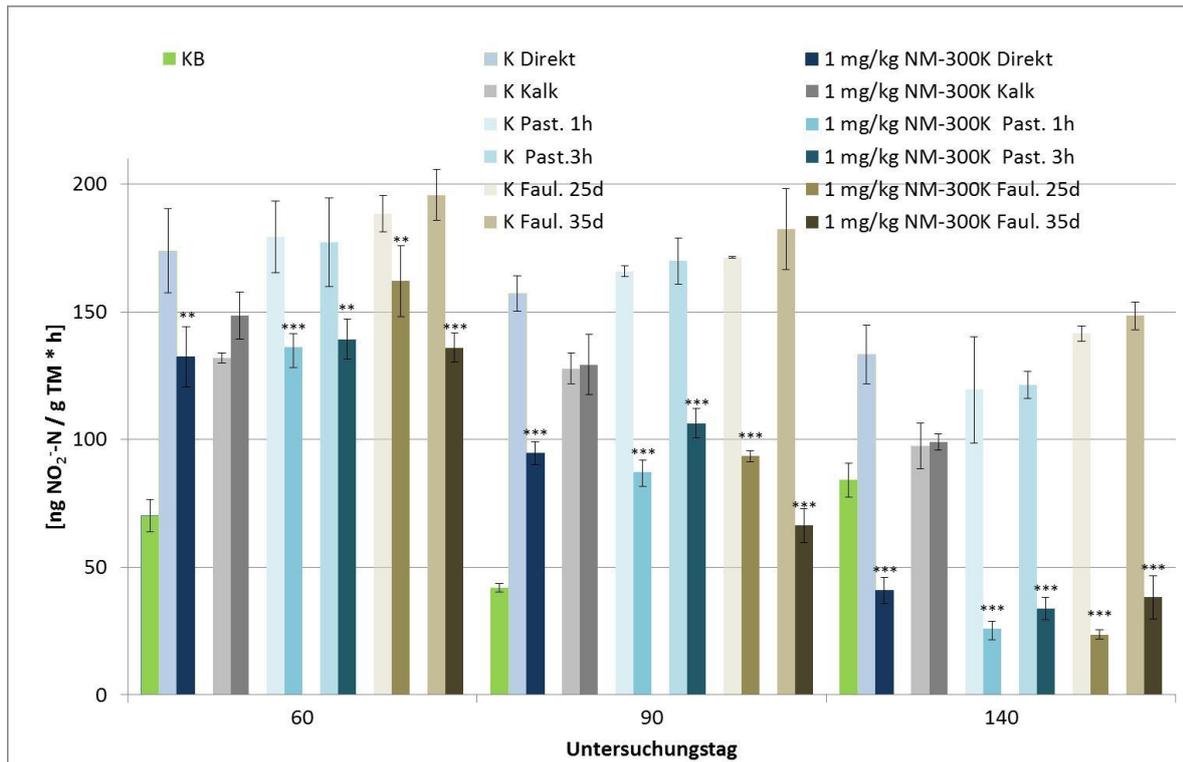


Abbildung 6: Langzeitversuch 1 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)

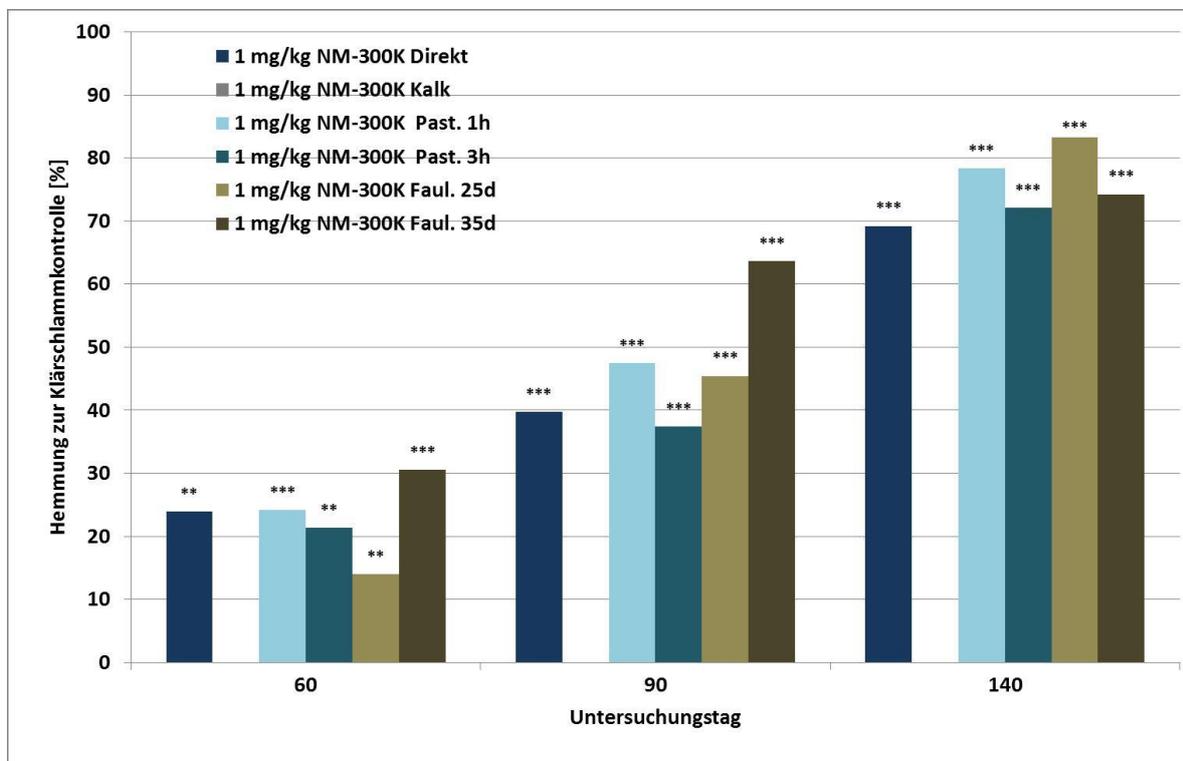


Abbildung 7: Langzeitversuch 1 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle nach unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001))

5.3.1.3. Funktionelle Diversität mittels fluorogener Substrate

Die Tabellen in den Anhängen 5 - 13 stellen die Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate dar. Hierbei zeigte sich, dass die Substrate an allen Untersuchungstagen unterschiedlich stark abgebaut wurden. 4-MUF-nonanoat und 4-MUF-phosphat wurden besonders stark abgebaut und ließen somit mehr Fluorogen frei werden. An Tag 60 war ebenfalls der Abbau von L-Leucin-AMC und L-Alanin-AMC gegenüber den weiteren Substraten gesteigert. Ausgenommen vom L-Leucin-AMC- und L-Alanin-AMC-Abbau war die Aktivität der Böden an Tag 60 insgesamt geringer als an den Tagen 90 und 140.

Zwischen den unterschiedlichen Aufbereitungsvarianten zeigten sich an allen Untersuchungstagen nur geringe Unterschiede. Zwischen den Untersuchungstagen zeigte sich bei den jeweiligen Aufbereitungsvarianten ebenfalls nur ein geringer Unterschied der Abbauaktivität. Abgesehen von wenigen signifikanten Hemmungen wiesen die Daten zum Substratabbau keine Tendenz auf. Signifikante Hemmungen ließen sich nur beim Abbau des Substrates 4-MUF-nonanoat ermitteln: Nur die Direktbehandlung zeigte sich an allen drei Untersuchungstagen gehemmt. Darüber hinaus waren die 1 Stunde pasteurisierte Behandlung nach 140 Tagen Inkubation und die 25 Tage gefaulte Behandlung nach 90 Tagen Inkubation gehemmt. Insgesamt wiesen die Daten eine starke Streuung und somit Standardabweichung auf.

5.3.1.4. Untersuchung der funktionellen Diversität mittels System MicroResp

Die Abbauraten spezifischer Kohlenstoffquellen sind in den Anhängen 14, 15 und 16 zu finden. Die Abbauraten, die mittels des Systems MicroResp ermittelt wurden, zeigten weder einen konsistenten Trend zu Hemmung oder Stimulation im zeitlichen Verlauf des Tests noch zwischen den unterschiedlichen Aufbereitungsvarianten. Die Abbauraten der Substrate waren an den drei Untersuchungstagen auf einem ähnlichen Niveau. Die Substrate Leucin und Lysin wurden mit etwa $0,8 \mu\text{g CO}_2\text{-C / g / h}$ generell schwächer veratmet, Cellobiose und Glukose mit knapp unter $2 \mu\text{g CO}_2\text{-C / g / h}$ in allen Behandlungen an allen Untersuchungstagen stärker. Die Messdaten wiesen teilweise eine sehr große Standardabweichung auf. Nur der Abbau von Xylan an Tag 90 in der über 25 Tage gefaulten Behandlung war signifikant gegenüber der spezifischen Kontrolle gehemmt.

5.3.2. Langzeitversuch 2

Der zweite Langzeitversuch sollte die Daten der potentiellen Ammoniumoxidation des Langzeitversuch 1 validieren. Um die Toxizität von NM-300K besser abschätzen zu können, eventuelle Einflüsse der Klärschlammaufbereitung auf die Bioverfügbarkeit deutlicher zu sehen und die Konzentrationen für weitere Versuche zu wählen, wurde dem Versuch eine

Einlaufkonzentration von 0,4 mg Ag/L hinzugefügt und die Inkubationsdauer auf 196 Tage verlängert.

5.3.2.1. Bodengehalte

Der unbehandelte Boden für den Langzeitversuch 2 war mit einem Ag-Gehalt von 0,04 mg Ag/kg TM auf dem gleichen Niveau wie der Boden des Langzeitversuchs 1. Durch die Zugabe der aufbereiteten Klärschlämme erhöhten sich die Silbergehalte geringfügig um 0,01 bis 0,06 mg Ag/kg TM. Die Ag-Bodengehalte der mit 1,0 mg Ag/L behandelten Klärschlämme waren gegenüber denen des Langzeitversuchs 1 etwas erhöht. Die Werte lagen zwischen 4,7 mg Ag/kg TM in der Direktbehandlung und 9,1 mg Ag/kg TM in der 35 Tage gefaulten Behandlung. Die Ag-Gehalte der Ansätze der geringeren Einlaufkonzentration von 0,4 mg Ag/L weisen in etwa 40 % der Ag-Gehalte der Ansätze der höheren Einlaufkonzentration auf.

Tabelle 9: Langzeitversuch 2 - Ag-Bodengehalte

	Kontrolle	NM-300K 0,4 mg/L	NM-300K 1,0 mg/L
Behandlung	[mg Ag/kg TM]	[mg Ag/kg TM]	[mg Ag/kg TM]
Boden	0,04		
Direkt	0,08	2,53	4,73
Kalk	0,10	2,01	5,60
Pasteurisieren 1h	0,05	3,04	7,81
Pasteurisieren 3h	0,07	2,83	7,95
Faulung 25d	0,06	2,83	7,04
Faulung 35d	0,07	3,11	9,08

5.3.2.2. Potentielle Ammoniumoxidation

Die Nitritproduktion der potentiellen Ammoniumoxidation des Langzeitversuchs 2 ist in der Abbildung 8 abgebildet, die daraus resultierenden Hemmungen im Vergleich zu ihren spezifischen Kontrollen sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Nitritproduktion der Klärschlammkontrollen lag mit etwa 90 ng Nitrit-N/gTM*h auf einem etwas niedrigeren Niveau als die des ersten Langzeitversuchs. Die Nitritproduktion der Kalkbehandlung war etwa 50 % höher als die der anderen Behandlungen und lag bei 140 ng Nitrit-N/gTM*h. Nach 90 Tagen Inkubation stiegen die Aktivitäten der Kontrollen auf über 120 ng NO₂⁻-N/gTM*h und sanken dann auf etwa 40 - 60 ng NO₂⁻-N/gTM*h nach 196 Tagen Inkubation ab. Die Aktivität der AgNM-Behandlungen war nach 60 Tagen im Vergleich zu den Kontrollen geringfügig schwächer, die Ansätze der unterschiedlichen Klärschlammbehandlungen zeigten unterschiedliche Nitritproduktionsraten. Nach 90 Tagen blieben die Aktivitäten der AgNM-Behandlungen, abgesehen von den gefaulten Ansätzen, gegenüber ihren Kontrollen

zurück. Über die Inkubationsdauer von 196 Tagen wurde dieser Effekt deutlicher. Ab 140 Tagen Inkubation zeigte sich auch bei den gefaulten Ansätzen eine reduzierte Aktivität.

Die resultierenden Hemmungen waren nach 60 Tagen sehr unterschiedlich, die Direktbehandlungen waren mit etwa 10 % schwach gehemmt, die Kalkbehandlungen wiesen mit etwa 20 und 38 % eine Konzentrationsabhängigkeit auf. Der niedrigere Ansatz der 3 Stunden pasteurisierten Behandlung war mit über 60 % gehemmt. Nach 140 Tagen Inkubation wurden die Hemmungen aller Behandlungen, außer die der gefaulten Ansätze, ausgeprägter und wiesen, abgesehen von der 3 Stunden pasteurisierten Behandlung, eine Konzentrationsabhängigkeit auf. Nach 196 Tagen Inkubation stellten sich ausgeprägte Hemmungen von etwa 80 % bei den hohen Beaufschlagungen der beiden pasteurisierten und dem direkt applizierten Ansatz sowie Konzentrationsabhängigkeit ein. Die Hemmungen der Kalkansätze sind auf etwa 10 % zurückgegangen. Die gefaulten Behandlungen zeigten sich erst ab einer Inkubationsdauer von 140 Tagen schwach gehemmt. Nach 196 Tagen stiegen die Hemmungen in den hohen Beaufschlagungen auch auf etwa 80 %, wie in den Ansätzen der anderen Behandlungen.

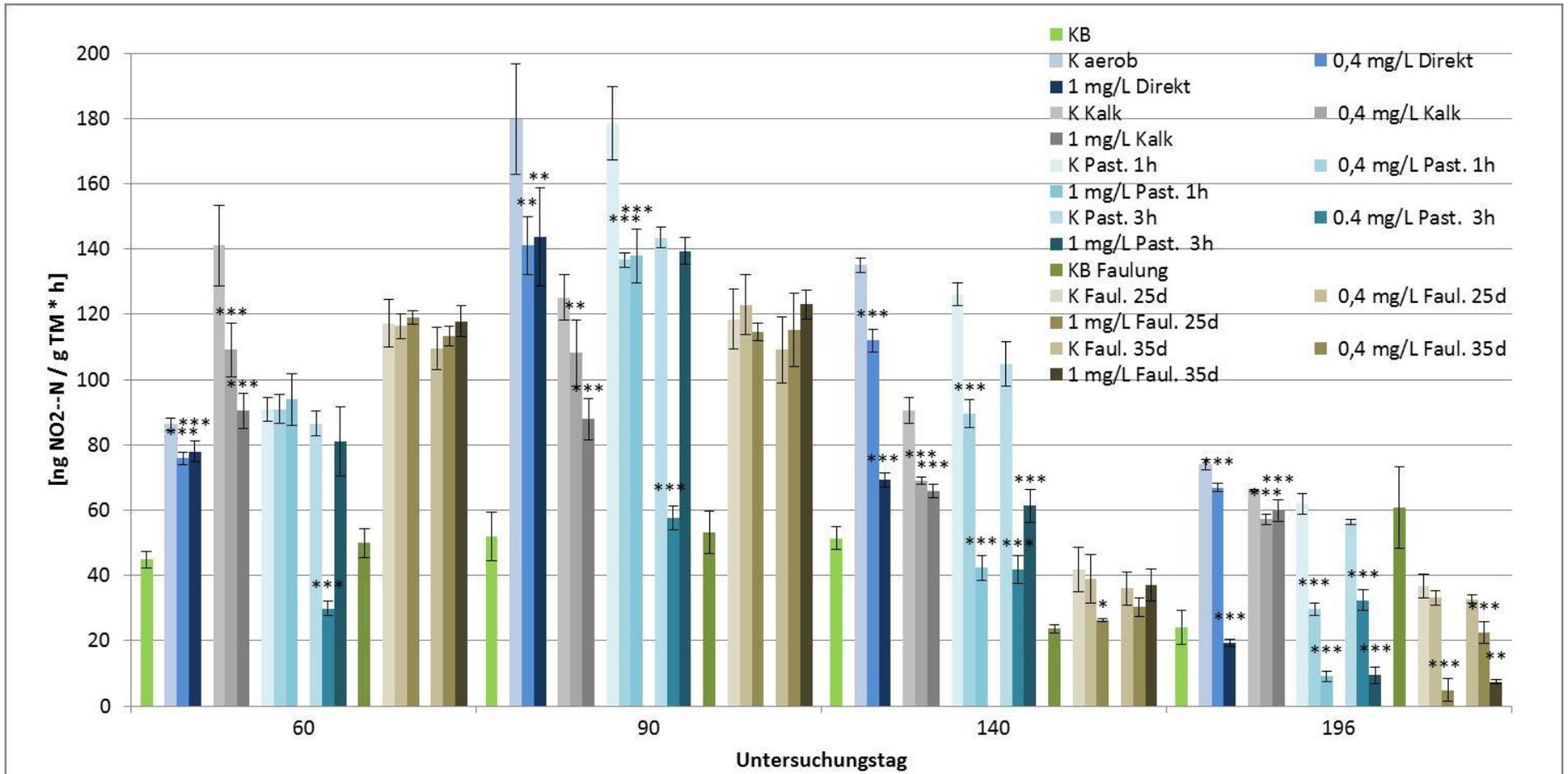


Abbildung 8: Langzeitversuch 2 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)

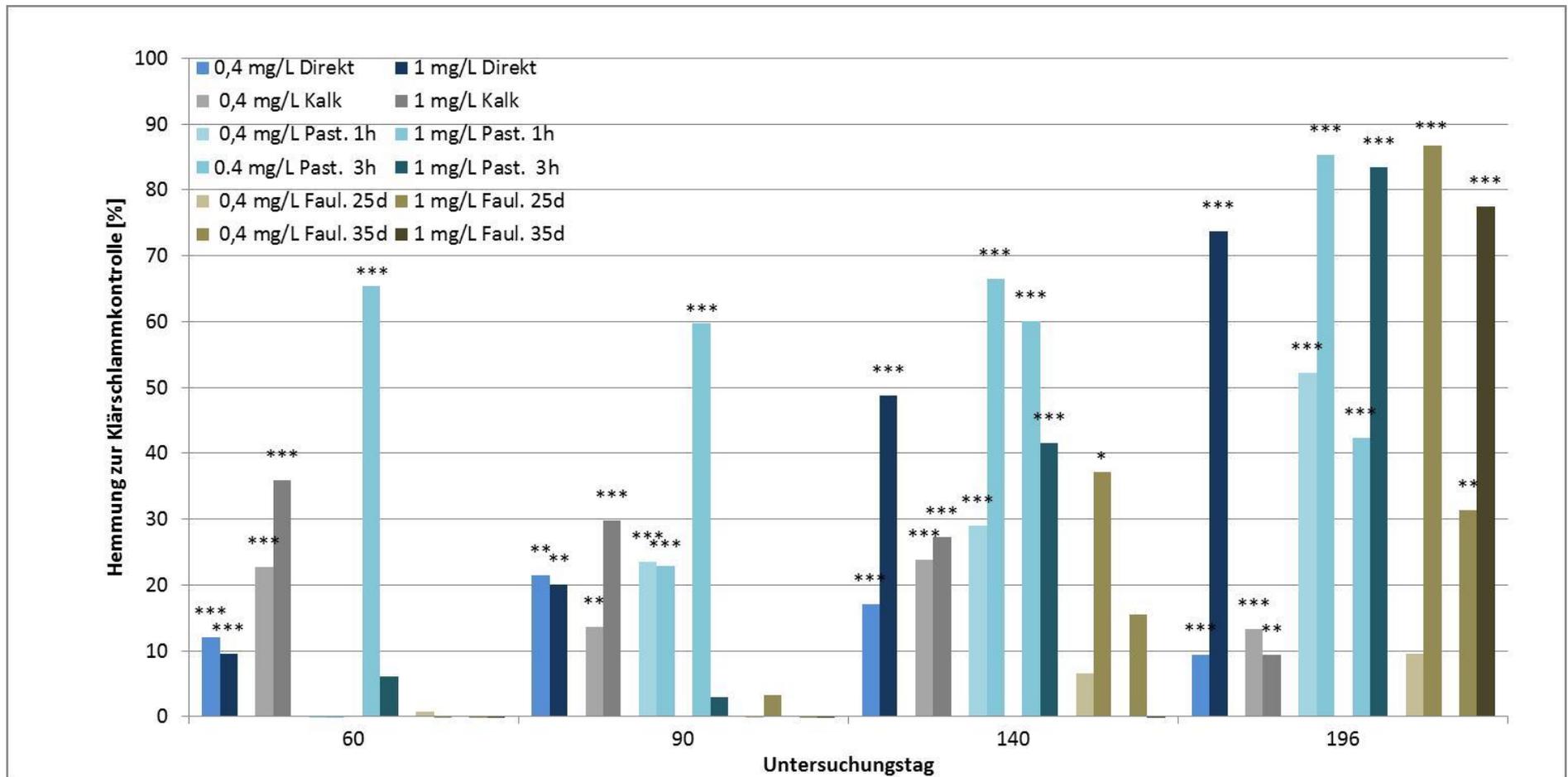


Abbildung 9: Langzeitversuch 2 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle nach unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$))

5.4. Einfluss der verfügbaren Schwefelkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM

Da sich bei allen Klärschlammaufbereitungsvarianten der Langzeitversuche 1 und 2 ausgeprägte Effekte einstellten, wurden weitere Langzeitversuche angesetzt, die der Fragestellung dienen, ob das sulfatarme synthetische Abwasser zu wenig Schwefel bereitstellt, um die AgNM vollständig zu sulfidieren. Darüber hinaus wurde die Anwesenheit von SRB untersucht, welche essentiell für die Sulfidierung von AgNM sind. Deshalb wurden Batchversuche mit einer ökotoxikologisch wirksamen Konzentration AgNM und vier unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen sowie den Kontrollen mit den entsprechenden Sulfatkonzentrationen angesetzt. Nach der Applikation wurden die Klärschlämme aufgeteilt, die eine Hälfte wurde als aerobe Direktbehandlung unmittelbar in die Böden eingearbeitet, die zweite Hälfte wurde vor der Applikation in die Böden für 35 Tage gefault. Diese Versuchsanordnung wurde zweimal durchgeführt.

Nach den zwei Sulfatversuchen, bei denen eine Batchapplikation durchgeführt wurde, wurde auf diesen Versuchen basierend eine Sulfatkonzentration für den Kläranlageneinlauf festgelegt. Mit diesem angepassten synthetischen Abwasser wurde, neben der regulären Rezeptur, eine Kläranlagensimulation durchgeführt, um die umweltrelevanten Prozesse der Kläranlage zu berücksichtigen.

5.4.1. Batchversuche

Die zwei Sulfatversuche mit Batchapplikation sollten die Frage beantworten, ob die Menge Sulfat für die vollständige Sulfidierung der AgNM ausreicht. Darüber hinaus sollte die Anwesenheit von SRB untersucht werden.

5.4.1.1. Schwefelreduzierende Bakterien

Nach der Applikation wurde exemplarisch in den Faulschlämmen der niedrigsten und höchsten Sulfatstufe sowohl in den Kontrollen als auch den NM-300K Behandlungen die Anwesenheit von vier speziellen, sehr verbreiteten SRB-Arten mit Hilfe einer nestedPCR untersucht. Die Intensität der PCR-Banden für die vier Spezies ist in den Anhängen 17 - 20 dargestellt. Dabei zeigte sich in allen Ansätzen gleichermaßen die Anwesenheit der drei SRB-Arten *Desulfotomaculum nigrificans*, *Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris* und *Desulfococcus multivans*. Die vierte untersuchte Art, *Desulfobulbus elongatus*, wurde in der höchsten Sulfatstufe der Kontrolle nicht nachgewiesen.

5.4.1.2. Bodengehalte

Die Ag-Bodengehalte der zwei Langzeitversuche nach Batchapplikation mit unterschiedlichen Sulfatstufen sind aus der Tabelle 10 zu entnehmen. Die Ansätze mit direkt

appliziertem Kontrollschlamm wiesen Ag-Bodengehalte von 0,4 mg Ag/kg TM im ersten und bei 0,5 mg Ag/kg TM im zweiten Versuch auf. Die Ag-Bodengehalte der Ansätze mit gefaultem Kontrollschlamm waren circa doppelt so hoch. Die Ag-Gehalte der beaufschlagten Ansätze des ersten Versuchs lagen im Mittel bei $3,2 \pm 0,6$ mg Ag/kg TM in den Ansätzen mit direkt appliziertem Schlamm und bei $6,1 \pm 2,0$ mg Ag/kg TM in den Ansätzen mit Faulschlamm. Die Ag-Gehalte im zweiten Versuch waren mit $2,2 \pm 0,5$ mg Ag/kg TM und $4,7 \pm 0,8$ mg Ag/kg TM geringfügig niedriger. Die einzelnen Sulfatstufen der beaufschlagten Ansätze wiesen zum Teil sehr unterschiedliche Ag-Gehalte auf.

Tabelle 10: Langzeitversuch 3 und 4 - Ag-Bodengehalte der unterschiedlichen Sulfatstufen nach Direktapplikation und Klärschlammfäulung.

Behandlung	Langzeitversuch 3			Langzeitversuch 4		
	[mg Ag /kg]	MW	SD	[mg Ag /kg]	MW	SD
0 SO4 Kontrolle Direkt	0,4			0,5		
0 SO4 NM-300K Direkt	3,2	3,2	0,6	2,7	2,2	0,5
100 SO4 NM-300K Direkt	3,8			1,8		
200 SO4 NM-300K Direkt	2,2			1,7		
500 SO4 NM-300K Direkt	3,5			2,7		
Kontrolle Faulung 35d	1,0			0,8		
0 SO4 NM-300K Faulung 35d	4,4	6,1	2,0	4,2	4,7	0,8
100 SO4 NM-300K Faulung 35d	9,3			3,7		
200 SO4 NM-300K Faulung 35d	6,5			5,1		
500 SO4 NM-300K Faulung 35d	4,2			5,8		

5.4.1.3. Potentielle Ammoniumoxidation

Die Nitritproduktion der potentiellen Ammoniumoxidation der aeroben Behandlung des Langzeitversuchs 3 ist in der Abbildung 10 dargestellt, die berechneten Hemmungen gegenüber den spezifischen Kontrollen sind in Abbildung 11 enthalten. Die Messwerte der direkt applizierten Kontrollen schwankten an den Tagen 30 und 60 minimal untereinander, ohne dabei eine Konzentrationsabhängigkeit der Sulfatstufe erkennen zu lassen. Die Nitritproduktionsrate der Kontrollen stieg von etwa 60 ng NO₂⁻-N/gTM*h an Tag 30 auf etwa 80 ng NO₂⁻-N/gTM*h an und behielt diese Aktivität bis zum Testende nach 140 Tagen. Die Aktivität aller AgNM-Behandlungen lag nach 30 Tagen Inkubation gleichermaßen leicht unter dem Niveau der Kontrollen (<60 ng NO₂⁻-N/gTM*h) und sank kontinuierlich auf unter 10 ng NO₂⁻-N/gTM*h an Tag 140. Die AgNM-Behandlungen waren an Tag 30 zunächst nur geringfügig gegenüber ihren Kontrollen gehemmt, die Behandlungen mit 100 und 200 mg/L Sulfat jedoch statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. Ab Tag 60 wurden die Hemmungen ausgeprägter und nahmen von über 40 % auf über 90 % an Tag 140 zu. Dabei zeigte sich weder ein Einfluss des zugesetzten Sulfats noch ein Einfluss der unterschiedlichen Ag-Gehalte. Die Bodenkontrolle wies über den Testzeitraum von 140 Tagen eine gleichbleibende Aktivität von etwa 60 bis 70 ng NO₂⁻ / g / h auf und zeigte sich damit etwas weniger aktiv als die mit Kontrollklärschlamm beaufschlagten Böden.

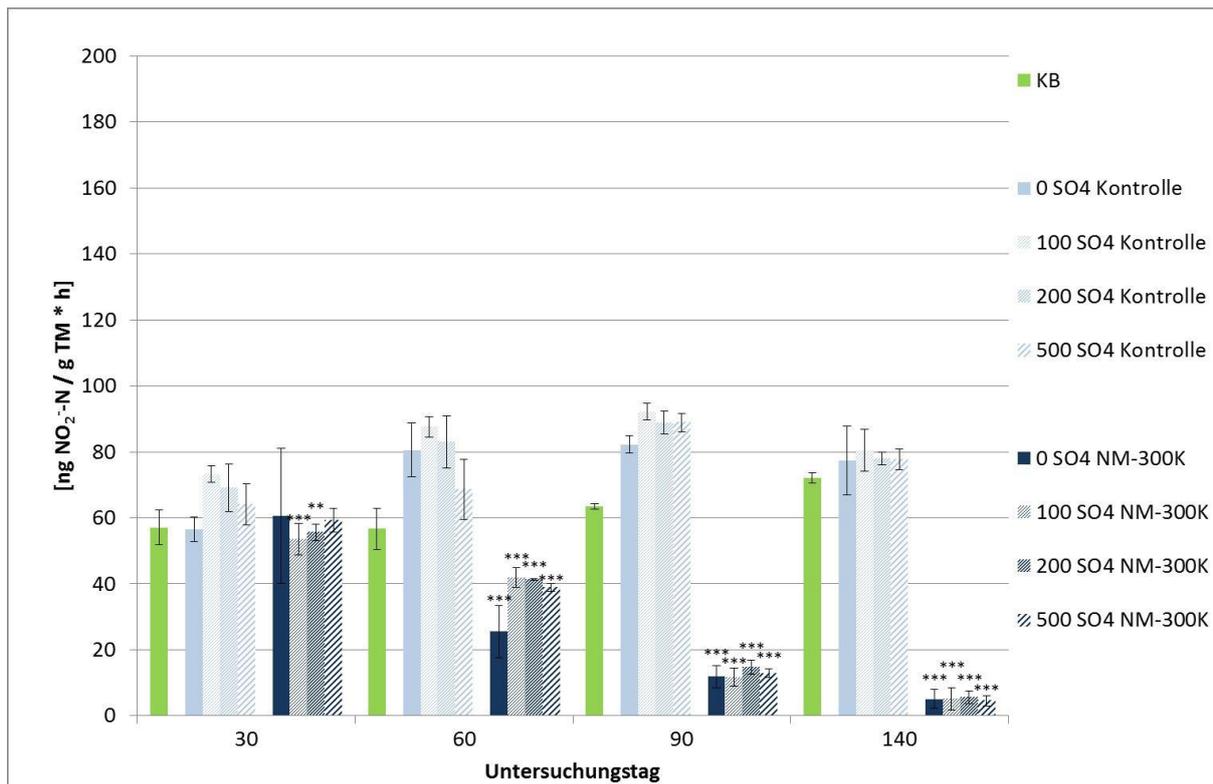


Abbildung 10: Langzeitversuch 3 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Direktapplikation. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), Fehlerbalken = \pm Standardabweichung)

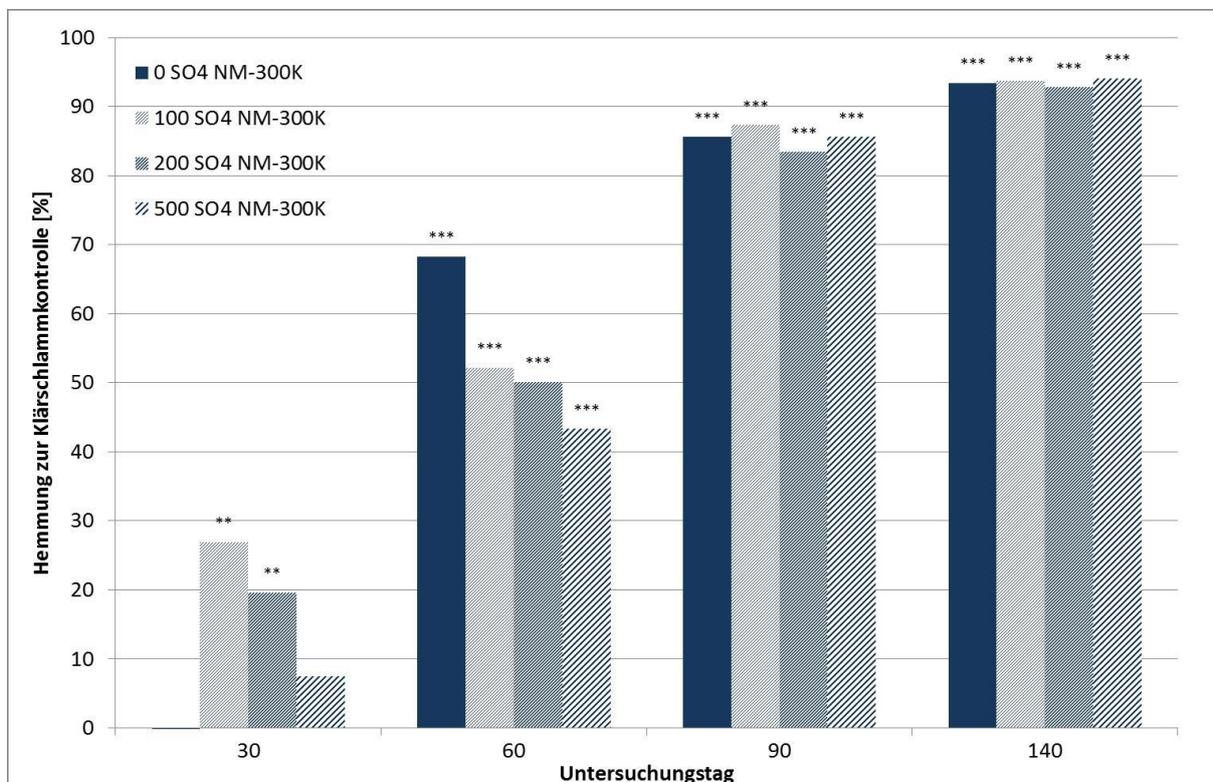


Abbildung 11: Langzeitversuch 3 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Direktapplikation. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$))

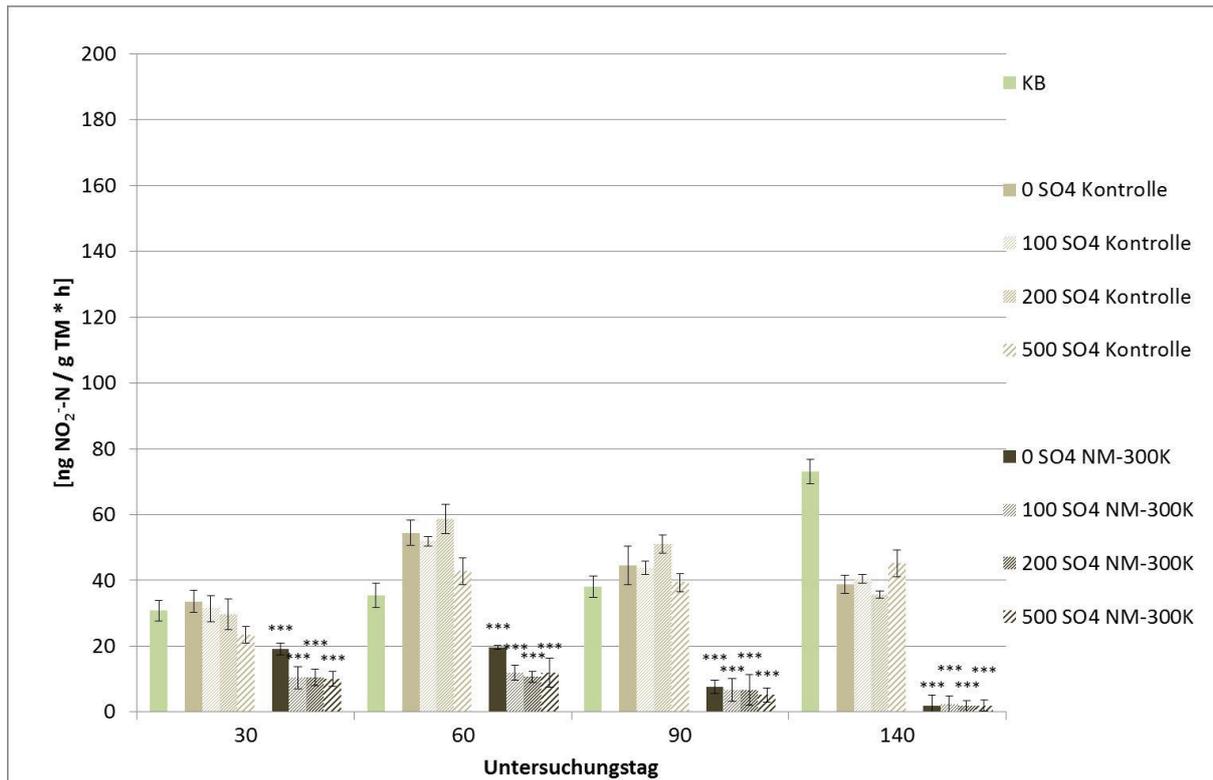


Abbildung 12: Langzeitversuch 3 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Klärschlammfäulung. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)

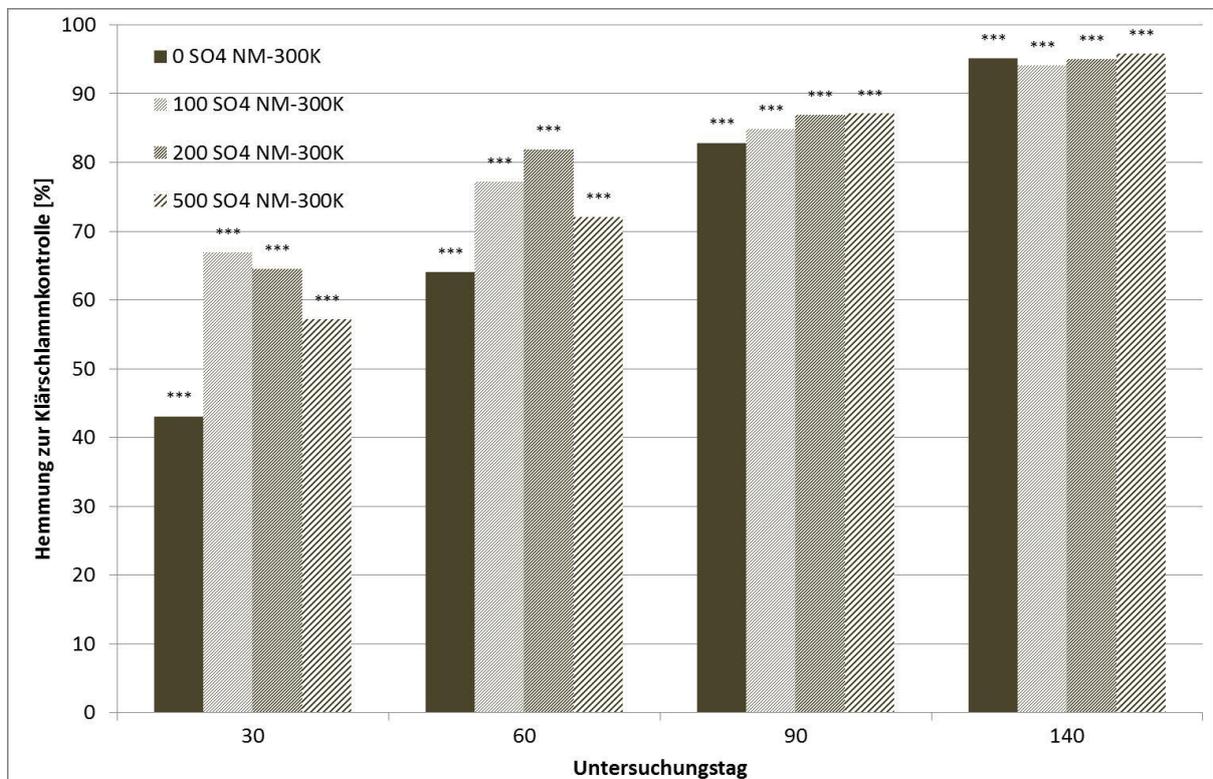


Abbildung 13: Langzeitversuch 3 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Klärschlammfäulung. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001))

Die Aktivität der ammoniumoxidierenden Bakterien der gefaulten Behandlungen ist der Abbildung 12 zu entnehmen, die daraus berechneten Hemmungen finden sich in der Abbildung 13. Sowohl der reine Boden als auch die Kontrollen waren über die gesamte Versuchsdauer mit Werten um etwa $40 \text{ ng NO}_2^- \text{-N/gTM}^* \text{h}$ inaktiver als die Ansätze der direkt applizierten Behandlungen (50 bis $80 \text{ ng NO}_2^- \text{-N/gTM}^* \text{h}$). Der Vergleich der Kontrollen untereinander zeigte ebenfalls keinen Einfluss des Sulfats. Die Hemmungen der AgNM-Behandlungen fielen bei den Ansätzen mit Faulschlämmen ab Tag 30 mit statistisch signifikanten Hemmungen von 40 bis 60% ausgeprägter als in den Behandlungen mit direkt appliziertem Schlamm aus. Nach 140 Tagen waren die gefaulten AgNM-Behandlungen, wie die direkt applizierten Ansätze, mit über 90% fast vollständig gehemmt. Die unterschiedlichen Sulfatmengen zeigten auch hier keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der AgNM.

Die Daten der Nitritproduktion der Direktapplikation des Langzeitversuchs 4 sind in Anhang 21, die daraus resultierenden Hemmungen sind in Anhang 22 abgebildet. Die Aktivitätsdaten der Faulschlammapplikation sind dem Anhang 23 zu entnehmen, die entsprechenden Hemmungen sind in Anhang 24 dargestellt.

Die Daten der Nitrifikation in der direkt applizierten Behandlung des Langzeitversuchs 4 zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Daten des Langzeitversuchs 3. Die Nitrifikationsraten der vier Sulfatstufen lagen sowohl bei den Kontrollen als auch bei den AgNM-Behandlungen an den einzelnen Untersuchungstagen auf einem ähnlichen Niveau. Die Kontrollen zeigten an Tag 30 eine Nitrifikationsrate von etwa $100 \text{ ng NO}_2^- / \text{g} / \text{h}$, die auf etwa 130 an Tag 60 anstieg und danach auf etwa $40 \text{ ng NO}_2^- / \text{g} / \text{h}$ über die Inkubationsdauer von 140 Tagen abfiel. Die Mikroorganismen der AgNM-Behandlungen nitrifizierten bereits ab Tag 30 mit etwa $80 \text{ ng NO}_2^- / \text{g} / \text{h}$ etwas schwächer als die Kontrollen. Die Nitritproduktion fiel über 140 Tage kontinuierlich ab, bis zu einer vollständig gehemmten Nitrifikation nach 140 Tagen. Die daraus resultierenden Hemmungen waren durchgehend statistisch signifikant und stiegen von etwa 20% auf 100% .

Die Ansätze mit Faulschlamm zeigten die gleiche Tendenz bei etwa 50% der Aktivität der direkt applizierten Ansätze. Die Nitrifikationsraten der Kontrollen in den hohen Sulfatstufen 200 und 500 betragen etwa $40 \text{ ng NO}_2^- / \text{g} / \text{h}$ und fielen über den Untersuchungszeitraum minimal ab. Die Kontrollen in den beiden niedrigen Sulfatstufen 0 und 100 sowie der unbehandelte Boden zeigten an den ersten 90 Tagen eine deutlich stärkere Nitrifikation von etwa $100 \text{ ng NO}_2^- / \text{g} / \text{h}$, die sich an Tag 140 den höheren Sulfatstufen angleichen. Die Aktivität der AgNM-Behandlungen sank über die Inkubationsdauer von 140 Tagen von $40 \text{ ng NO}_2^- / \text{g} / \text{h}$ auf unter $10 \text{ ng NO}_2^- / \text{g} / \text{h}$. Der Vergleich der Kontrollen mit den AgNM-Behandlungen zeigte Hemmungen, die von Testbeginn an anstiegen und in signifikanten

Hemmungen von 60 bis 80 % nach 140 Tagen resultierten. Die beiden niedrigen Ag-Sulfatansätze waren von Testbeginn an über 60 % gehemmt, bei den höheren Ag-Sulfatansätze begann die Hemmung ab Tag 60 und nahm dann kontinuierlich zu.

5.4.2. Kläranlagensimulation

Da die zwei Sulfatversuche mit der Batchapplikation starke Effekte hervorriefen, wurde der Versuch mit einer ökotoxikologisch wirksamen Einlaufkonzentration NM-300K (1 mg Ag/L) als Kläranlagensimulation wiederholt, da diese die Transformationsprozesse realitätsnäher simuliert. Vor allem der Wechsel zwischen oxidischen und anoxischen bzw. anaeroben Verhältnissen ist für die Oxidation des Silbers und die anschließende Sulfidierung der AgNM grundlegend. Für die Kläranlagensimulation wurde zusätzlich zu dem regulären synthetischen Abwasser ein um 200 mg SO₄²⁻-S pro Liter aufgestockter Ansatz verwendet.

5.4.2.1. Ag-Bodengehalte

Die Ag-Gehalte in Böden sind in der Tabelle 11 aufgeführt. Der reine Boden hatte, wie in den anderen Versuchen, einen Ag-Gehalt von 0,05 mg Ag/kg TM. Die mit Kontrollschlämmen behandelten Böden wiesen einen Ag-Gehalt zwischen 0,06 und 0,12 mg Ag/kg TM unabhängig von der Sulfatzugabe auf. Die Ag-Gehalte der mit AgNM beaufschlagten Böden lagen zwischen 4,7 mg Ag/kg TM und 5,2 mg Ag/kg TM in der direkt applizierten Behandlung und zwischen 5,6 mg Ag/kg TM und 6,4 mg Ag/kg TM in der gekalkten Behandlung. Die Werte der gefaulten Behandlungen waren etwa doppelt so hoch und lagen zwischen 7,7 mg Ag/kg TM und 8,9 mg Ag/kg TM.

Tabelle 11: Langzeitversuch 5 - Ag-Bodengehalte

Behandlung	Kontrolle [mg Ag/kg TM]		Kontrolle+S [mg Ag/kg TM]		NM-300K 1 mg/L [mg Ag/kg TM]		NM-300K 1 mg/L +S [mg Ag/kg TM]	
	MW	MW _{abw}	MW	MW _{abw}	MW	MW _{abw}	MW	MW _{abw}
Boden	0,05	0,00						
Direkt	0,11	0,01	0,06	0,00	4,80	0,10	5,13	0,08
Kalk	0,05		0,23	n.b.	5,29	0,23	6,24	0,14
Boden Ansatz Faulung	0,05							
Faulung 35d	0,08	0,02	0,12	n.b.	8,34	0,58	7,93	0,25

MW aus n = 2; MW_{abw} = Abweichung vom Mittelwert

5.4.2.2. Schwefelreduzierende Bakterien

Das Vorkommen von SRB wurde zu Beginn und gegen Ende der Kläranlagensimulation sowie nach Beendigung der Klärschlammfäulung durch DGGE bestimmt. Zu allen Untersuchungszeitpunkten wurde die DNA von SRB detektiert. Die strukturelle Diversität der SRB veränderte sich über 10 Tage in der Kläranlage und den anschließenden 35 Tagen Klärschlammfäulung. Von den ursprünglich vorhandenen DNA-Banden (1, 2, 3) verschwanden die obersten zwei Banden. Nur die unterste DNA-Bande (3) war zu allen Untersuchungszeitpunkten (7, 11, 16, 20) vorhanden. Diese Bande wurde extrahiert und mittels Sequenzierung als *Desulfovibrio sp.* identifiziert. Aufgrund der Probenqualität konnten die weiteren DNA-Banden nicht bestimmt werden. Zwischen den vier unterschiedlichen Behandlungen (mit vs. ohne Sulfatzugabe und Kontrolle vs. AgNM-Zugabe) zeigten sich nach der Kläranlagensimulation und nach der Klärschlammfäulung Unterschiede in der strukturellen Diversität.

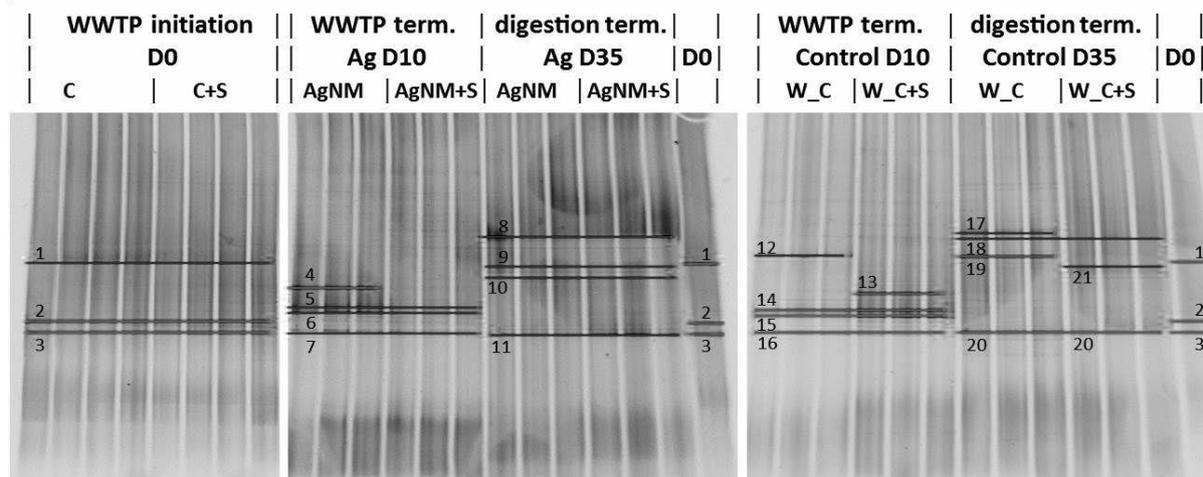


Abbildung 14: DGGE-Muster der SRB in Klärschlamm zum Start der Kläranlagensimulation (WWTP initiation D0), nach Abschluss der Kläranlagensimulation (WWTP term. D10) und nach der Klärschlammfäulung (digestion term. D35) für die Kontrolle ohne (C) und mit (C+S) Sulfataufstockung sowie die AgNM-Behandlungen ohne (AgNM) und mit (AgNM+S) Sulfataufstockung .

Zu Testbeginn der Kläranlagensimulation wurden drei SRB-Gruppen mittels DNA-Banden detektiert (1, 2, 3). Nach 10 Tagen waren die obersten zwei Banden (1, 2) nicht mehr detektierbar. Zwei neue Banden mit der gleichen Laufstrecke auf dem Gel traten stattdessen in allen Behandlungen auf (5+14, 6+15). Darüber hinaus ist in der AgNM-Behandlung ohne Sulfatzugabe und der Kontrolle mit Sulfatzugabe an der gleichen Stelle eine Bande aufgetreten, die die Abundanz einer neuen SRB-Gruppe zeigt (4+13), sowie eine DNA-Bande in der Kontrolle ohne Sulfatzugabe (12).

Die Klärschlammfäulung änderte die Diversität der SRB fast komplett, nur eine SRB-Gruppe war noch immer vorhanden (Banden 3, 7, 11, 16, 20). Die DNA-Banden, die am Ende der

Kläranlagensimulation auftraten, waren nicht mehr detektierbar, was bedeutet, dass die Gruppen nicht mehr vorhanden waren. Neue SRB-Gruppen nahmen in ihrer Abundanz zu. In dem Kontrollschlamm ohne Sulfatzugabe traten drei neue Banden auf (17, 18, 19), in dem Kontrollschlamm mit Sulfatzugabe zwei (18, 21). Die DNA-Banden einer Gruppe waren dabei an der identischen Position (18; 18). In beiden AgNM-Behandlungen erschienen drei identische DNA-Banden (8, 9, 10). Die oberste Bande (8) ist identisch mit der obersten der Kontrolle (17), die zweite (9) mit der zweiten Bande der mit Sulfat aufgestockten Kontrolle (21). Die anderen DNA-Banden lagen an individuellen Positionen und waren mit keinen weiteren DNA-Banden identisch.

5.4.2.3. Charakterisierung der AgNM

Das reine NM-300K als Ausgangsmaterial für die Kläranlagenversuche und den Langzeitversuch 5 wurde mit dynamic light scattering (DLS) und elektronenmikroskopisch untersucht. Es hatte einen hydrodynamischen Durchmesser von 62 ± 47 nm (häufigkeitsgewichtet) bei einem poly dispersity index (Pdl) von 0,511. Die mit Hilfe der Bildauswertungssoftware Fiji analysierten TEM-Aufnahmen ergaben einen mittleren Partikeldurchmesser von $14,3\pm 2,8$ nm ($n=218$) (Abbildung 15). Die particle size distribution (PSD) zeigte überwiegend Partikel mit einem Durchmesser zwischen 10,5 und 19,5 nm. Darüber hinaus wurden gelegentlich auch kleinere Partikel detektiert.

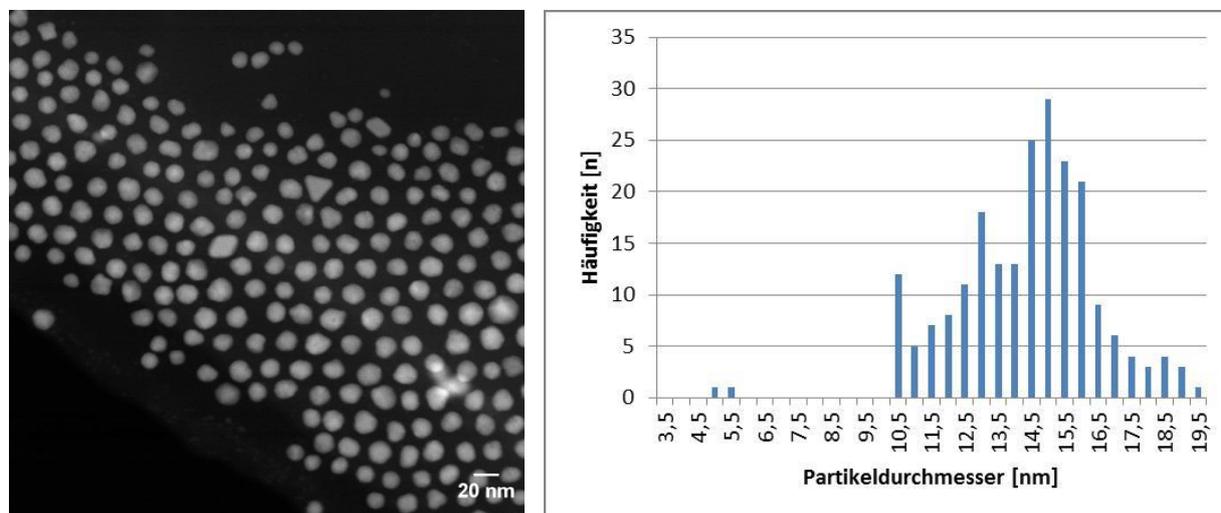


Abbildung 15: Partikelgrößenverteilung (PSD, particle size distribution) des reinen NM-300K (Mittlerer Durchmesser; $14,3\pm 2,8$ nm, $n=218$).

Die STEM-Aufnahmen der AgNM in den Klärschlämmen nach Behandlung mit ihrer jeweiligen Abwasserrezeptur (mit vs. ohne Sulfatzugabe) und Klärschlammaufbereitung (Direktapplikation vs. Klärschlammkalkung vs. Klärschlammfäulung vs. Kalkung) zeigten keinen Einfluss auf die inkorporierten AgNM. Die Partikel waren gleichmäßig und einzeln im Schlamm verteilt, es waren weder größere agglomerierte noch aggregierte Partikelmengen zu erkennen (Abbildung 16A). Die Partikelform war sphärisch und die Partikelgrößen lagen

überwiegend zwischen 15 und 20 nm (Abbildung 17A), auch kleinere Partikel waren zu finden. Damit waren die Form und Größe der Partikel im Klärschlamm denen des Ausgangsmaterials ähnlich.

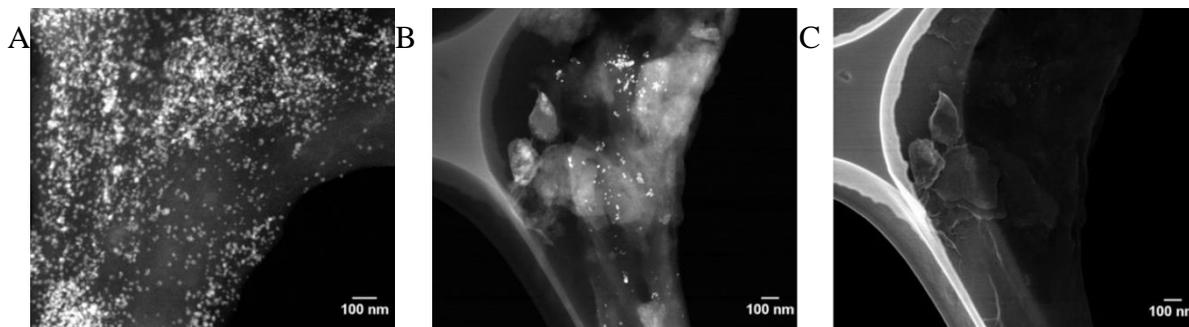


Abbildung 16: Verteilung der AgNM in A) Klärschlamm und B) Bodenklärschlammgemischen; C) SEM Bild zeigt die Einbindung der AgNM in die organische Bodensubstanz.

Die EDX-Spektren ausgewählter Partikel zeigten immer ein starkes Schwefel-Signal, meistens mit einem Ag:S-Intensitätsverhältnis von 2:1 (Abbildung 17C) was auf die vollständige Sulfidierung der Partikel zu Ag_2S schließen lässt.

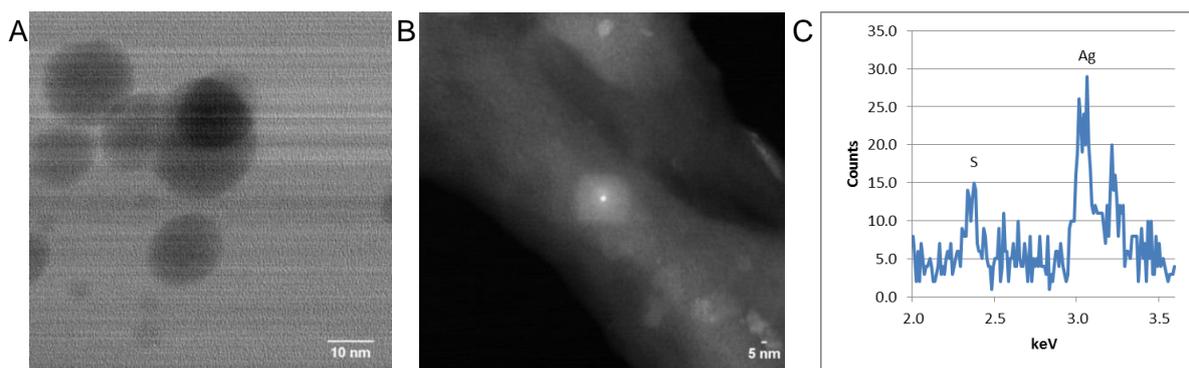


Abbildung 17: AgNM mit einem Durchmesser von 15 – 20 nm in einer Klärschlammprobe und; B) AgNM mit einem Durchmesser von 3 nm in einem Bodenklärschlammgemisch; C) EDX-Spektrum weist auf die vollständige Sulfidierung des Partikels in Abbildung 17 B hin.

Nach der Langzeitinkubation wurden die AgNM erneut in den Bodenklärschlammgemischen untersucht. Die beobachteten Partikel wiesen nach der Inkubation eine weiter gestufte Größenverteilung auf, so wurden viele kleine Partikel (<5 nm) gefunden, aber auch deutlich größere mit einem Durchmesser von etwa 50 nm (Abbildung 18). Die EDX-Spektren zeigten ebenfalls ein Ag:S-Intensitätsverhältnis von 2:1, was auf Ag_2S schließen lässt (Spektren nicht abgebildet). Bei der Untersuchung der Bodenklärschlammgemische konnte gelegentlich beobachtet werden, wie sich die Morphologie der größeren Ag_2S -Partikel unter dem Elektronen-Strahl veränderte. Dies deutet auf instabile, schwach kristalline, vermutlich amorphe, Ag_2S -Verbindungen hin. Neben den Ag_2S -Partikeln wurden sehr wenige AgCl -Partikel und teilsulfidierte Partikel mit metallischen Ag^0 -Bereichen und Ag_2S -Bereichen (Abbildung 19) gefunden.

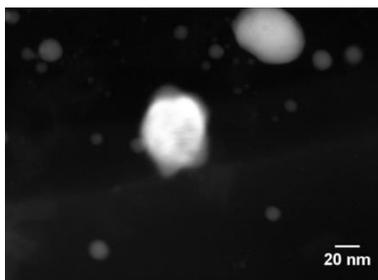


Abbildung 18: Sulfidierter Ag-Partikel mit einem Durchmesser von 55 nm.

Der Vergleich der secondary electron (SE) Aufnahmen, die die Oberfläche der Probe abbilden, und den HAADF Aufnahmen, die den Massen- / Stärken- Kontrast abbilden, lässt darauf schließen, dass die Partikel überwiegend in die organische Bodensubstanz inkorporiert waren und nicht an der organischen Bodensubstanz oder Tonmineralen anhafteten (Abbildung 16B,C / Abbildung 20A,B).

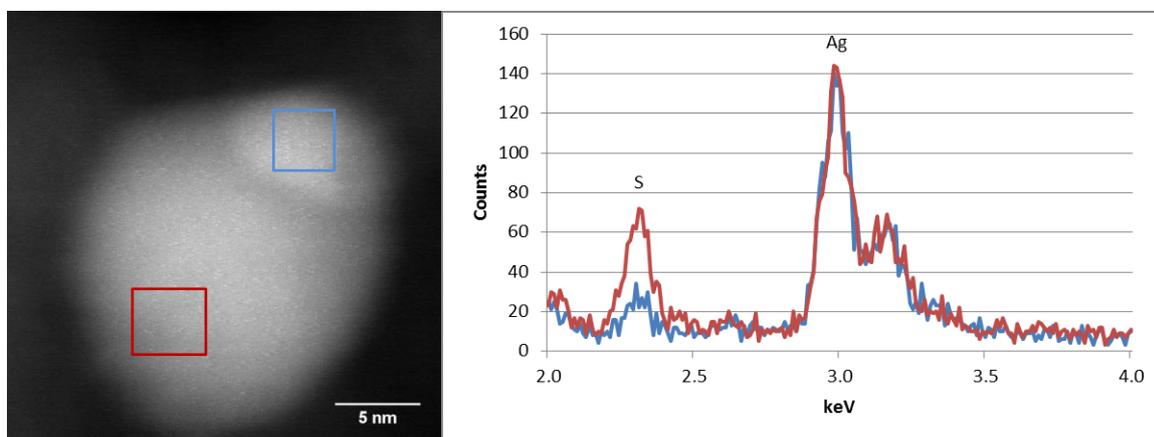


Abbildung 19: $\text{Ag}_2\text{S-Ag}$ Partikel in einem Bodenklärschlammgemisch. Die EDX-Spektren deuten mit einem 2:1 (Ag:S) Intensitätsverhältnis auf Ag_2S (rotes Kästchen und roter Graph) und auf überwiegend Ag^0 mit reduziertem S-Gehalt (blaues Kästchen und blauer Graph) hin.

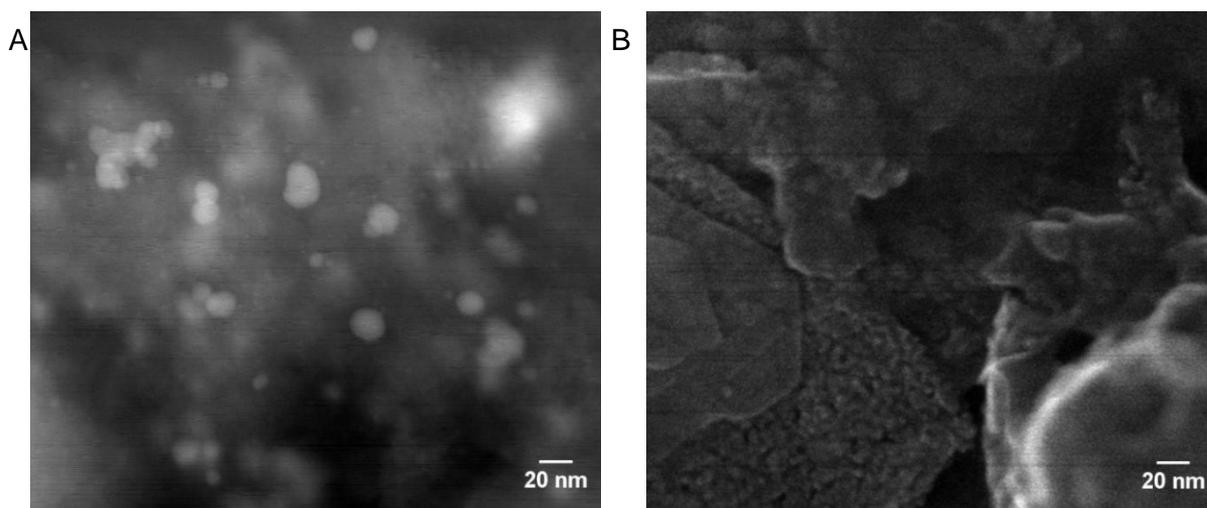


Abbildung 20: TEM-Aufnahme (A) von organischer Bodensubstanz mit eingeschlossenem AgNM. Die organische Bodensubstanz ist an Tonminerale angelagert (SEM Aufnahme/ B).

5.4.2.4. Potentielle Ammoniumoxidation

Die Daten der potentiellen Ammoniumoxidation des Langzeitversuchs 5 sind in der Abbildung 21 dargestellt, die entsprechenden Hemmungen gegenüber der Kontrolle finden sich in Abbildung 22.

Die Aktivität der einzelnen Behandlungen zeigte generell, unabhängig von der Aufbereitungsvariante, keine Unterschiede in Bezug auf die zusätzliche Sulfatzugabe. Die aerob behandelten Kontrollen lagen über 140 Tage gleichbleibend zwischen 100 und 110 ng NO₂⁻/g/h. Die mit NM-300K beaufschlagten Behandlungen nahmen von 100 auf circa 50 ng NO₂⁻/g/h ab, was in Hemmungen von etwa 50 % resultierte.

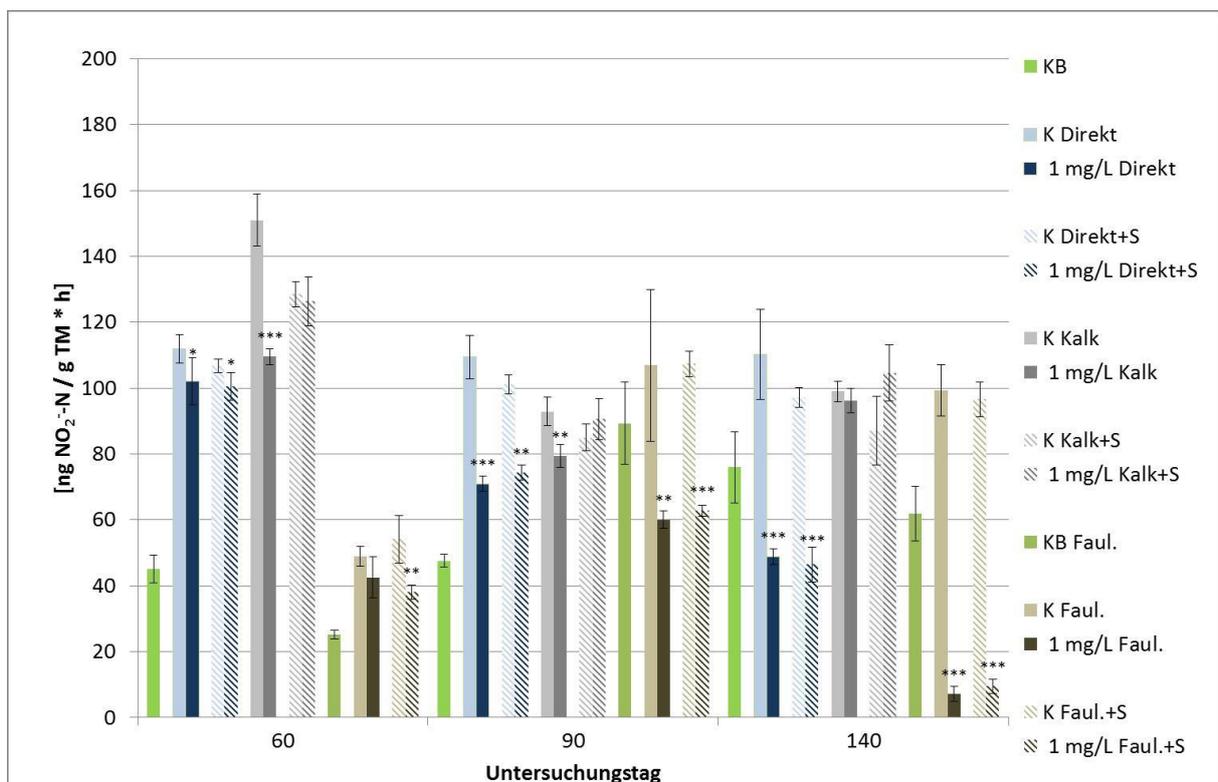


Abbildung 21: Langzeitversuch 5 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K, zwei Sulfatzugaben und unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; *p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)**

Die gefaulten Behandlungen, verglichen mit der aeroben Behandlung, waren an Tag 60 inaktiver, mit etwa 40 ng NO₂⁻/g/h. Diese geringere Aktivität zeigte sich ebenfalls bei der Bodenkontrolle der gefaulten Behandlungen. Die Klärschlammkontrollen mit Faulschlamm steigerten ihre Aktivität auf etwa 100 ng NO₂⁻/g/h an den Tagen 90 und 140. Die gefaulten AgNM-Behandlungen steigerten ihre Aktivität von 40 ng NO₂⁻/g/h nach 60 Tagen auf 60 ng NO₂⁻/g/h an Untersuchungstag 90 und sanken danach auf 10 ng NO₂⁻/g/h an Tag 140 ab. Die berechneten Hemmungen gegenüber der Kontrolle stiegen kontinuierlich von unter 10 % auf bis zu 90 % an Tag 140 an.

Die Kalkbehandlungen zeigten andere Aktivitäten als die Behandlungen mit direkt appliziertem und gefaultem Schlamm. Die Aktivitäten aller Behandlungen waren untereinander in etwa gleich und lagen mit circa 100 ng NO₂⁻ / g / h auf Höhe der aeroben Kontrollen. Die Kalkbehandlung ohne Sulfat war an den Tagen 60 und 90 noch gehemmt. An Tag 140 war dieser Effekt nicht mehr vorhanden.

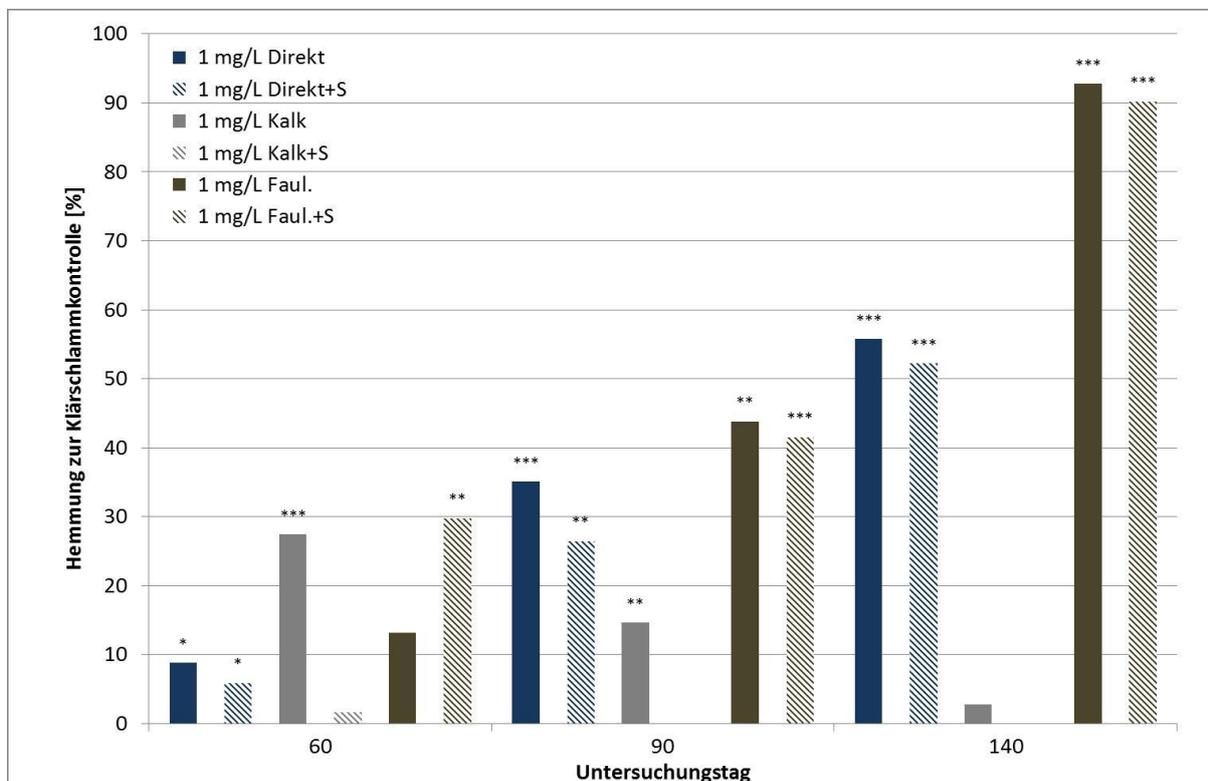


Abbildung 22: Langzeitversuch 5 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von zwei Sulfatzugaben und unterschiedlichen Klärschlammaufbereitungsmethoden. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001))

5.5. Einfluss der Ag - Einlaufkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM

Obwohl ausreichend reduzierbarer Schwefel und SRB für die Sulfidierung der AgNM vorhanden waren und Ag_2S detektiert wurde, wurden dennoch die Nitrifikanten in den Böden gehemmt. Um eine Hemmung der SRB durch die hohen Ag-Einlaufkonzentrationen und dadurch unvollständige Sulfidierung zu amorphen Strukturen auszuschließen, wurde ein Testansatz mit reduzierten Einlaufkonzentrationen in der Kläranlage gewählt. Die Langzeitversuche 6 und 7 erhielten ihre Ag-Gehalte über unterschiedliche Herangehensweisen, (I) mit dem konventionellen Ansatz mit 1,67 g Klärschlamm-trockensubstanz / kg TM und (II) Ansätzen mit zehnfacher Klärschlammmenge (16,7 g TS). Bei den Ansätzen mit erhöhter Klärschlammmenge fand eine Variante (IIa) mit einem Zehntel der Einlaufkonzentration bei der Kläranlagensimulation (0,1 mg Ag/L) Anwendung und eine Variante (IIb) bestehend aus einem Teil konventionellem Schlamm (1,67 g TS) und neun Teilen Kontrollschlamm (15,03 g TS). Zusätzlich wurden eine reguläre und eine zehnfach erhöhte Kontrolle (Kontrolle, Kontrolle 10fach) angesetzt. Die Klärschlämme wurden nach Abschluss der Kläranlagensimulation sowohl direkt appliziert als auch gefault. Der Langzeitversuch 6 wurde in einem zweiten Ansatz mit dem Langzeitversuch 7 überprüft, weil gegen Testende die Aktivität in der Kontrolle mit zehnfacher Klärschlammmenge stark zurückging. Auf einen Ansatz mit einfacher Klärschlammmenge wurde verzichtet, um den Arbeitsaufwand zu reduzieren, da dieser in den ersten sechs Langzeitversuchen ähnliche Ergebnisse lieferte.

5.5.1. Ag-Bodengehalte

Die Ag-Bodengehalte der Böden der Langzeitversuche 6 und 7 sind in der Tabelle 12 aufgeführt. Der für den Langzeitversuch 6 verwendete Boden hatte einen Ag-Gehalt von 0,06 mg Ag/kg TM, der durch die Applikation von nicht beaufschlagtem Klärschlamm und Faulschlamm um 0,01 mg Ag/kg TM bis 0,02 mg Ag/kg TM angehoben wurde. Die Ag-Gehalte der drei unterschiedlichen Applikationsvarianten (mit der gleichen Zielkonzentration) lagen sowohl bei den Behandlungen mit direkt appliziertem Schlamm, als auch bei denen mit Faulschlamm in einem vergleichbaren Bereich. Die Messwerte der Direktapplikation lagen zwischen 4,3 mg Ag/kg TM und 4,8 mg Ag/kg TM, die Messwerte der Faulschlammapplikation zwischen 8,8 mg Ag/kg TM und 9,1 mg Ag/kg TM.

Tabelle 12: Langzeitversuche 6 und 7 - Ag-Bodengehalte

	Direkt		Faulung	
Behandlung	[mg Ag/kg]		[mg Ag/kg]	
Langzeitversuch 6				
Boden	0,06		0,07	
Kontrolle	0,07		0,08	
Kontrolle 10fach	0,06		0,09	
NM 300K 0,1 mg/L*10	4,26		8,83	
NM 300K 1,0 mg/L+9Kontr.	4,65		9,09	
NM 300K 1,0 mg/L	4,66		9,00	
Std. Sandy Loam 9 BE026 CRM026-050	0,56			
Langzeitversuch 7				
	MW	MW _{abw}	MW	MW _{abw}
Boden	0,04	0,00	0,42	0,00
Kontrolle 10fach	0,06	0,01	0,09	0,00
NM 300K 0,1 mg/L*10	0,51	0,01	0,90	0,03
NM 300K 1,0 mg/L+9Kontr.	1,86	0,06	3,60	0,14

MW aus n = 2; MW_{abw} = Abweichung vom Mittelwert

Die Ag-Bodengehalte des Bodens für den Langzeitversuch 7 lagen mit 0,04 mg Ag/kg TM im Bereich des Bodens, der für den Langzeitversuch 6 verwendet wurde. Die Ag-Bodengehalte der beaufschlagten Böden unterschieden sich jedoch deutlich von denen in Langzeitversuch 6. In den Ansätzen mit direkt applizierten Klärschlämmen lagen die Ag-Gehalte bei 0,5 mg Ag/kg TM in der Behandlung mit reduzierter Einlaufkonzentration (10 * 0,1 mg Ag/L) und 1,9 mg Ag/kg TM in dem Ansatz mit dem Klärschlammgemisch (Kontrolle+1,0 mg Ag/L; 9+1). Die zuvor gefaulten Ansätze wiesen mit 0,9 mg Ag/kg TM und 3,6 mg Ag/kg TM etwa doppelt so hohe Ag-Gehalte auf. Damit waren die Ag-Gehalte grob um den Faktor 10 und 2,5 gegenüber der ersten Studie reduziert.

5.5.2. Potentielle Ammoniumoxidation

Die Nitrifikationsaktivität der Böden des sechsten Langzeitversuchs ist der Abbildung 23 (Direktapplikation) und der Abbildung 25 (Klärschlammfaulung) zu entnehmen. Die berechneten Hemmungen zur Klärschlammkontrolle zeigen die Abbildung 24 (Direktapplikation) und die Abbildung 26 (Klärschlammfaulung). Die Aktivität des reinen Bodens lag in beiden Ansätzen über den gesamten Testverlauf über 50 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Die Aktivität der direkt applizierten Kontrolle (1,67 g TS) sank über die 140 Tage von über 100 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf etwa 50 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Die Aktivität der mit NM-300K beaufschlagten Behandlung blieb an allen Untersuchungstagen gegenüber der Kontrolle

zurück. Ihre Aktivität nahm von etwa 80 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf unter 10 ng NO₂⁻-N/gTM*h ab. Die Behandlungen mit zehnfacher Klärschlammmenge (16,7 g TS) hatten eine deutlich gesteigerte Aktivität. Die Aktivität der Kontrolle mit 10facher Klärschlammmenge nahm von 550 ng NO₂⁻-N/gTM*h an Tag 60 auf etwa 400 ng NO₂⁻-N/gTM*h ab. Beide Silberbehandlungen hatten von Testbeginn (Tag 60) an eine reduzierte Aktivität im Vergleich zur Kontrolle.

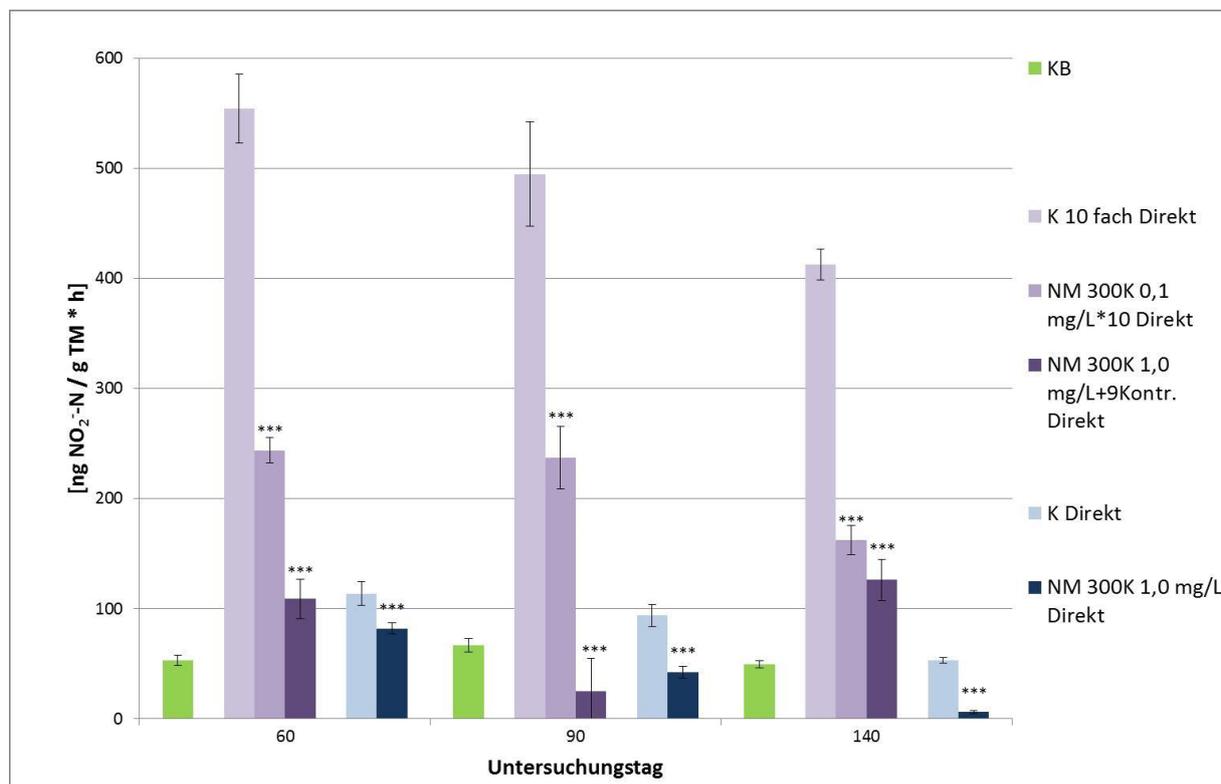


Abbildung 23: Langzeitversuch 6 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Direktapplikation. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; *p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)**

Der Ansatz mit der reduzierten Einlaufkonzentration (10 * 0,1 mg Ag/L) war trotz ähnlicher Ag-Gehalte aktiver als der Ansatz mit dem Klärschlammgemisch (Kontrolle+1,0 mg Ag/L; 9+1). Die Werte sanken von 240 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf 160 ng NO₂⁻-N/gTM*h in dem Ansatz mit reduzierter Einlaufkonzentration, bzw. lagen im Bereich von 120 ng NO₂⁻-N/gTM*h (Tag 60, 140; (Tag 90 = 20 ng NO₂⁻-N/gTM*h)). Die daraus resultierenden Hemmungen waren durchgängig auf einem hohen Niveau von über 50 % in dem Ansatz mit zehnfacher Klärschlammmenge. Die Hemmungen des regulären Ansatzes stiegen von etwa 25 % auf über 80 % an.

Die Nitrifikationsrate der Kontrolle mit einfacher Faulschlammmenge sank von 120 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf unter 40 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Die entsprechende mit AgNM beaufschlagte Behandlung nahm von knapp über 20 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf unter 5 ng NO₂⁻-N/gTM*h an

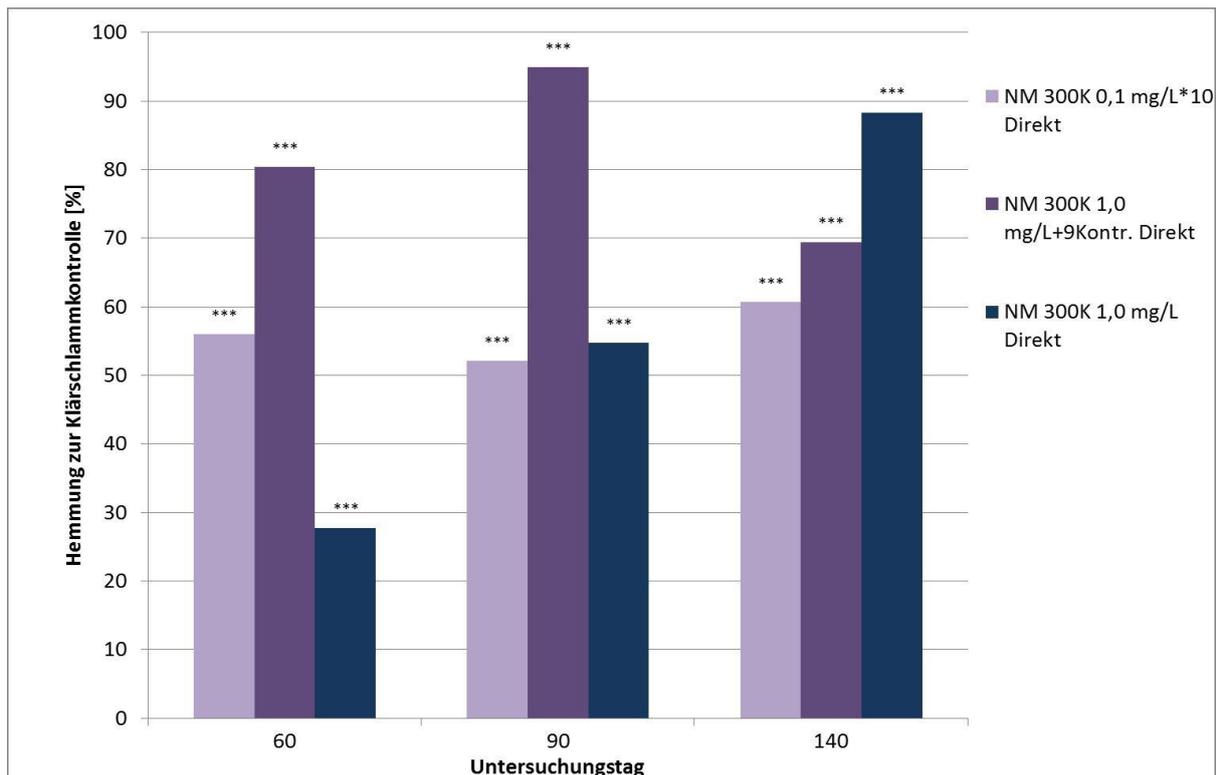


Abbildung 24: Langzeitversuch 6 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Direktapplikation. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$))**

Tag 140 ab. Wie bei dem Ansatz mit direkt appliziertem Schlamm waren auch die Aktivitäten der Behandlungen mit der zehnfachen Menge Faulschlamm gegenüber dem einfachen Ansatz gesteigert. Die Aktivität der Kontrolle sank über die Inkubationsdauer von 140 Tagen von über 220 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf etwa 30 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Gegenüber der Kontrolle unterschied sich die Aktivität der mit AgNM beaufschlagten Behandlungen an den ersten beiden Untersuchungstagen nur geringfügig. Nach 140 Tagen waren sie mit Nitrifikationsraten von 40 ng NO₂⁻-N/gTM*h (10 * 0,1 mg Ag/L) und 70 ng NO₂⁻-N/gTM*h (Kontrolle+1,0 mg Ag/L; 9+1) aktiver als die Kontrolle. Dementsprechend waren die Hemmungen der einfachen AgNM-Behandlung gegenüber der Kontrolle bereits ab Tag 60 über 80 % gehemmt. Die Hemmungen der Ansätze mit zehnfacher Klärschlammmenge an den beiden ersten Untersuchungstagen (jeweils 20 %, „Ansatz 10 * 0,1 mg Ag/L“ an Tag 90; „Ansatz Kontrolle+1,0 mg Ag/L“ an Tag 60) traten nach 140 Tagen aufgrund der geringen Aktivität der Kontrolle nicht mehr auf.

In den gefaulten Ag-Behandlungen mit der zehnfachen Klärschlammmenge von 16,7 g TS/kg TM blieben die Effekte aus, obwohl die Positivkontrolle (NM-300K 1 mg Ag/L) mit einfacher Klärschlammmenge, also dem gleichen Klärschlamm, der in der zusammengesetzten Ag-Behandlung (NM-300K 1 mg Ag/L + 9 Kontrolle) verwendet wurde Effekte zeigte.

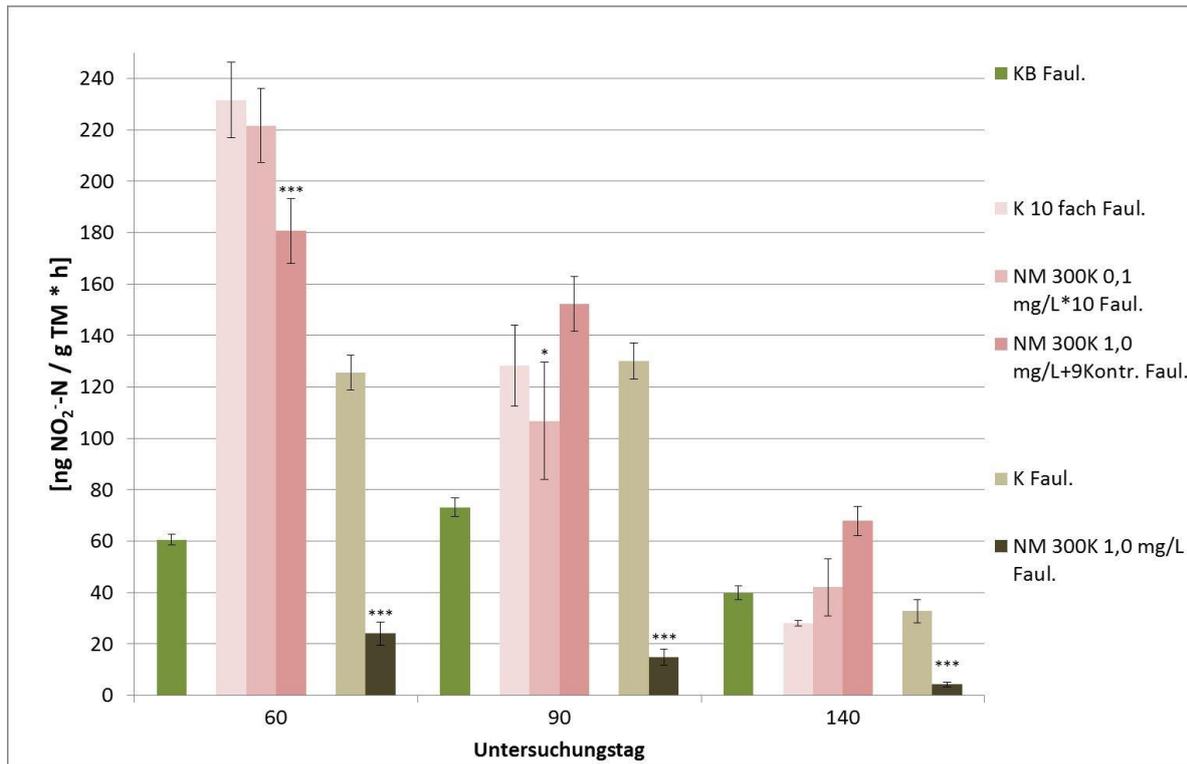


Abbildung 25: Langzeitversuch 6 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Klärschlammfäulung. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)

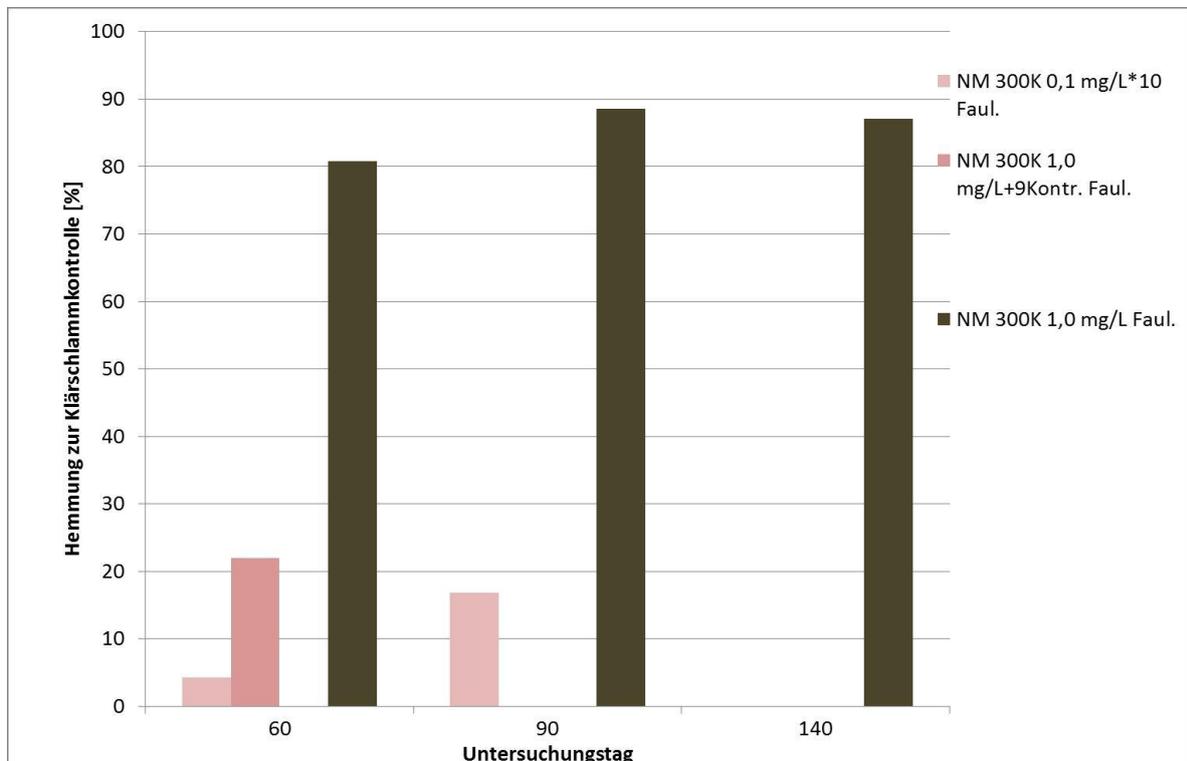


Abbildung 26: Langzeitversuch 6 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Klärschlammfäulung. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001))

Die Abbildung 27 zeigt die Nitritproduktion der potentiellen Ammoniumoxidation des Langzeitversuchs 7 nach der Direktapplikation, die aus den Aktivitätsdaten berechneten Hemmungen zeigt die Abbildung 28. Der reine HagenAM2013-Boden hatte über die Versuchsdauer von 140 Tagen eine gleichbleibende Aktivität von unter 50 ng NO₂⁻-N/gTM*h, die Klärschlammbehandlungen hatten nach 60 Tagen Inkubation eine ähnliche Aktivität. Die Klärschlammkontrolle lag ebenfalls bei etwa 50 ng NO₂⁻-N/gTM*h, wohingegen die AgNM-Behandlungen um etwa die Hälfte weniger aktiv waren. Die niedrige Aktivität der Klärschlammkontrolle stieg über die volle Inkubationsdauer auf über 300 ng NO₂⁻-N/gTM*h an, die Aktivität der AgNM-Behandlungen blieb unter 25 ng NO₂⁻-N/gTM*h.

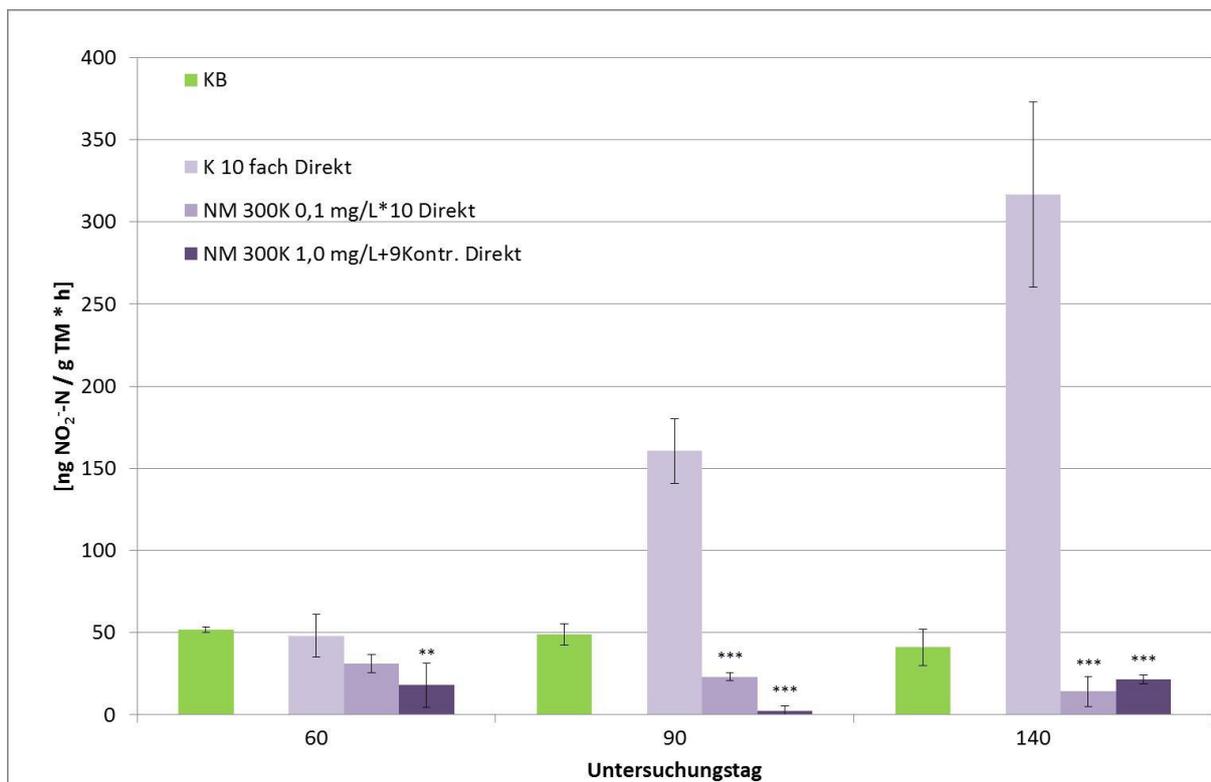


Abbildung 27: Langzeitversuch 7 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Direktapplikation. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; *p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)**

Daraus resultierten von Tag 60 an Hemmungen, die ab Tag 90 in beiden Behandlungen signifikant unterschiedlich zur Klärschlammkontrolle waren und nach 140 Tagen mehr als 90 % gegenüber der Klärschlammkontrolle gehemmt waren.

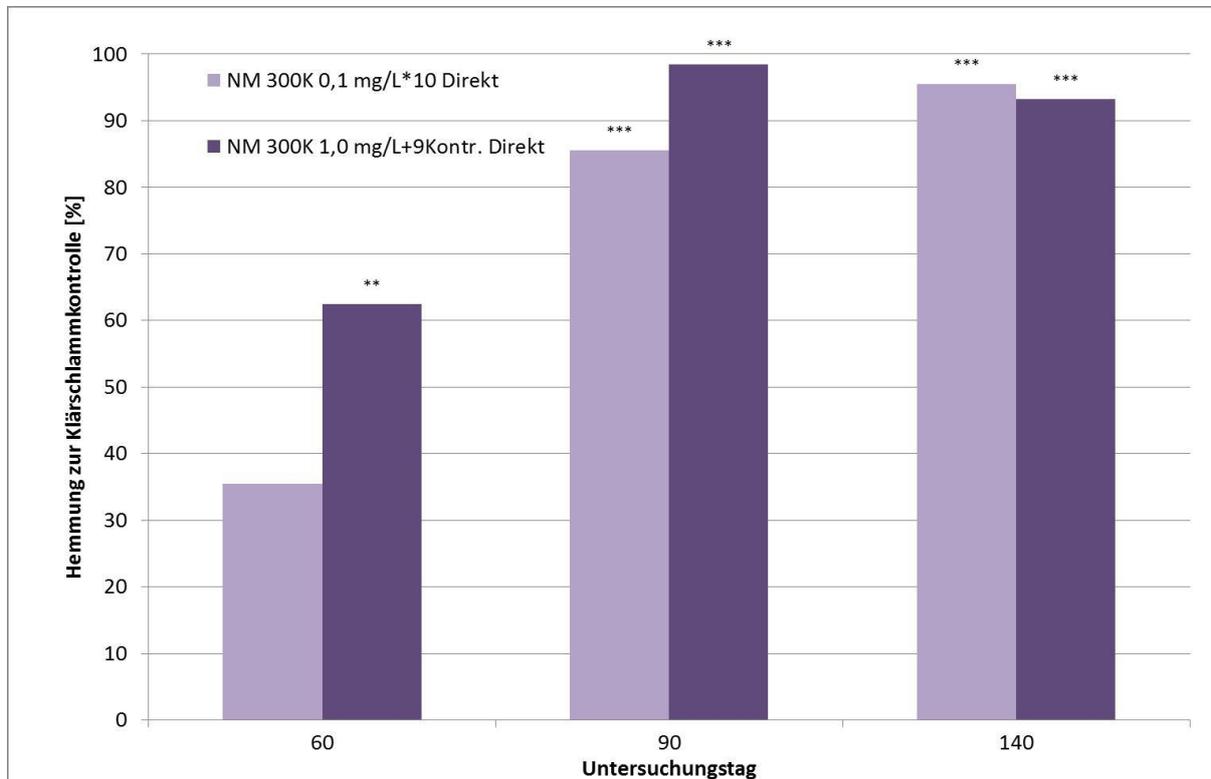


Abbildung 28: Langzeitversuch 7 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Direktapplikation. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$))**

Die Nitrifikationsraten des siebten Langzeitversuchs nach der Klärschlammfäulung sind in der Abbildung 29 dargestellt, die daraus resultierenden Hemmungen in der Abbildung 30. Der reine Boden wies eine gleichbleibende Aktivität von etwa 50 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf. Die Klärschlammansätze waren deutlich aktiver. Die Werte der Kontrollbehandlung sanken von etwa 350 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf 110 ng NO₂⁻-N/gTM*h nach 140 Tagen. Die beiden AgNM-Behandlungen waren gleichermaßen inaktiver, ihre Werte sanken von etwa 200 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf unter 70 ng NO₂⁻-N/gTM*h nach 140 Tagen. Daraus resultierten zu allen Beprobungszeitpunkten signifikante Hemmungen von etwa 40 %.

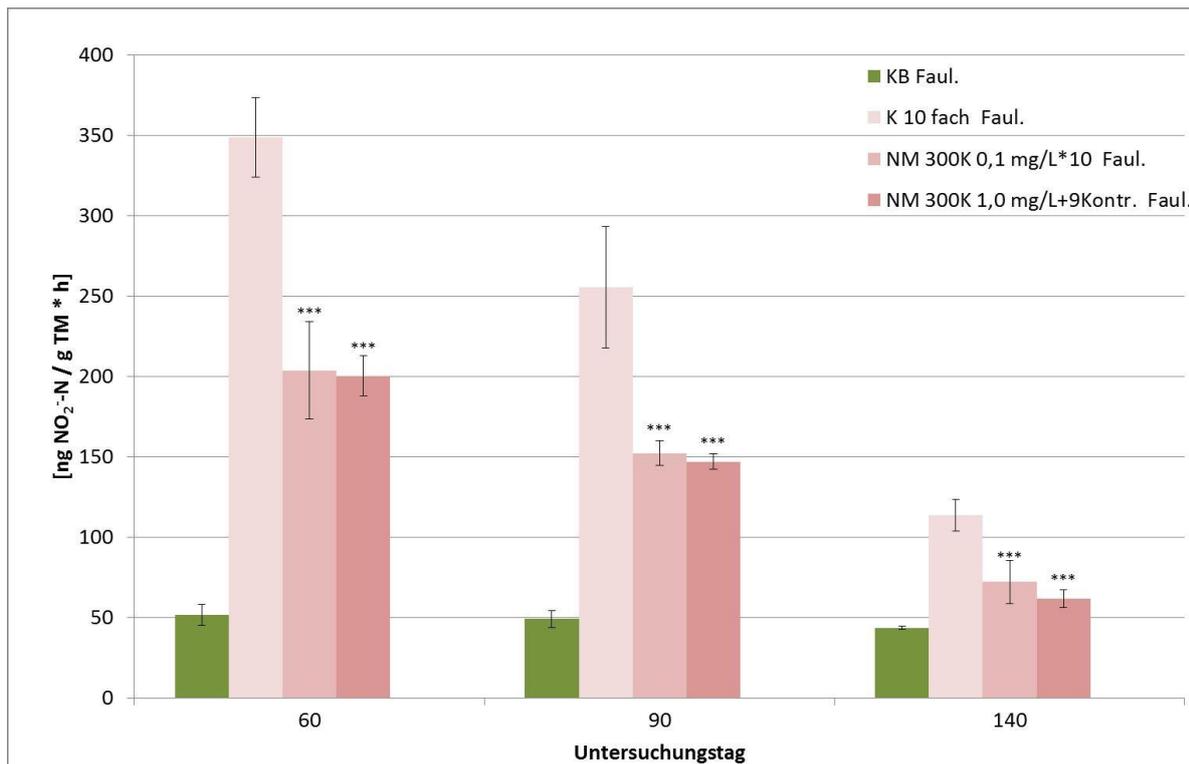


Abbildung 29: Langzeitversuch 7 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Klärschlammfäulung. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)

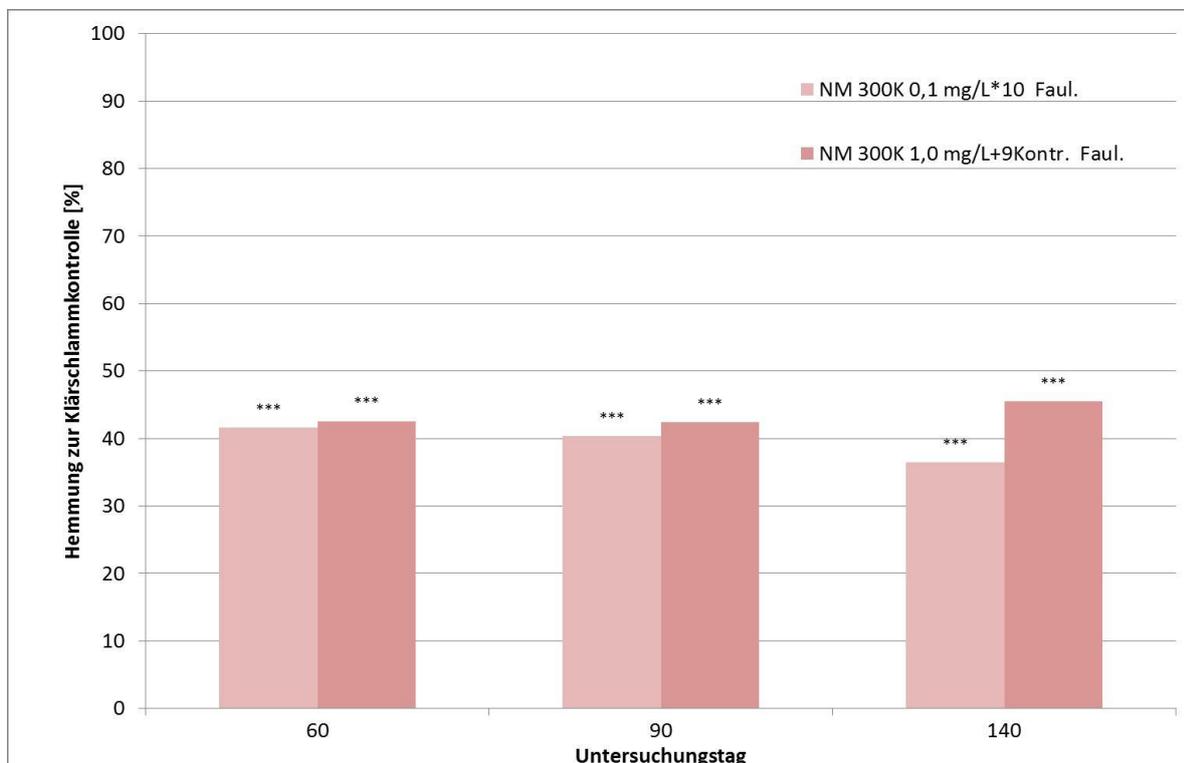


Abbildung 30: Langzeitversuch 7 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Einlaufkonzentrationen nach Klärschlammfäulung. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001))

Tabelle 13: Langzeitversuche 6 und 7 - Gegenüberstellung der Ergebnisse

Herangehensweise		Langzeitversuch 6	Langzeitversuch 7
Direkt-applikation	0,1 mg/L *10	50-60 % Hemmung, gleichbleibend	35-85 % Hemmung, ansteigend
	1,0 mg/L+9Kontr.	80, 95, 70 % Hemmung, schwankend	60->90 % Hemmung, ansteigend
	1,0 mg/L	30-90 % Hemmung, ansteigend	Nicht untersucht, Versuche 1-5 immer kontinuierlicher Anstieg der Hemmung >70 %
Klärschlamm-faulung	0,1 mg/L *10	Hemmung <20 %, geringe Aktivität der Kontrolle 10fach	~40 % Hemmung, gleichbleibend, Aktivität der Kontrolle nimmt ab
	1,0 mg/L+9Kontr.	Hemmung ~20 % (Tag 60) danach keine Hemmung, geringe Aktivität der Kontrolle 10fach	~40 % Hemmung, gleichbleibend, Aktivität der Kontrolle nimmt ab
	1,0 mg/L	80-90 % Hemmung, gleichbleibend	Nicht untersucht, Versuche 1-5 immer kontinuierlicher Anstieg der Hemmung >70 %

Die Ergebnisse der zwei Langzeitversuche 6 und 7 sind in der Tabelle 13 gegenübergestellt, dadurch wird besonders deutlich, dass bei allen Herangehensweisen mit direkt applizierten Klärschlämmen deutliche Effekte über die Versuchsdauer von 140 Tagen auftraten, auch wenn der zeitliche Verlauf zwischen den beiden Versuchen nicht identisch war. Bei der Herangehensweise über zuvor gefaulte Klärschlämme zeigten sich die Hemmungen des 1,0 mg Ag/L Ansatzes im Langzeitversuch 6 wie in den ersten fünf Langzeitversuchen stark gehemmt. Die Herangehensweisen mit erhöhter Klärschlammmenge zeigten hingegen keine konsistenten Hemmungen und diese waren nur gering ausgeprägt im sechsten Versuch. Im siebten Versuch waren die Hemmungen mit etwa 40 % zwar geringer als in den entsprechenden Ansätzen mit direkt applizierten Schlämmen, aber dennoch deutlich.

5.6. Bioverfügbarkeit von chemisch synthetisiertem Ag₂S

Um die Frage zu klären, ob das bei der Abwasser- und Klärschlammbehandlung entstandene Ag₂S gegenüber chemisch produziertem Ag₂S instabiler ist oder ob die aufgetretenen Effekte bei chemisch sulfidierten AgNM gleichermaßen auftreten, wurde eine Kläranlagensimulation durchgeführt, die neben NM-300K als Testgegenstand drei unterschiedliche Ag₂S und AgNO₃ als leicht lösliche ionische Kontrolle umfasste. Die Ergebnisse wurden anschließend nochmals mit einem Versuch ergänzt, bei dem die gleichen Substanzen in drei Ag-Gehalten (Zielgehalte: 0,56; 1,67; 5,0 mg Ag/kg TM) als reine Substanz ohne Klärschlammapplikation in den Boden eingebracht wurden.

5.6.1. Sulfidierung von NM-300K zu Ag₂S und Synthese von Ag₂S

Zusätzlich zu dem kommerziell erhältlichen, nicht nanopartikulären Ag₂S wurden zwei Ag₂S-NM chemisch hergestellt. Zum einen wurde NM-300K mit (NH₄)₂S₂ sulfidiert. Zum anderen wurde ein Ag₂S-NM unmittelbar synthetisiert. Die Abbildung 31 zeigt die Sulfidierung des NM-300K in (NH₄)₂S₂-Lösung zu Ag₂S. Die nanospezifische Eigenschaft der Plasmonenresonanz des Silbers verschwindet über die 137 Minuten vollständig, was die Veränderung des AgNM bedeutet, in diesem Fall die Sulfidierung des NM. Die TEM-Aufnahmen des veränderten Materials zeigen eine gleichmäßige Verteilung von Ag und S, was auf die Bildung Ag₂S hindeutet. Einige wenige Bereiche sind noch rein metallisch (Abbildung 32). Durch die Sulfidierung ist der Partikeldurchmesser um 3 - 4 nm (abhängig von der Bestimmungsmethode) größer geworden (Tabelle 14).

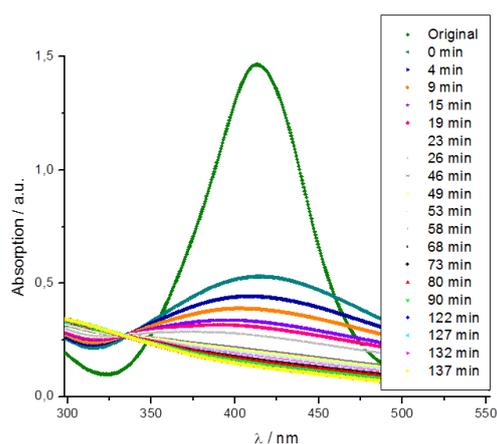


Abbildung 31: Sulfidierung von NM-300K in (NH₄)₂S₂ über 137 Minuten. Die abnehmende Plasmonenresonanz zeigt die Veränderung der Ag⁰ Partikel zu Ag₂S.

Um einen unmittelbaren Vergleich zum NM-300K zu haben, wurde ein sphärischer Ag₂S-Partikel mit ähnlicher Größe wie das NM-300K synthetisiert (Anhang 25). Der Partikeldurchmesser lag bei 16 nm mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt und bei 32 nm mit TEM bestimmt (Tabelle 14). Die mittels DLS und TEM bestimmten PSDs (particle size distribution) sind im Anhang 26 und Anhang 27 dargestellt.

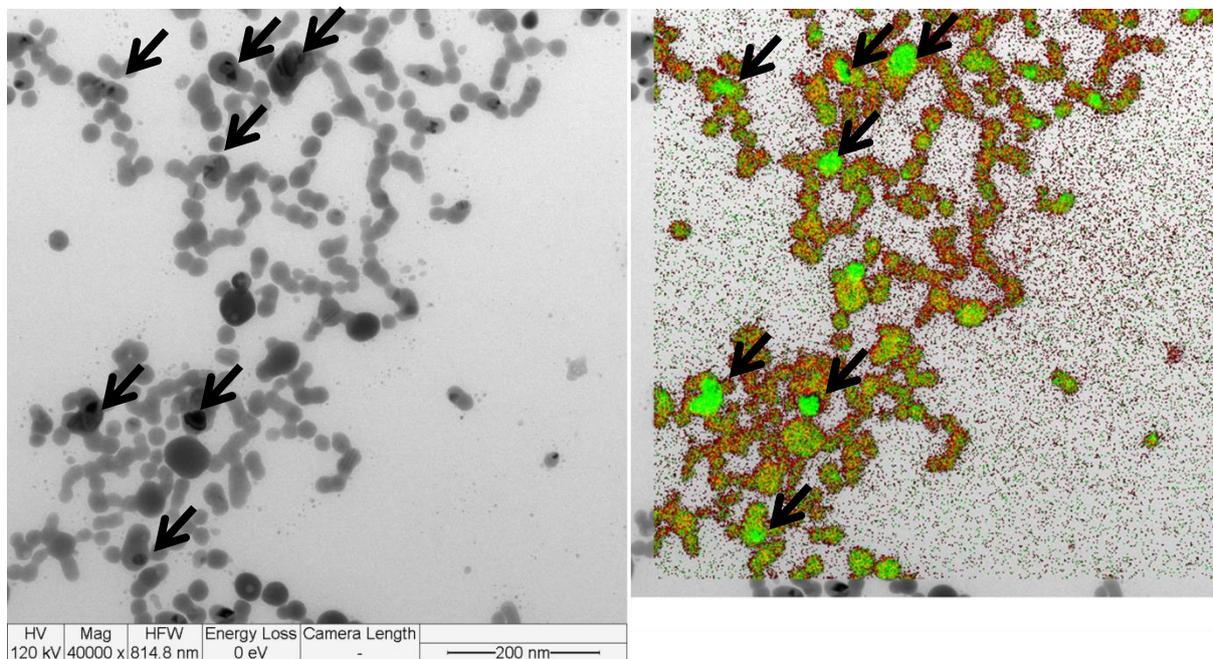


Abbildung 32: TEM-Aufnahme des sulfidierten NM-300Ks (links). Die elementspezifische Aufnahme (grün = Ag; rot = S) mittels energy dispersive spectroscopy (EDX) zeigt die überwiegende Sulfidierung der Partikel, einige größere Partikel weisen noch einen metallischen Kern auf (Extrembeispiele durch Pfeile gekennzeichnet).

Tabelle 14: Durchmesser der Testgegenstände NM-300K; Ag₂S NM-300K und Ag₂S NM ermittelt durch TEM und DLS. Der zweite, größere Durchmesser der DLS Messungen bezieht sich auf Agglomerate.

Nachweismethode	NM 300 K	Ag ₂ S NM300K	Ag ₂ S NM
	[nm]	[nm]	[nm]
TEM	15 nm	18 nm	32 nm
DLS	14 / 95 nm	18 / 104 nm	16 / 75 nm

5.6.2. Applikation über Kläranlagensimulation

Einige der Referenzmaterialien waren vor der Kläranlagensimulation bereits chemisch sulfidiert und wurden neben dem reinen NM300K und dem leicht löslichen AgNO_3 über zehn Tage in die Laborkläranlagen dosiert.

5.6.2.1. Mikrobielle Diversität im Klär- und Faulschlamm

Um die Anwesenheit und Aktivität von SRB und die damit ermöglichte Sulfidierung der AgNM in einer zweiten unabhängigen Studie zu belegen und um Effekte von AgNM, in diesem Fall auch sulfidierte AgNM und nicht nanopartikuläres Ag_2S , auf die mikrobielle Diversität des Klär- und Faulschlammes zu untersuchen, wurden DNA- und RNA-Proben extrahiert und mit DGGE untersucht. Die DGGE-Gele der SRB-DNA sind in den Anhängen 28 und 29 abgebildet. SRB sind wie in der vorherigen Studie (Kapitel 5.4) zu jedem Untersuchungszeitpunkt in der Kontrolle und der NM-300K- Behandlung anwesend, auch in der AgNO_3 - Behandlung sind SRB präsent. Nach 10 Tagen hatte sich in allen Behandlungen die SRB-Diversität gegenüber der Diversität beim Teststart verändert. Nach 35 Tagen Faulung veränderte sich die Struktur weiter. Zu der zeitlichen Veränderung deuteten sich bei den Silberbehandlungen mit NM-300K und AgNO_3 Unterschiede zur Kontrolle an. Die Diversität, gemessen an der Anzahl der DNA-Banden, war in beiden Behandlungen gegenüber der Kontrolle reduziert.

Die cDNA-Gele der gesamten Bakterien sind in Anhang 30 dargestellt. Die Diversität der allgemeinen Bakterien war zu Beginn des Simulationsversuchs in allen sechs Laborkläranlagen abgesehen von der Nummer 1 gleich. Die Diversität in den Klärschlämmen nahm über die zehn Tage Versuchsdauer unabhängig vom Testgenstand ab. Nach 35 Tagen Faulung veränderte sich diese mikrobielle Gemeinschaft weiter. Diese starke Veränderung durch die Faulung zeigte sich bereits bei den SRB. Die Behandlungen mit NM-300K und AgNO_3 tendierten eher zu mehreren DNA-Banden, die weniger intensiv ausgeprägt waren als die der Kontrolle. Die gewählte Testmethode und das Testdesign ließen bei diesen Ag-Konzentrationen keine Aussage zu Effekten der Testsubstanzen zu.

5.6.2.2. Ag-Bodengehalte

Die Ag-Bodengehalte sind in der Tabelle 15 aufgeführt. Die Ag-Gehalte des reinen unbehandelten Bodens lagen bei 0,05 mg Ag/kg TM, bzw. 0,04 mg Ag/kg TM wie schon in den zuvor durchgeführten Versuchen. Durch das Einbringen der Kontrollschlämme stiegen die Gehalte um 0,01 mg Ag/kg TM an, sodass die Kontrolle der Direktapplikation 0,06 mg Ag/kg TM aufwies und die Kontrolle nach Faulschlammapplikation 0,05 mg Ag/kg TM. Bei den Behandlungen nach Direktapplikation lagen die Messwerte zwischen 4,9 und 6,9 mg Ag/kg TM, wobei die NM-300K Behandlungen sowie die

Ag₂S NonNM Behandlung etwas niedrigere Gehalte aufwiesen und die nanopartikulären Ag₂S-Behandlungen (Ag₂S NM; Ag₂S NM-300K) sowie die AgNO₃-Behandlungen die höheren Messwerte. Diese Verteilung der Ag-Gehalte wiederholte sich bei den gefaulten Behandlungen. Die Messwerte lagen dabei jedoch insgesamt höher, zwischen 7,5 und 11,8 mg Ag/kg TM. Die Streuung der Messwerte lag teilweise bei über 10 %. Die direkt applizierte Ag₂S-NonNM-Behandlung wich substanzbedingt (nicht wasserlöslich, nicht nanopartikulär bei kleinen Applikationsmengen) mehr als 20 % ab.

Tabelle 15: Langzeitversuch 8 - Ag-Bodengehalte.

	Direktapplikation		Klärschlammfäulung	
Behandlung	MW [mg Ag/kg TM]	SD	MW [mg Ag/kg TM]	SD
Boden	0,05	0,00	0,04	0,00
Kontrolle	0,06	0,01	0,05	0,00
NM-300K	5,67	0,49	7,94	1,00
Ag₂S NM	6,82	0,23	11,76	0,64
Ag₂S NM-300K	6,47	0,68	10,70	1,28
Ag₂S NonNM	4,90	1,07	7,53	0,23
AgNO₃	6,12	0,16	9,26	0,65
Std. Sandy Loam 9 BE026 CRM026-050	0,56		0,55	

MW aus n = 3; SD = Standardabweichung

5.6.2.3. Potentielle Ammoniumoxidation

Die Nitrifikationsraten der potentiellen Ammoniumoxidation der Direkt- und der Faulschlammapplikation des Langzeitversuchs 8 sind in der Abbildung 33 dargestellt, die aus den Aktivitätswerten berechneten Hemmungen gegenüber den Kontrollbehandlungen sind in Abbildung 34 dargestellt. Die reinen Böden der zwei Teilversuche wiesen einen erheblichen Aktivitätsunterschied auf. Die Aktivität der Bodencharge für die Direktapplikationen lag an Tag 60 bei knapp unter 40 ng NO₂⁻-N/gTM*h, diese verringerte sich weiter auf unter 20 ng NO₂⁻-N/gTM*h, stieg dann aber wieder auf etwa 50 ng NO₂⁻-N/gTM*h nach 140 Tagen an. Die Bodencharge für den Ansatz der Faulschlämme stieg allmählich von 20 ng NO₂⁻-N/gTM*h, über 50 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf fast 60 ng NO₂⁻-N/gTM*h an. Die Klärschlammkontrolle der Direktapplikationen zeigte über die gesamte Versuchsdauer eine konstante Aktivität zwischen 60 ng NO₂⁻-N/gTM*h und 80 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Die Ag₂S NonNM-Behandlung wies eine ähnliche Aktivität wie die Kontrolle auf. Die Aktivität der übrigen Behandlungen (NM-300K, Ag₂S NM, Ag₂S NM-300K, AgNO₃) war ab Tag 60 geringer als die der Kontrolle und fiel über die 140 Tage von etwa 40 ng NO₂⁻-N/gTM*h auf 10 – 20 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Die AgNO₃-Behandlung wies dabei immer eine etwas geringere Aktivität als die anderen Behandlungen auf, bis sie nach 140 Tagen keine Aktivität mehr

zeigte. Die resultierenden Hemmungen waren über den gesamten Testverlauf statistisch signifikant. Die Hemmungen der NM (NM-300K, Ag₂S NM, Ag₂S NM-300K) stiegen von etwa 20 % auf über 60 % an, die Hemmung der AgNO₃-Behandlung begann bei etwa 40 % und endete in einer vollständigen Hemmung der Nitritproduktion. Die nicht nanopartikuläre Behandlung (Ag₂S NonNM) war zu keinem Zeitpunkt gehemmt.

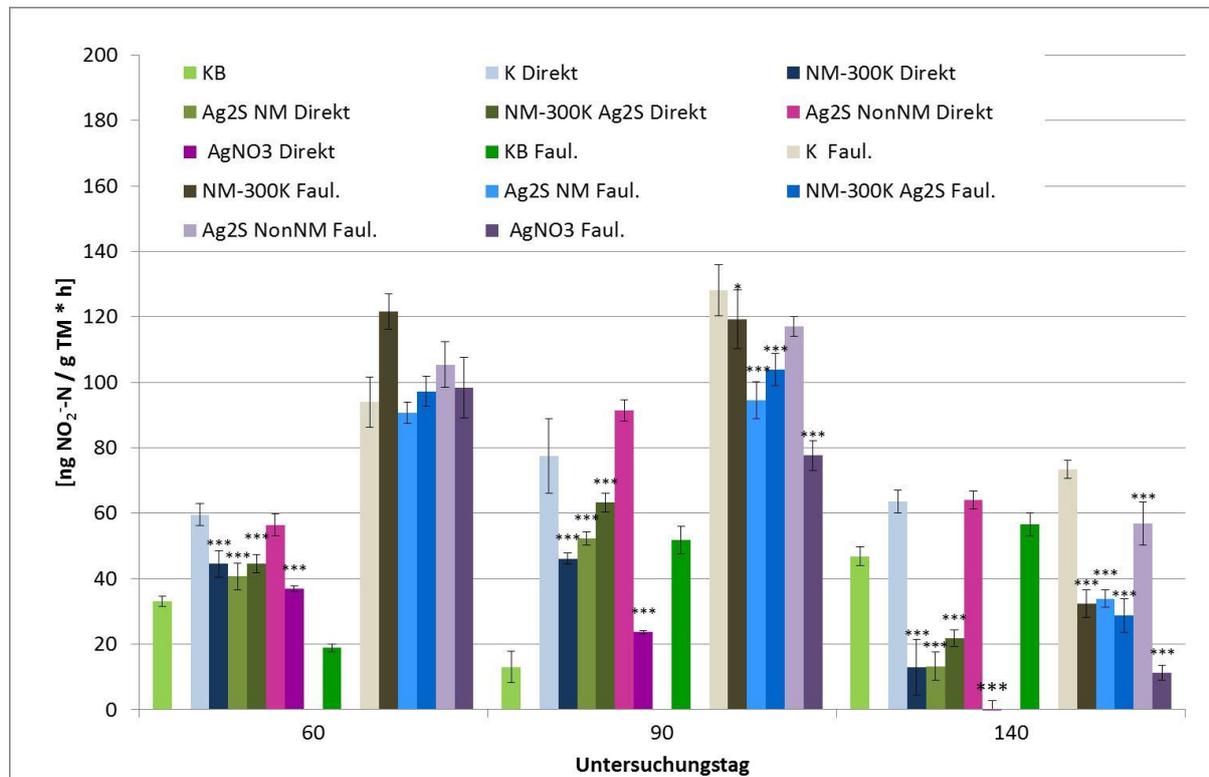


Abbildung 33: Langzeitversuch 8 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von den Testgegenständen (Referenzsubstanzen) nach Direktapplikation und nach Klärschlammfäulung. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; *p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)**

Die Aktivität der Faulschlammkontrolle stieg von etwa 100 ng NO₂⁻-N/gTM*h nach 60 Tagen auf über 120 ng NO₂⁻-N/gTM*h an Tag 90 an und sank dann nach 140 Tagen auf unter 80 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Die mit einem Testgegenstand beaufschlagten Behandlungen waren am ersten Untersuchungstag noch auf dem Niveau der Kontrolle. Die NM-300K-Behandlung zeigte eine deutlich gesteigerte Aktivität von 120 ng NO₂⁻-N/gTM*h gegenüber 100 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Nach 90 Tagen Inkubationsdauer sank die Aktivität der Ansätze mit sulfidierten AgNM (Ag₂S NM; Ag₂S NM-300K) und mit AgNO₃ gegenüber der Kontrolle ab, die der Ansätze mit NM300K und Ag₂S-NonNM sanken nur minimal ab. Nach 140 Tagen ist die Aktivität der NM-Ansätze (NM-300K, Ag₂S NM, Ag₂S NM-300K) auf etwa 30 ng NO₂⁻-N/gTM*h gesunken, die der AgNO₃-Behandlung auf etwa 10 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Die Aktivität der Ag₂S-NonNM-Behandlung sank auf unter 60 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Alle Behandlungen des gefaulten Ansatzes wiesen erst nach 90 Tagen Inkubationsdauer leichte aber statistisch signifikante Hemmungen von unter 25 % (AgNO₃ = 40 %) auf, die auf über 50 % nach

140 Tagen Inkubation anstiegen. Die Behandlung mit AgNO_3 war mit über 80 % am letzten Untersuchungstag am stärksten gehemmt, die Behandlung mit dem nicht nanopartikuläre Ag_2S mit 20 % am geringsten.

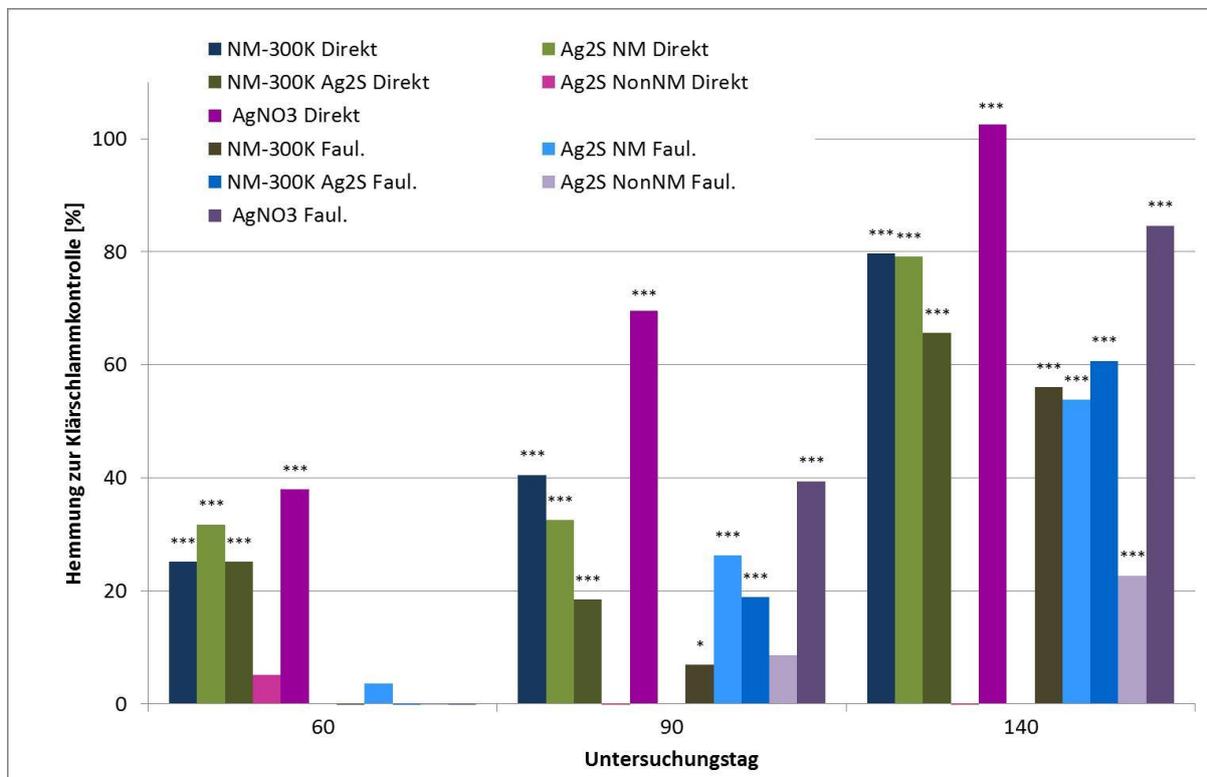


Abbildung 34: Langzeitversuch 8 – Hemmung der Nitritproduktion durch Testgegenstände (Referenzsubstanzen) im Vergleich zur Klärschlammkontrolle nach Direktapplikation und nach Klärschlammfäulung. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$))**

5.6.3. Applikation der reinen Testgegenstände

Da über 140 Tage Inkubation der Böden ausgeprägte Effekte fast aller Testgegenstände aufgetreten sind, wurden die Ergebnisse mit einem zweiten Test abgeglichen. Dabei wurde auf die Kläranlagensimulation im Vorfeld verzichtet, im Gegenzug jedoch drei Bodengehalte über die Dauer von 140 Tagen getestet

5.6.3.1. Ag-Bodengehalte

Die Ag-Bodengehalte sind in der Tabelle 16 aufgelistet. Der prozentuale Unterschied im Ag-Gehalt zum Zielwert war in den beiden unteren Stufen (0,56; 1,67 mg Ag/kg TM) größer als in der höchsten Stufe (5,00 mg Ag/kg TM). Abgesehen von dem nicht nanopartikulären und nicht löslichen Ag_2S -NonNM lagen die Messwerte der einzelnen Testgegenstände grob im Bereich der Ag-Zielgehalte von 0,56; 1,67; 5,00 mg Ag/kg TM. Die Messwerte in der höchsten Behandlung wichen weniger als 15 % (NM-300K) vom Zielgehalt ab, in der mittleren und niedrigen Behandlung unterschieden sich jeweils die Ag_2S -NM-Behandlungen um 40 bis 50 % vom Sollwert. Die Abweichung der übrigen Testgegenstände betrug weniger

als 25 % in der mittleren und niedrigen Behandlung. Substanzbedingt (nicht nanopartikuläres gemörsertes Pulver, nicht wasserlöslich, geringe Substanzmenge) war die Abweichung der Messwerte vom Zielgehalt bei dem Testgegenstand Ag₂S-NonNM und zwischen den Replikaten sehr stark. Die Messwerte überstiegen den Zielgehalt um mehr als 100 % in den zwei niedrigen Gehaltsstufen und fast 45 % in der höchsten Gehaltsstufe.

Tabelle 16: Versuch ohne Applikation über Klärschlamm - Ag-Bodengehalte.

Zielgehalt	0,56		1,67		5,0	
Behandlung	MW [mg Ag/ kg TM]	MW _a	MW [mg Ag/ kg TM]	MW _a	MW [mg Ag/ kg TM]	MW _a
Kontrolle	0,05	0,01				
NM-300K	0,53	0,01	1,27	0,03	4,26	0,17
Ag ₂ S NM	0,83	0,03	2,35	0,02	5,52	0,17
Ag ₂ S NM-300K	0,64	0,03	1,49	0,06	4,61	0,43
Ag ₂ S NonNM	1,19	0,15	4,30	1,80	7,20	0,56
AgNO ₃	0,67	0,05	1,65	0,03	4,32	0,06
Std. Sandy Loam 9 BE026 CRM026-050	0,51	0,02				

MW aus n = 2; MW_a = Abweichung vom Mittelwert

5.6.3.2. Potentielle Ammoniumoxidation

Die Nitrifikationsraten der potentiellen Ammoniumoxidation in den Böden, die mit den reinen Testgegenständen (Referenzsubstanzen) beaufschlagt wurden sind in der Abbildung 35 dargestellt, die aus den Aktivitätswerten berechneten Hemmungen gegenüber der Kontrollbehandlung sind in Abbildung 36 dargestellt. Die Hemmungen der reinen, unmittelbar applizierten Testgegenstände unterschieden sich nach 140 Tagen hinsichtlich des zeitlichen Auftretens und des Ausmaßes der Effekte zum Teil erheblich von den Ergebnissen nach Applikation über Klärschlamm. Besonders das reine NM-300K und das AgNO₃ zeigten eine unmittelbare und starke Wirkung.

Die Nitrifikationsraten des Kontrollbodens lagen über 84 Tage gleichbleibend im Bereich von etwa 60 ng NO₂⁻-N/gTM*h und an den folgenden Untersuchungstagen 112 und 140 bei etwa 45 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Die Behandlungen der drei sulfidierten Testgegenstände Ag₂S-NM, NM-300K-Ag₂S und Ag₂S-NonNM wiesen in den ersten 28 Tagen ähnliche Aktivitäten der Nitrifikation auf, die Hemmungen gegenüber der Kontrolle blieben unter 10 %. Nach 56 Tagen gingen die Aktivitäten der Testgegenstände Ag₂S-NM und NM-300K-Ag₂S konzentrationsabhängig zurück, was zu signifikanten Hemmungen ab dem mittleren Ag-Bodengehalt von 1,67 mg Ag/kg führte. Die Hemmungen lagen in der höchsten Behandlung

nach 56 Tagen bei etwa 30 % ($\text{Ag}_2\text{S-NM}$) und 50 % ($\text{NM-300K-Ag}_2\text{S}$). An den Tagen 84 und 112 waren die Hemmungen weniger deutlich, zum Testende nach 140 Tagen wurden die signifikanten Hemmungen jedoch bestätigt. Die Hemmungen resultierten konzentrationsabhängig mit 20 % und 50 % Hemmung in den höchsten Konzentrationen des synthetisierten Nanomaterials ($\text{Ag}_2\text{S NM}$), beziehungsweise mit 50 % und 90 % Hemmung gegenüber der Kontrolle durch das sulfidierte NM-300K ($\text{Ag}_2\text{S NM-300K}$). Das nicht nanopartikuläre Ag_2S ($\text{Ag}_2\text{S NonNM}$) rief über den gesamten Testverlauf keine negativen Effekte hervor.

Die Aktivitäten in den Behandlungen mit dem reinen, metallischen NM-300K blieben ab dem ersten Untersuchungstag in den zwei höheren Testgehalten von 1,67 mg Ag/kg TM und 5,00 mg Ag/kg TM gegenüber der Kontrolle zurück. Die Aktivität der mittleren Behandlung (1,67 mg Ag/kg TM) stagnierte zwischen etwa 40 ng NO_2^- -N/gTM*h und 50 ng NO_2^- -N/gTM*h über 112 Tage und sank anschließend auf etwa 30 ng NO_2^- -N/gTM*h. Die Aktivität der höchsten Behandlung (5,00 mg Ag/kg TM) sank von 30 ng NO_2^- -N/gTM*h, über 10 ng NO_2^- -N/gTM*h nach 84 Tagen und kam danach fast vollständig zum Erliegen. Daraus resultierten bereits nach 28 Tagen Hemmungen von 20 % und über 80 % gegenüber der Kontrolle, die auf etwa 40 % und 100 % nach 56 Tagen stiegen und in diesen Bereichen bis zum Testende stagnierten.

Der Ansatz mit dem leicht löslichen AgNO_3 wies ab dem ersten Tag in allen drei Behandlungen eine konzentrationsabhängige, reduzierte Aktivität gegenüber der Kontrolle auf. Die Aktivität in der niedrigeren Behandlung mit 0,67 mg Ag/kg TM stieg über die ersten 28 Tage von 40 ng NO_2^- -N/gTM*h auf etwa 70 ng NO_2^- -N/gTM*h an und sank danach wieder auf diesen Wert ab. Die Aktivität der höchsten Behandlung mit 5,00 mg Ag/kg TM war an Tag 1 kaum zu messen, an den folgenden Untersuchungstagen lag sie bei unter 10 ng NO_2^- -N/gTM*h. Daraus ergaben sich in der höchsten Behandlung zu allen Untersuchungszeitpunkten durchgängige Hemmungen von über 80 % bis annähernd 100 %. Die Hemmung der mittleren Behandlung (1,67 mg Ag/kg TM) lag fast durchgängig zwischen etwa 40 % bis 60 %. Die Hemmungen in der niedrigsten Behandlung gegenüber der Kontrollbehandlung stieg von circa 20 %, auf 40 % über die Testdauer von 140 Tagen, nur an Tag 28 zeigte sich keine Hemmung.

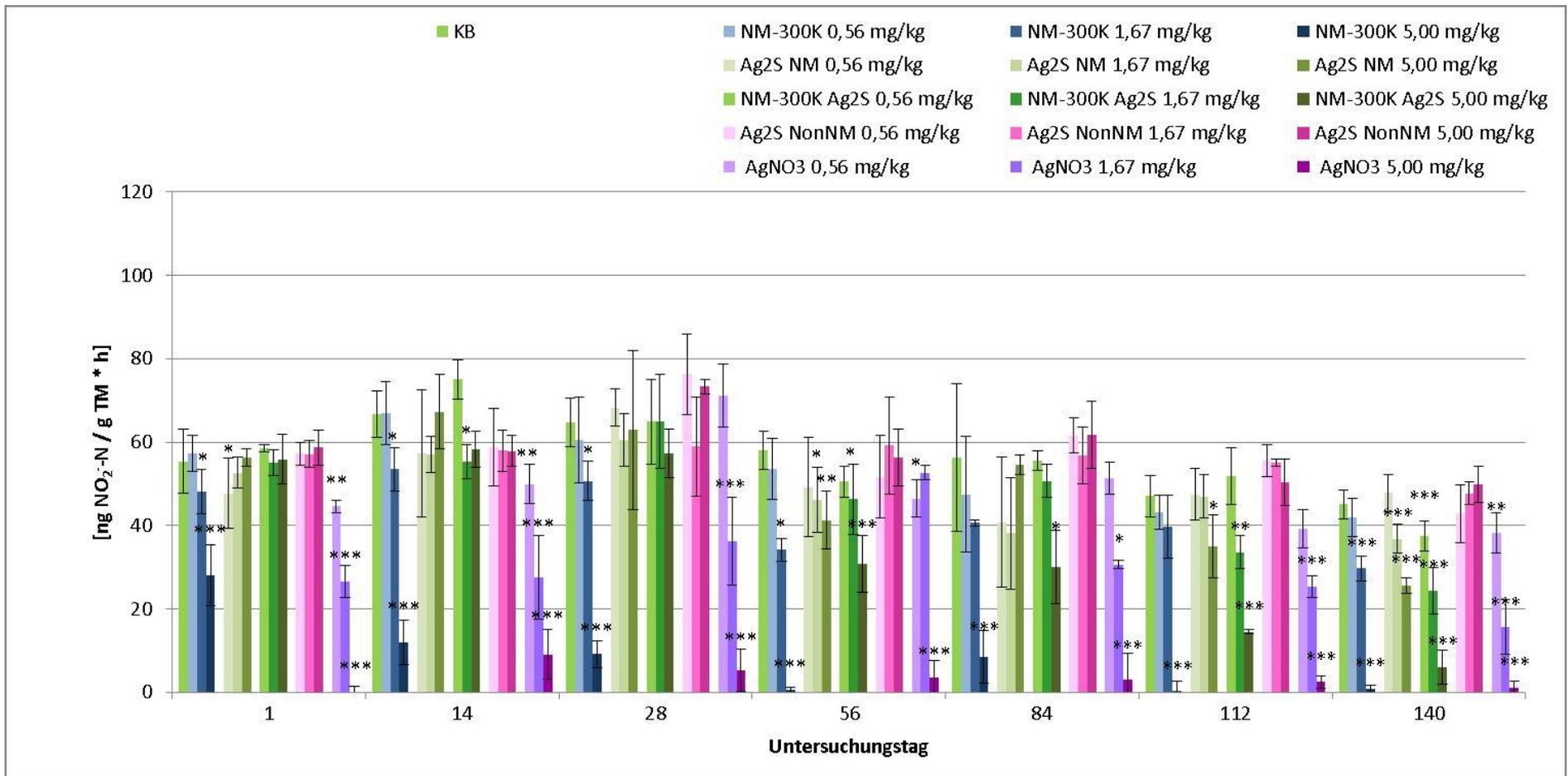


Abbildung 35: Versuch ohne Applikation über Klärschlamm – Nitritproduktion in Abhängigkeit von den Testgegenständen (Referenzsubstanzen) nach Applikation der Reinsubstanzen. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)

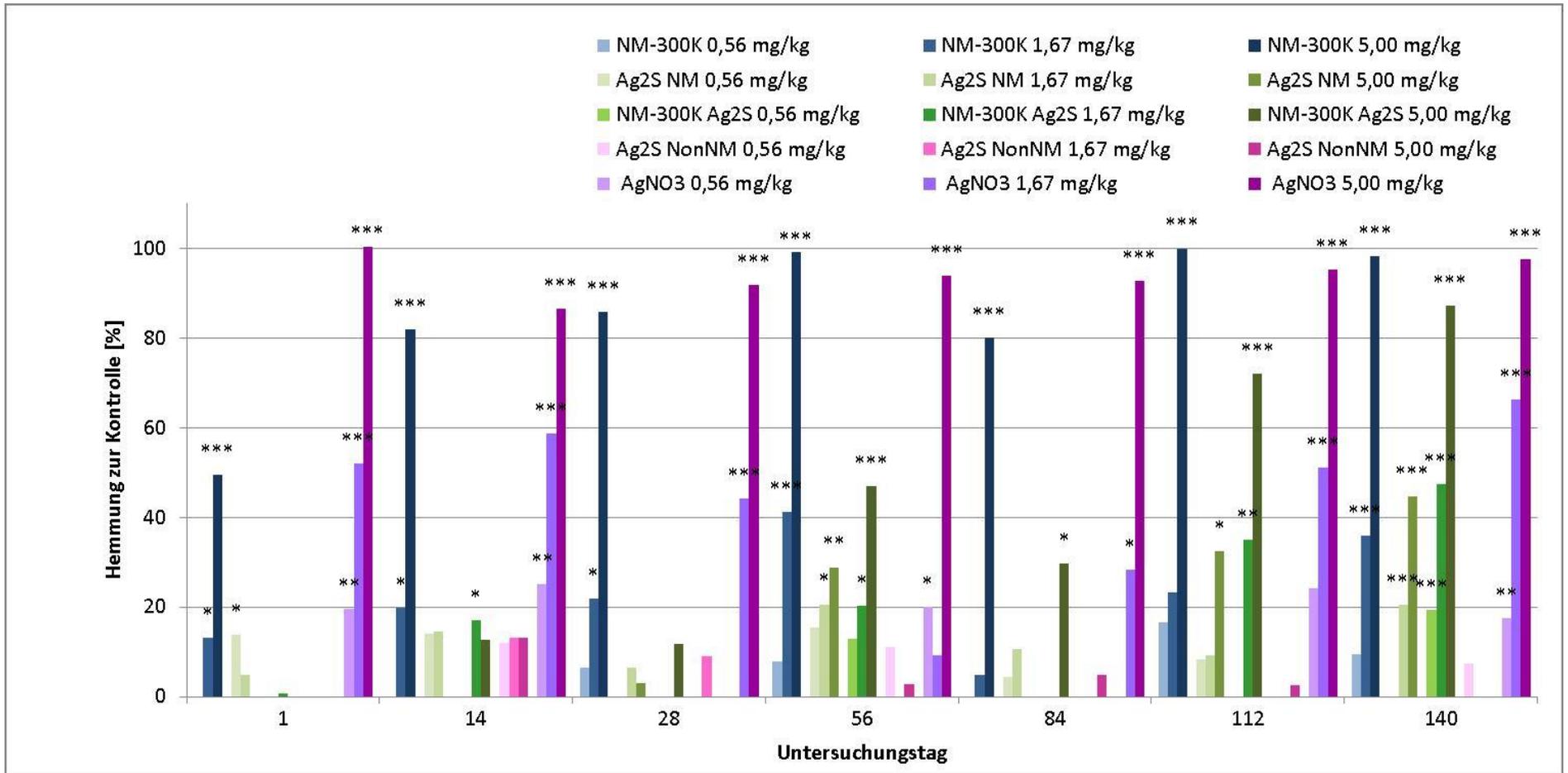


Abbildung 36: Versuch ohne Applikation über Klärschlamm – Hemmung der Nitritproduktion durch Testgegenstände (Referenzsubstanzen) im Vergleich zur Kontrolle nach Applikation der Reinsubstanzen. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001))

5.7. Übertragbarkeit von Labordaten auf Daten aus Freilandversuchen

Um die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Laborstudien auf Ergebnisse unter Freilandbedingungen zu untersuchen, wurden mit NM-300K beaufschlagte Böden parallel in Freilandlysimetern und im Labor inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Effekte auf die Nitrifikation und die Bodenatmung untersucht. Darüber hinaus wurden Wetterdaten erfasst, Silbergehalte in Pflanzen, Sickerwasser und Böden bestimmt, die Pflanzenbiomassenproduktion bestimmt und im Labor Pflanzenwachstums- und Regenwurmversuche durchgeführt.

5.7.1. Klimabedingungen und Bodenbeschaffenheit

Der mittlere Niederschlag über den Versuchszeitraum lag bei 81,3 mm pro Monat. Die Werte schwankten von 0,4 mm im Februar 2015 bis 367,7 mm im Juli 2015. Die Monatsmitteltemperatur schwankte von -0.4°C im Februar 2014 bis 18.4°C im August 2015 (Abbildung 37).

Die pH-Werte der Böden in den obersten 20 cm lag nach Applikation des Klärschlammes zwischen pH 6,0 und pH 5,3 in der Kontrolle, zwischen pH 5,8 und pH 5,3 in dem Lysimeter mit 1,8 mg Ag/kg TM und zwischen pH 5,7 und pH 5,4 in dem Lysimeter mit 7,0 mg Ag/kg TM.

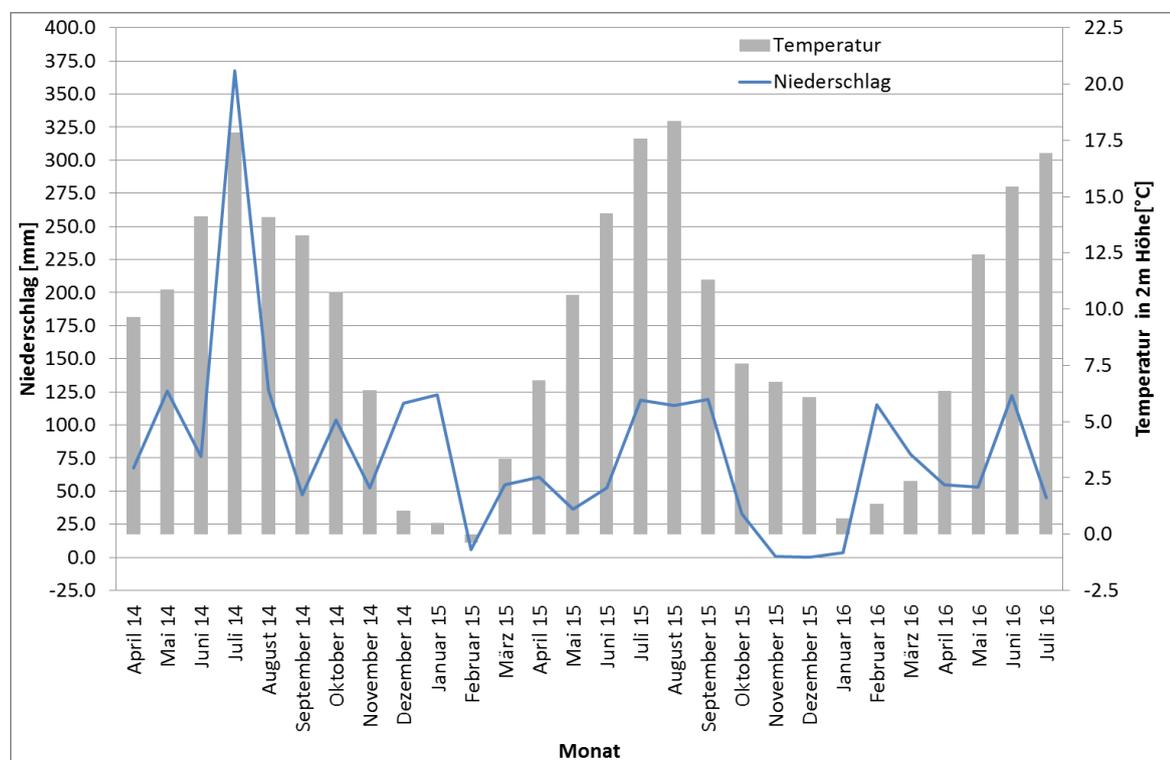


Abbildung 37: Niederschlag und Temperatur (Monatsmittelwerte) während der Lysimeterstudie.

5.7.2. Ag-Bodengehalte - Verlagerung der AgNM

Abbildung 38 zeigt den zeitlich Verlauf (08.05. 2014; 15.09.2014; 28.07.2015) der Silbergehalte ($n=5$) der vier obersten 10 cm-Horizonte der Lysimeter (0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm, und 30-40 cm). Der aufgebrauchte Kontroll-Klärschlamm hatte die Ag-Gehalte der beiden oberen 10 cm-Horizonte nicht erhöht. Die Ag-Gehalte der Kontrollen lagen in allen Proben unter $0,04 \pm 0,01$ mg Ag/kg TM. Die untersten 10 cm-Horizonte (30-40 cm) der AgNM-Behandlungen hatten Ag-Gehalte von $0,06 \pm 0,03$ mg Ag/kg TM und lagen damit im Bereich der Kontrolle. Der dritte 10 cm-Horizont (20-30 cm) wies gegenüber der Kontrolle erhöhte Gehalte von max. $0,5 \pm 0,5$ mg Ag/kg TM in der höheren Behandlung (7,0 mg Ag/kg) auf. Die Ag-Bodengehalte der beiden obersten 10 cm-Horizonte (0-10 cm, 10-20 cm) lagen im Bereich der Zielkonzentration, dabei zeigte sich aufgrund der Applikationsmethode ein etwas höherer Ag-Gehalt in den obersten 10 cm. Die Messungen der fünf Proben pro Lysimeter wiesen zum Teil erhebliche Schwankungen auf. Eine Verlagerung der AgNM in Böden ist auf Grundlage dieser Messdaten und der Heterogenität der Lysimeter aufgrund der Applikationsmethode, Bewirtschaftung sowie Beprobung nicht zu erkennen.

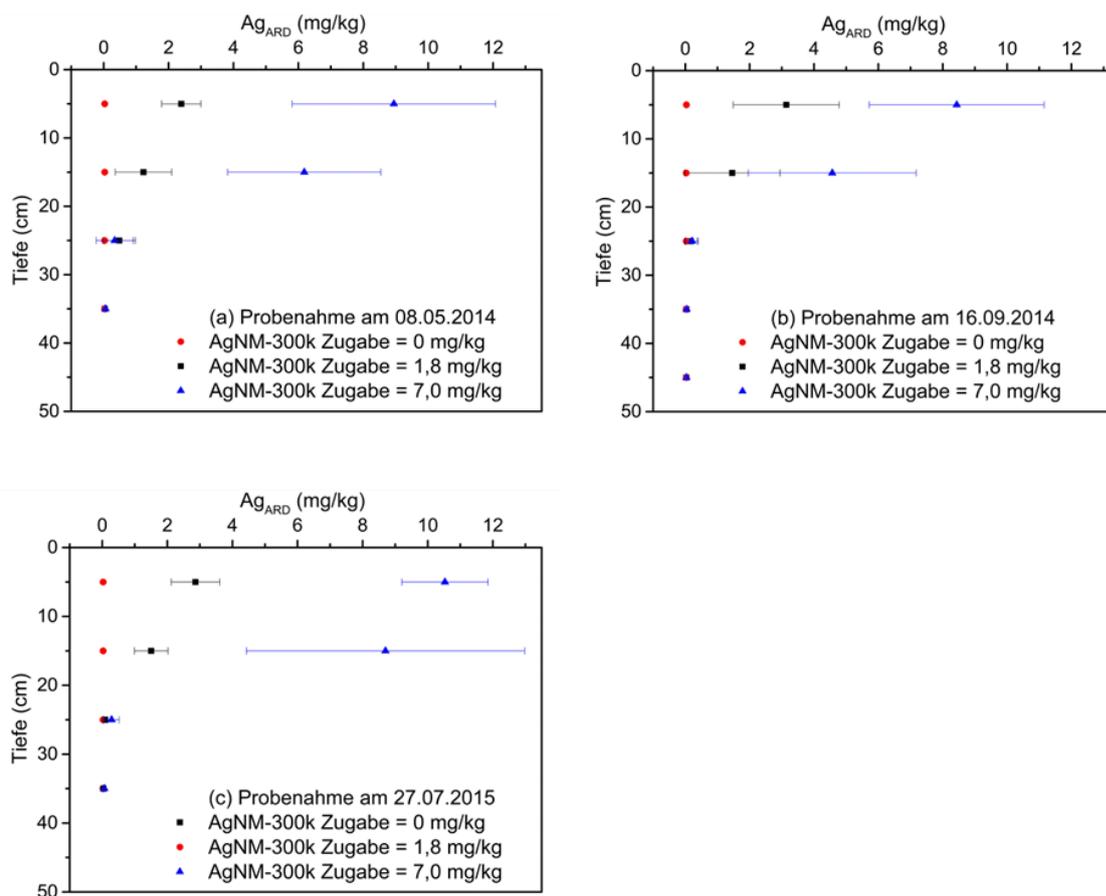


Abbildung 38 Silbergesamtgehalte nach Königswasseraufschluss der vereinigten Proben der oberen vier 10 cm-Horizonte (0 - 10 cm, 10 - 20 cm, 20 - 30 cm, 30 - 40 cm) nach Klärschlammapplikation zu den drei Probenahmeterminen am (a) 08.05.2014, (b) 16.09.2014 und (c) 27.07.2015. Der Schlamm wurde in die obersten 20 cm eingearbeitet. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der fünf Replikate.

Über die Messung der Ag-Bodengehalte hinaus wurde das Sickerwasser der Lysimeter aufgefangen und die Ag-Konzentration gemessen. Die höchste Konzentration wurde mit 256 ng/L in dem Sickerwasser des 7 mg Ag/kg-Lysimeters gemessen. Das Sickerwasser der Kontrolle wies eine geringe Ag-Konzentration von 24 ng/L ($n = 32$) auf, das Sickerwasser der 1,8 mg Ag/kg-Behandlung lag mit 25 ng/L ($n=33$) auf dem gleichen Niveau. Die höchsten Ag-Konzentrationen wurden im Sickerwasser der 7,0 mg Ag/kg-Behandlung gemessen, sie unterschieden sich mit 56 ng/L ($n=31$) signifikant von der Kontrolle (Mann-Whitney U-Test; $p<0,05$). Obwohl über die Ag-Bodengehalte keine Verlagerung der AgNM zu erkennen war, wies das Lysimeter mit der Testkonzentration von 7,0 mg Ag/kg einen kontinuierlichen geringen Ag-Austrag über das Sickerwasser auf.

5.7.1. Potentielle Ammoniumoxidation

Die Aktivität der ammoniumoxidierenden Bakterien der im Labor inkubierten Böden ist in der Abbildung 39 dargestellt, die Abbildung 41 zeigt die Nitrifikationsaktivität der im Freiland inkubierten Böden. Die berechneten Hemmungen im Vergleich zur Kontrolle der im Labor inkubierten Böden sind Abbildung 40 zu entnehmen, die der Böden der Freilandlysimeter der Abbildung 42. Die gemessenen pH-Werte an den Untersuchungstagen sind in Anhang 31 zusammengefasst. Zu Testbeginn im Mai 2014 hatte die Kontrolle (Startwert für Labor- und Freilandteil der Studie) eine Aktivität von 60 ng NO_2^- -N/gTM*h. Die Aktivität der Kontrolle stieg bis Tag 90 auf 106 ng NO_2^- -N/gTM*h in dem Laborversuch an, danach sank sie auf einen Wert von 27,7 ng NO_2^- -N/gTM*h nach 180 Tagen im November 2014 ab. Anschließend war die Aktivität der Böden so gering, dass der Versuch beendet wurde. Die beiden AgNM-Behandlungen zeigten einen ähnlichen Verlauf ihrer Aktivität. Die höhere Konzentration wies reduzierte Nitritproduktionsraten im Vergleich zur Kontrolle auf. Die 1,8 mg Ag/kg Behandlung steigerte ihre Nitritproduktion von 55 ng NO_2^- -N/gTM*h auf 119 ng NO_2^- -N/gTM*h nach 90 Tagen und sank danach auf 22 ng NO_2^- -N/gTM*h ab. Die Aktivität der 7,0 mg Ag/kg Behandlung stieg von 38 ng NO_2^- -N/gTM*h auf 77 ng NO_2^- -N/gTM*h nach 90 Tagen und sank danach auf 5 ng NO_2^- -N/gTM*h nach 180 Tagen Inkubation im Labor.

Die beiden AgNM-Behandlungen waren an Tag 0 gegenüber der Kontrolle gehemmt. Diese Hemmung zeigte sich nach 30 Tagen nicht mehr, ab Tag 60 war die 7,0 mg Ag/kg Behandlung gehemmt. Die Hemmungen stiegen über 180 Tage von 17 % auf 83 % an. Die 1,8mg Ag/kg Behandlung war an den meisten Untersuchungstagen leicht stimuliert, es zeigte sich über die gesamte Versuchsdauer keine signifikante Hemmung. Die pH-Werte der im Labor inkubierten Böden sanken über den Versuchszeitraum über etwa 0,5 pH-Einheiten ab.

Die Aktivität der Kontrolle der in Freilandlysimetern inkubierten Böden verdoppelte sich von 60 ng NO_2^- -N/gTM*h auf 120 ng NO_2^- -N/gTM*h, zeigte danach im Februar 2015 einen jahreszeitlich bedingten Rückgang auf unter 40 ng NO_2^- -N/gTM*h, anschließend lag die

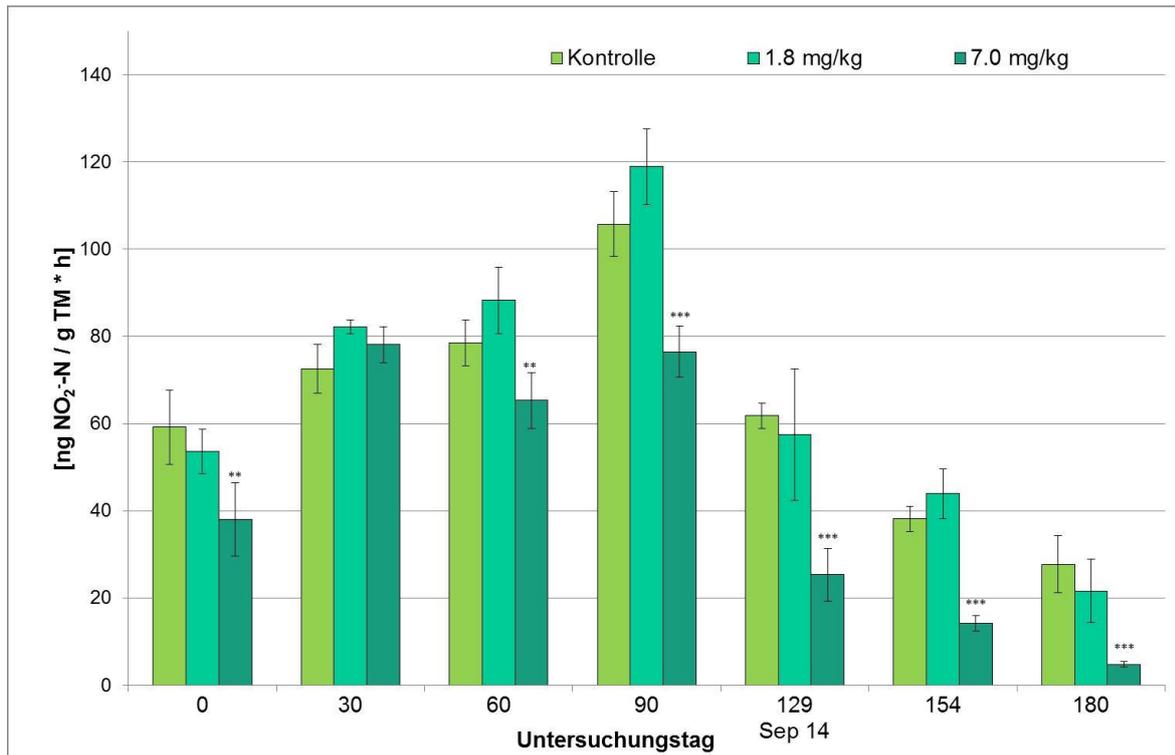


Abbildung 39: Freilandlysimeterversuch – Nitritproduktion der im Labor inkubierten Böden in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)

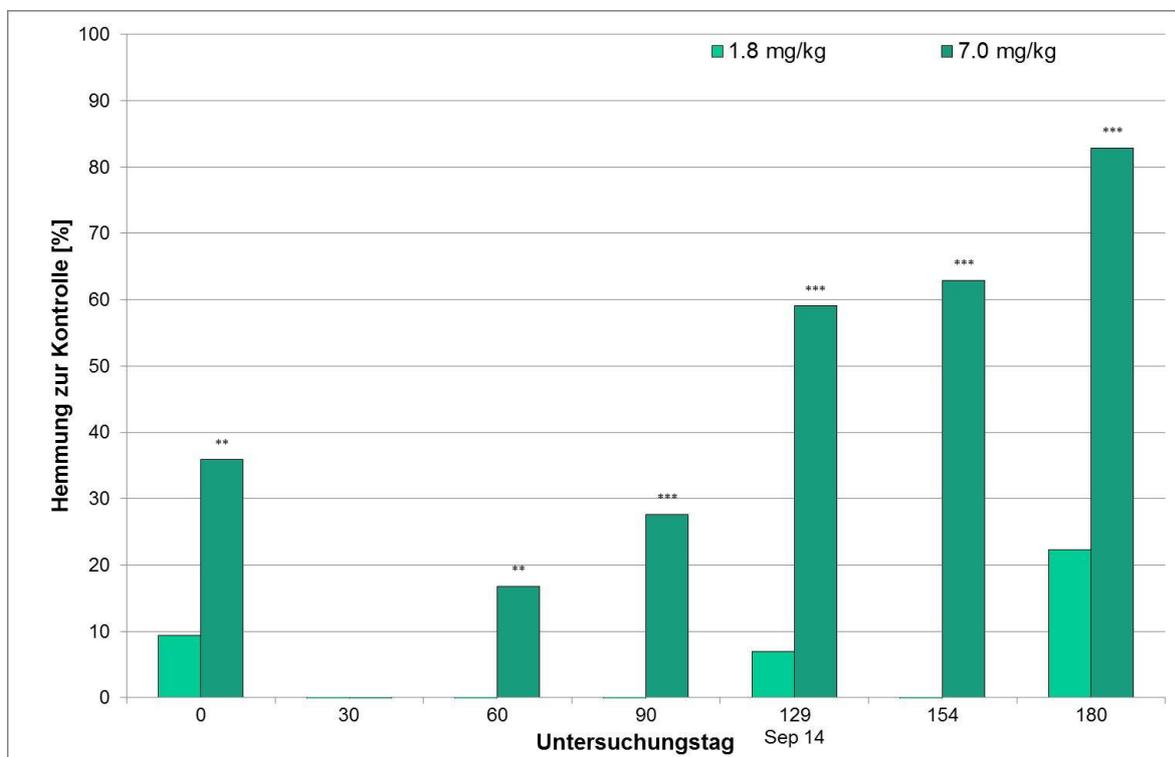


Abbildung 40: Freilandlysimeterversuch – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle der im Labor inkubierten Böden. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001))

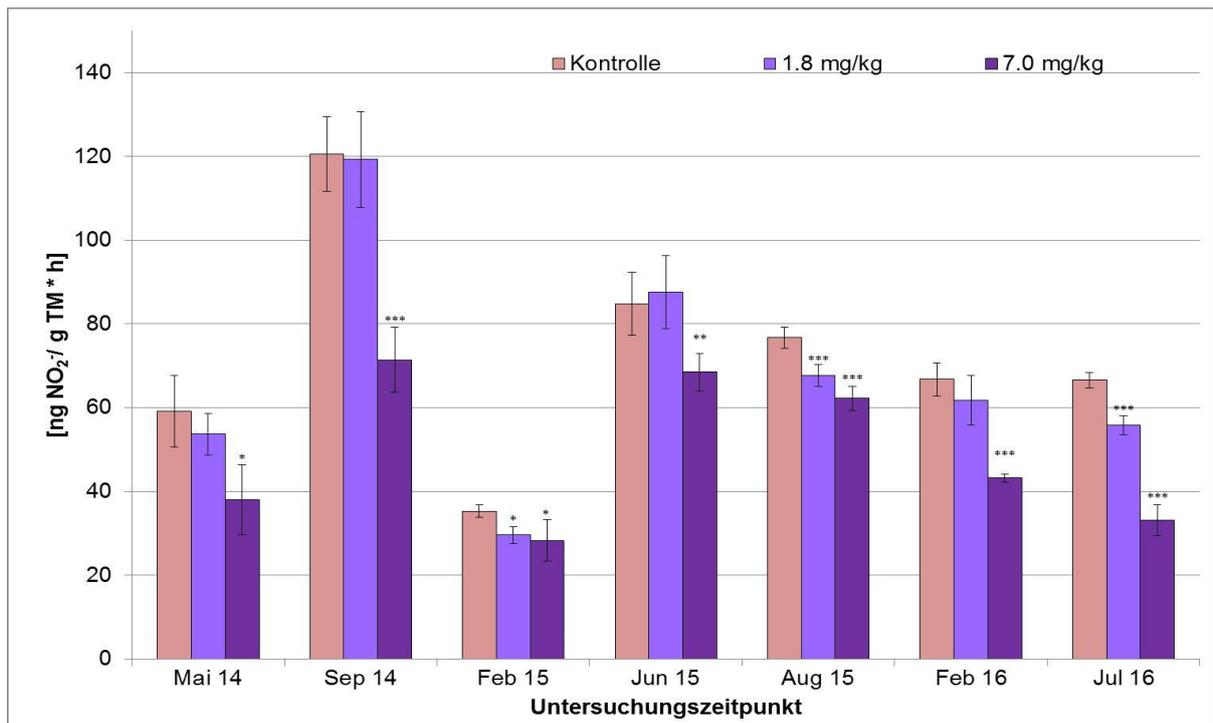


Abbildung 41: Freilandlysimeterversuch – Nitritproduktion der im Freiland inkubierten Böden in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)

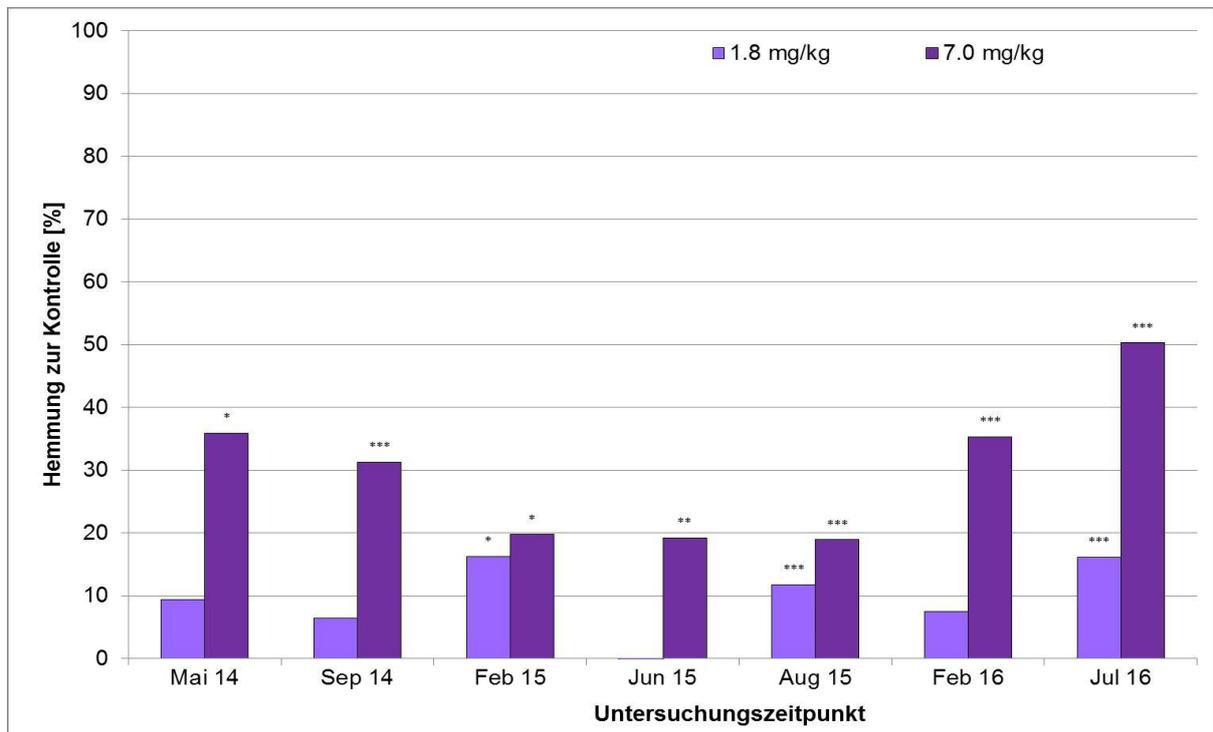


Abbildung 42: Freilandlysimeterversuch – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle der im Freiland inkubierten Böden. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001))

Aktivität der Kontrolle zwischen 85 ng NO₂⁻-N/gTM*h und 63 ng NO₂⁻-N/gTM*h. Die AgNM-Behandlungen wiesen über die gesamte Versuchsdauer etwas geringere Werte als die Kontrolle auf. Insbesondere die Nitrifikation in der 1,8 mg Ag/kg Behandlung glich der Kontrolle, die 7,0 mg Ag/kg Behandlung war etwas inaktiver. Aus den Aktivitätswerten berechnete Hemmungen zeigten für die 1,8 mg Ag/kg-Behandlung über den gesamten Zeitraum Werte von unter 15 %, die nur im Februar 2015 und August 2015 statistisch signifikant waren. Signifikante Hemmungen traten bei der 7,0 mg Ag/kg-Behandlung über den gesamten Untersuchungszeitraum auf. Die Hemmungen sanken von 36 % zu Testbeginn auf 19 % über das gesamte Jahr 2015 und stiegen zum Testende im Juli 2016 auf 50 % an.

5.7.2. Substratinduzierte Respiration

Die substratinduzierte Bodenatmung der im Labor inkubierten Böden ist in der Abbildung 43 dargestellt, die der in Freilandlysimetern inkubierten Böden in der Abbildung 45. Die berechneten Hemmungen im Vergleich zur Kontrolle der im Labor inkubierten Böden sind der Abbildung 44 zu entnehmen, die der Böden der Freilandlysimeter der Abbildung 46. Die Kontrolle (Startwert für Labor- und Freilandteil der Studie) veratmete an Tag 0 im Mai 2014 0,8 mg O₂/(100 g TM * h⁻¹). Im Laborteil des Versuchs nahm die Atmungsrate der Kontrolle kontinuierlich auf 0,4 mg O₂/(100 g TM * h⁻¹) nach 154 Tagen ab und stagnierte bis zum Testende nach 180 Tagen in diesem Bereich. Beide AgNM-Behandlungen hatten an den einzelnen Untersuchungstagen eine ähnliche Aktivität wie die Kontrolle. Ab Tag 60 nahm die Aktivität der 7,0 mg Ag/kg-Behandlung stärker ab und lag nach 180 Tagen bei unter 0,3 mg O₂/(100 g TM * h⁻¹). An Tag 60 war die Aktivität der 7,0 mg Ag/kg-Behandlung gegenüber der Kontrolle 10 % gehemmt (statistisch signifikant), die Hemmung stieg danach auf 30 % an Tag 180 an.

Die im Freiland inkubierten Böden zeigten höhere Atmungsraten als die im Labor inkubierten Böden. Die Atmungsrate der Kontrolle im Freiland schwankte zwischen 0,8 mg O₂/(100 g TM * h⁻¹) (Juni 2015) und 1,0 mg O₂/(100 g TM * h⁻¹) (September 2014). Im Juli 2016 war die Atmungsrate mit 0,6 mg O₂/(100 g dm * h⁻¹) sehr niedrig. Die AgNM-Behandlungen wiesen in der 1,8 mg Ag/kg-Behandlung ähnliche Atmungsraten wie die der Kontrolle auf, die 7,0 mg Ag/kg-Behandlung veratmete über den gesamten Zeitraum weniger O₂ als die Kontrolle.

Die 1,8 mg Ag/kg-Behandlung war nur im Februar 2015 und im August 2015 statistisch signifikant gehemmt, die 7,0 mg Ag/kg-Behandlung war über den gesamten Verlauf gegenüber der Kontrolle zwischen 10 % und 25 % gehemmt. Die Hemmung der 7,0 mg Ag/kg-Behandlung fiel gegenüber der Kontrolle mit 65 % im Februar 2015 außergewöhnlich stark aus.

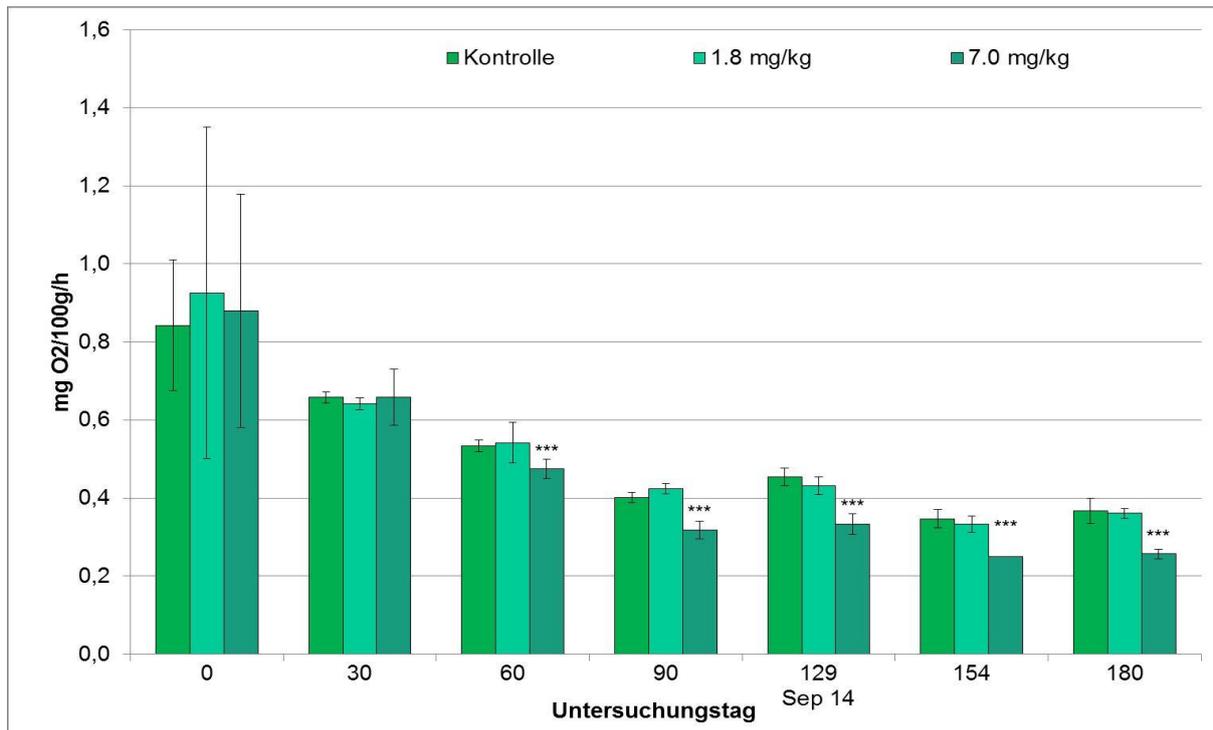


Abbildung 43: Freilandlysimeterversuch – Substratinduzierte Respiration der im Labor inkubierten Böden in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), Fehlerbalken = \pm Standardabweichung)

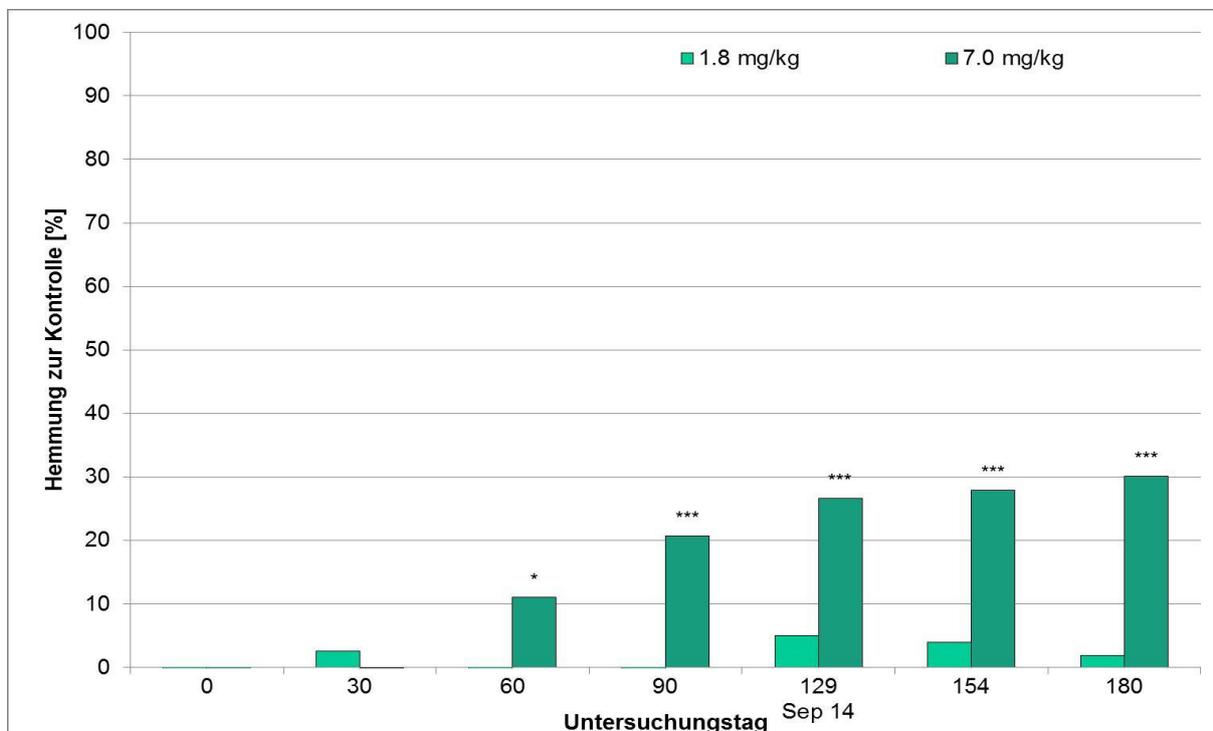


Abbildung 44: Freilandlysimeterversuch – Hemmung der Substratinduzierten Respiration durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle der im Freiland inkubierten Böden. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$))

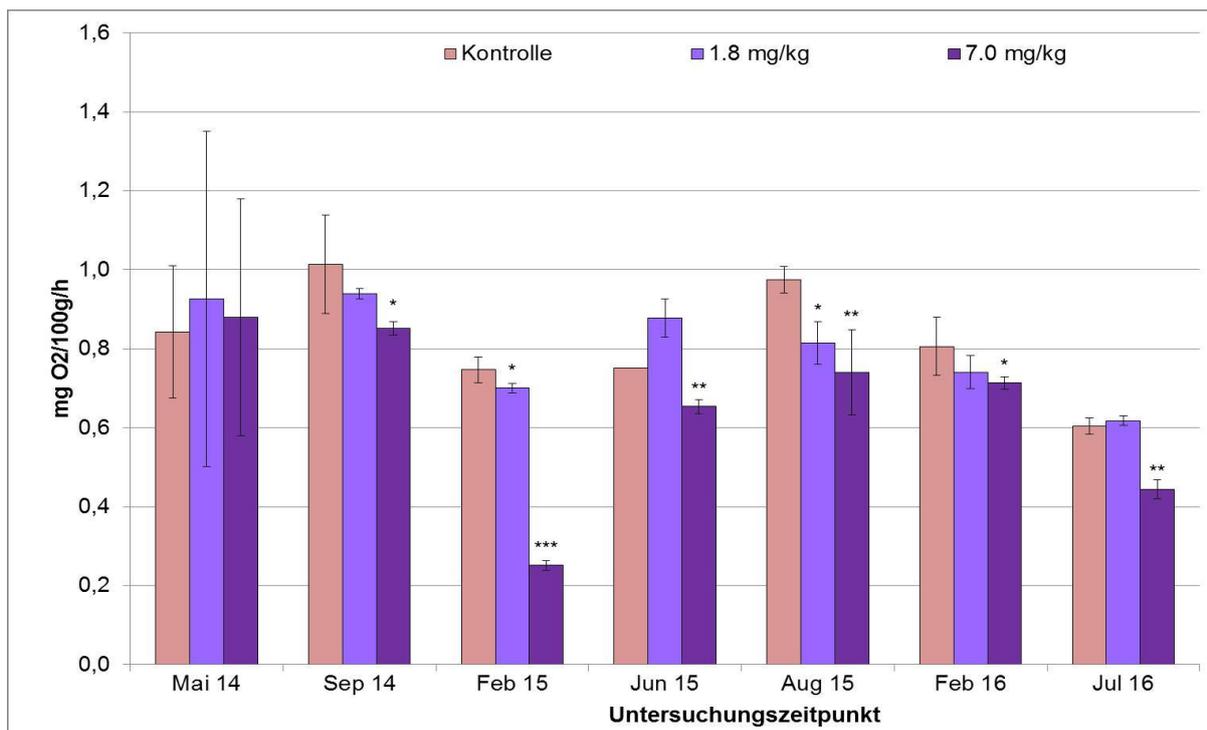


Abbildung 45: Freilandlysimeterversuch – Substratinduzierte Respiration der im Freiland inkubierten Böden in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)

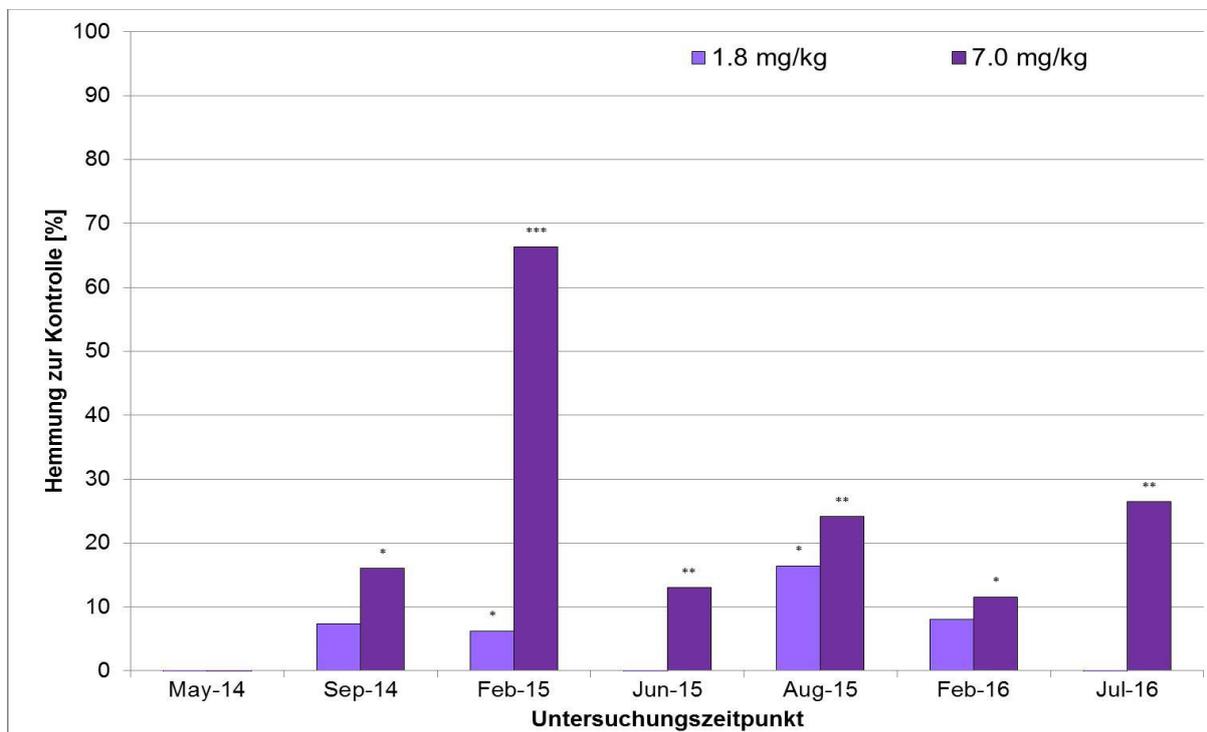


Abbildung 46: Freilandlysimeterversuch – Hemmung der Substratinduzierten Respiration durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle der im Freiland inkubierten Böden. (Student’s T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001))

5.7.3. Regenwurmreproduktion und Regenwurmflechttest

In den inkubierten Böden der Freilandlysimeter wurden 22 Monate nach Testansatz sowohl ein Regenwurmflechttest als auch ein Regenwurmreproduktionstest durchgeführt. Der Regenwurmflechttest zeigte, dass die AgNM von den eingesetzten Würmern nicht gemieden wurde, in allen Testkonzentrationen war die Verteilung der Würmer zwischen der Kontrolle und der jeweiligen AgNM-Behandlung ausgeglichen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Regenwurmvermeidungstest - Anzahl Regenwürmer nach 48 Stunden.

	Kontrolle vs. Kontrolle		Kontrolle vs. 1,8mg/kg		Kontrolle vs. 7,0mg/kg	
Mittelwert n=5	4.6	5.2	5.4	4.6	5.4	4.6
SD	1.4	1.0	2.4	2.4	2.2	2.2
[%]	46	52	54	46	54	46
Signifikanz[#]			-		-	

[#]t-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

Der Regenwurmreproduktionstest zeigte ebenfalls keinen Einfluss des NM-300K auf die Reproduktion der Würmer. Gegenüber der Kontrolle mit 167 Jungtieren war die Jungtierzahl in der 1,8 mg Ag/kg-Behandlung leicht erhöht (203 Jungtiere), in der 7,0 mg Ag/kg-Behandlung waren weniger Jungtiere (150). Die Unterschiede der Jungtierzahlen zwischen den AgNM-Behandlungen zur Kontrolle waren nicht signifikant (Tabelle 18).

Tabelle 18: Regenwurmreproduktionstest - Anzahl der juvenilen Regenwürmer nach 56 Tagen.

	Kontrolle	1,8mg/kg	7,0mg/kg
Mittelwert	167 (n=8)	203 (n=4)	150 (n=4)
SD	18,7	18,7	11,4
[%]	11,2	9,2	7,6
Signifikanz[#]		-	-

[#]t-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)

5.7.4. Pflanzenbewuchs auf den Lysimetern und Pflanzentest nach OECD Richtlinie 208

Der Pflanzenbewuchs auf den Lysimetern diente primär zur Bewirtschaftung der Böden nach landwirtschaftlicher Praxis, zur Speicherung und Wiederfreigabe von Nährstoffen der Böden und damit zum Erhalt der Mikroflora sowie zur Bestimmung der AgNM-Aufnahme in die Pflanze. Der Pflanzenbewuchs auf den Lysimetern war stark durch Umwelteinflüsse (Wind, Schnee, Vogel- und Mäusefraß) beeinträchtigt.

Tabelle 19: Pflanzenbiomasse in g FM nach Ernte der Freilandlysimeter.

Frucht	Kontrolle	1,8mg/kg	7,0mg/kg
	FM [g]	FM [g]	FM [g]
Sommerweizen Tybalt (Ähren)	1401,1 407,5	1608,3 569,9	1534,9 476,7
Winterraps Treffer	1555,5	1035,0	1034,6
Wintergerste Typee	531	832	865

Die Daten der Biomasseproduktion konnten daher nur als Indiz für mögliche Wachstumsbeeinträchtigungen dienen. Hier zeigte sich bei der ersten Feldfrucht, einem Sommerweizen, Frischmassen um 1500 g in allen Behandlungen, wovon der Anteil der Ähren bei etwa 500 g lag. Die Kontrolle hatte mit 1401 g FM Gesamtmasse und 408 g FM Ähren die geringste Biomasseproduktion, die 1,8 mg Ag/kg-Behandlung zeigte stärkere Biomasseproduktion als die 7,0 mg Ag/kg-Behandlung (Tabelle 19). Der Aufwuchs des Winterrapses zeigte sich auf den AgNM-Lysimetern mit Werten um 1000 g FM gegenüber 1600 g FM auf dem Kontrolllysimeter um ein Drittel reduziert. Der Aufwuchs der Wintergerste zeigte die entgegengesetzte Tendenz. Die AgNM-Lysimeter hatten einen um etwa ein Drittel gesteigerten Aufwuchs. Allerdings war der Aufwuchs des Kontroll- und des 7,0 mg Ag/kg-Lysimeters durch Schneefäulnis ungleichmäßig (Abbildung 47).



Abbildung 47: Lysimeterversuch mit Wintergerste Typee (von links: Kontrolle; 1,8 mg Ag/kg; 7,0 mg Ag/kg) im Juli 2016. Die Kontrolle und die 7,0 mg Ag/kg-Behandlung zeigen ungleichmäßigen Bewuchs aufgrund von Schneefäulnis.

Die Ergebnisse zum Pflanzenwachstum auf den Lysimetern wurden in Laborversuchen überprüft. Die Keimung und das Überleben der drei Feldfrüchte nach 14 Tagen und die daraus berechneten Hemmungen sind in der Abbildung 48 a, b dargestellt. Die Pflanzenbiomasseproduktion über 14 Tage nach Keimung und die berechneten Hemmungen gegenüber der Kontrolle sind in Abbildung 48 c, d abgebildet. Die drei getesteten Feldfrüchte zeigten eine unterschiedliche Keimungs- bzw. Überlebensrate nach 14 Tagen. Die Wintergerste Typee keimte fast vollständig in allen Behandlungen (fünf von fünf Pflanzen). Der Sommerweizen zeigt in allen Behandlungen eine geringfügig niedrigere Keimung von 4,5 von 5 Pflanzen. Der Winterraps Treffer keimt mit vier von fünf eingesetzten Samen in der Kontrolle und der 1,8 mg Ag/kg-Behandlung, die 7,0 mg Ag/kg-Behandlung zeigte mit unter drei Pflanzen pro Topf eine um über 30 % gehemmte Überlebensrate gegenüber der Kontrolle.

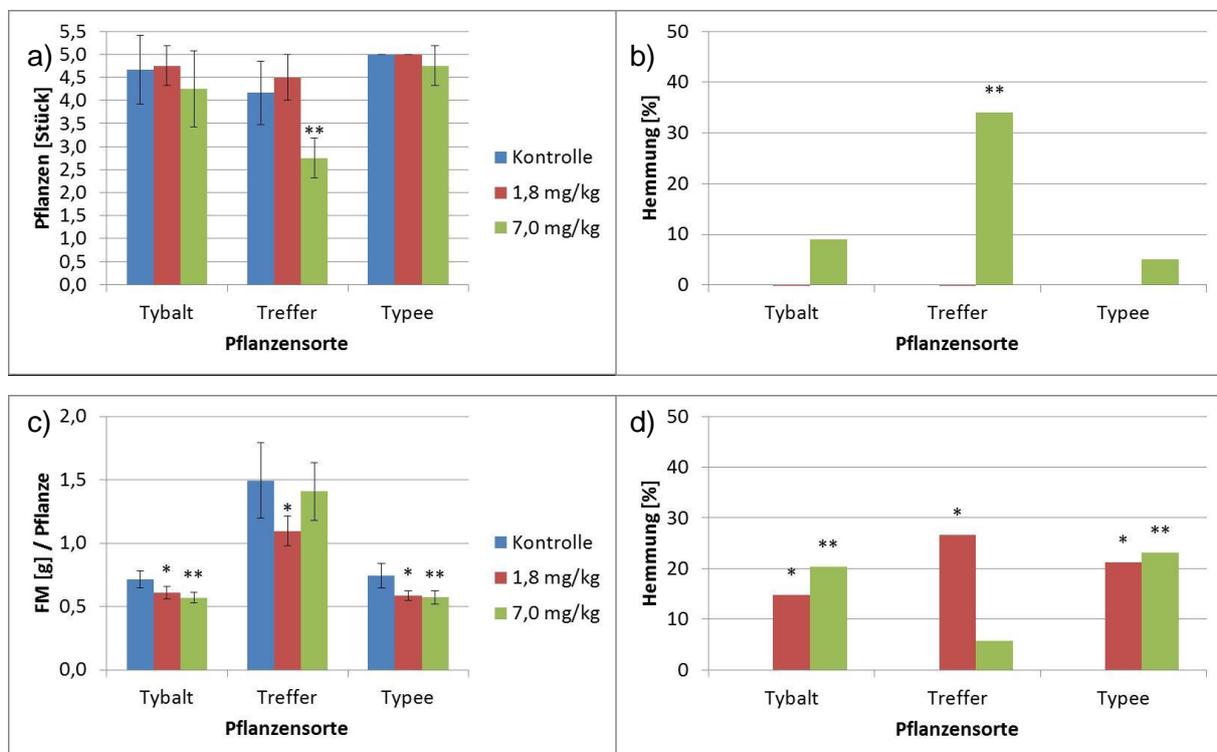


Abbildung 48: a) Pflanzenkeimung und b) Hemmung der Pflanzenkeimung nach 14 Tagen Wachstum in Böden aus Freilandlysimetern. c) Pflanzenbiomasse und d) Hemmung der Pflanzenbiomasse der aufgelaufenen Pflanzen (MW [g FM] / Anzahl aufgelaufener Pflanzen) nach 14 Tagen Wachstum in Böden aus Freilandlysimetern. Tybalt = Sommerweizen; Treffer = Winterraps; Typee = Wintergerste. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), Fehlerbalken = \pm Standardabweichung)

Die Individualgewichte der aufgelaufenen Pflanzen zeigten ein anderes Ergebnis als die Keim- bzw. Überlebensraten. Der Sommerweizen Tybalt nahm konzentrationsabhängig von 0,72 g FM auf 0,57 g FM ab und war 15 % in der 1,8 mg Ag/kg-Behandlung und 20 % in der 7,0 mg Ag/kg-Behandlung gehemmt (statistisch signifikant). Der Winterraps Treffer hatte in der Kontrolle und der höchsten Testkonzentration mittlere Gewichte von 1,50 g FM bzw.

1,40 g FM. Die niedrigere Konzentration lag bei einem Individualgewicht von nur 1,10 g FM und war damit signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (26 % Hemmung). Die Pflanzenfrischmassen der Wintergerste Typee nahmen konzentrationsabhängig von 0,75 g FM auf 0,57 g FM ab. Die resultierenden Unterschiede zur Kontrolle waren signifikant und betragen 21 % in der 1,8 mg Ag/kg-Behandlung und 23 % in der 7,0 mg Ag/kg-Behandlung.

5.7.5. Aufnahme und Verteilung von AgNM in der Pflanze

Nach der Ernte des Sommerweizens und des Winterrapses wurden die Ag-Gehalte nach HNO₃-Extraktion in den einzelnen Pflanzenkompartimenten (Wurzel, Spross, Frucht) bestimmt (Abbildung 49). Die Silbergehalte in den Körnern des Sommerweizens und den Körnern, Schoten und Sprosse des Winterrapses lagen mit Werten um 30 µg Ag/kg TM in allen Lysimetern gleichermaßen vor. Die Sprosse des Weizens wiesen konzentrationsabhängig einen leicht erhöhten Ag-Gehalt (50 µg Ag/kg TM und 90 µg Ag/kg TM) gegenüber der Kontrolle (30 µg Ag/kg TM) auf. Die gewaschenen Wurzeln der Pflanzen hatten in beiden Konzentrationen einen erhöhten Ag-Gehalt gegenüber der Kontrolle. Die Ag-Anreicherung in den Wurzeln lag bei beiden Pflanzen in einem ähnlichen Bereich, sowohl in dem 1,8 mg Ag/kg-Lysimeter (2603 µg Ag/kg (Sommerweizen); 3396 µg Ag/kg (Winterraps)) als auch in dem 7,0 mg Ag/kg-Lysimeter (10879 µg Ag/kg (Sommerweizen); 8611 µg Ag/kg (Winterraps)).

Erste nicht validierte Messungen der Ag-Gehalte in den Pflanzenproben der Wintergerste bestätigten den Trend der Aufnahme und Verteilung des Silbers in der Pflanze. Die Silbergehalte in den Wurzeln der Pflanzen aus den kontaminierten Lysimetern waren gegenüber denen aus dem Kontrolllysimeter deutlich erhöht. In den Sprossen und Körnern war der Unterschied im Silbergehalt zwischen der Kontrolle und den Pflanzen aus den kontaminierten Lysimetern nur marginal (Daten aus nicht validierter, vorläufiger Messung; nicht dargestellt).

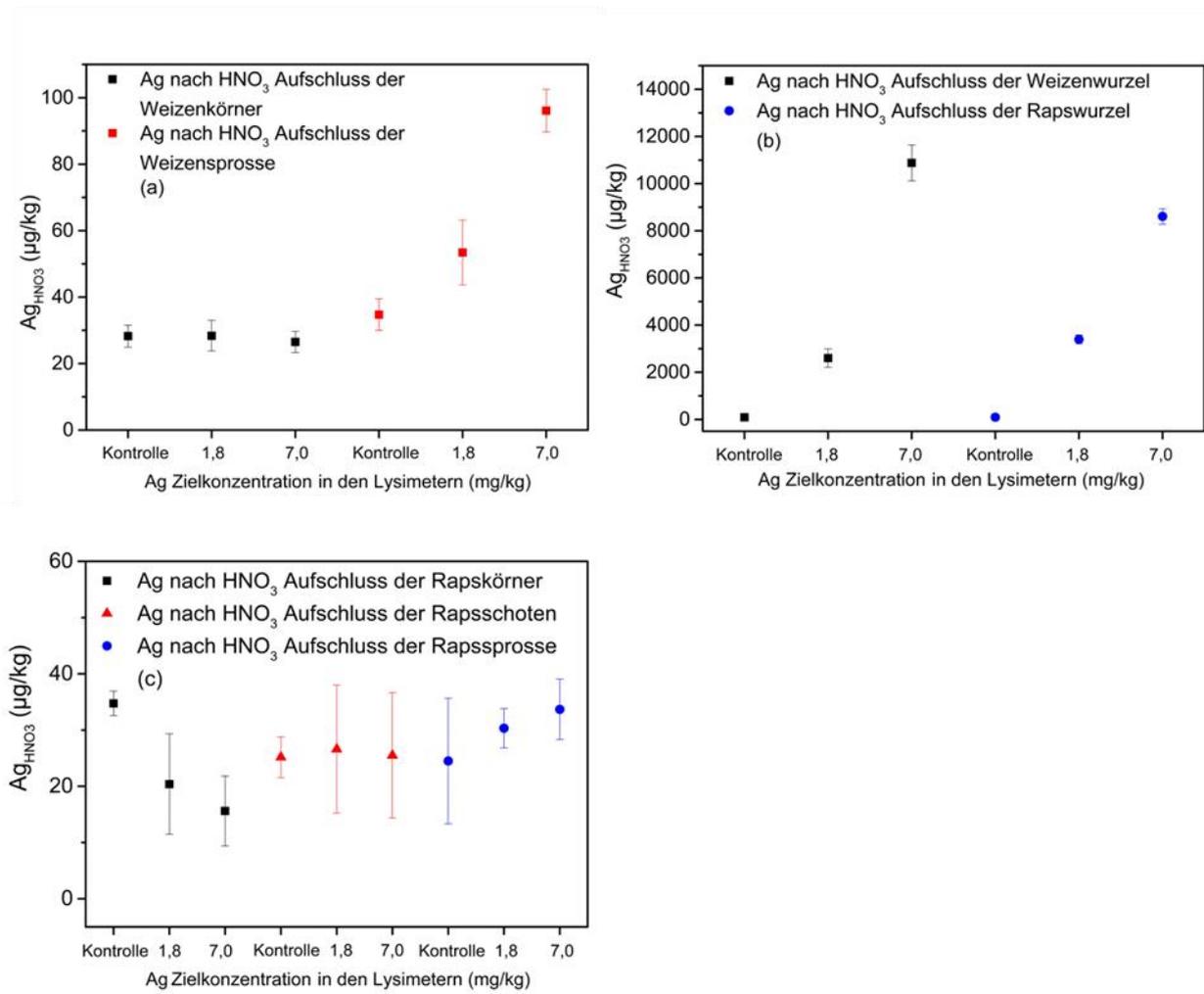


Abbildung 49: Silbergesamtgehalte nach HNO_3 -Aufschluss (Ag_{HNO_3}) in A: Körner und Spross des Sommerweizens (Ernte 16.09.2014); B: Wurzeln vom Sommerweizen (Ernte 16.09.2014) und Winterraps (Ernte 27.07.2016); C: Körner, Schoten und Spross des Winterrapses (Ernte 27.07.2016). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei Replikate.

6. Diskussion

6.1. Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der Laborkläranlagen

Die Charakterisierung des reinen NM-300Ks wurde exemplarisch einmal durchgeführt (Kapitel 5.4.2.3). Die Eigenschaften des NM-300Ks entsprachen überwiegend den Charakteristika, wie sie von Klein et al. (2011) beschrieben wurden. Daher ist davon auszugehen, dass das Material rein und unverändert war. Die generierten Daten sind somit mit anderen Datensätzen zu dem gleichen AgNM vergleichbar. Die unterschiedlichen ermittelten Größen im TEM (4- 5 nm, 14) und DLS (62 nm) sind auf methodologische Unterschiede und den bestimmten Parameter zurückzuführen. Die Auswertung der TEM-Bilder bezieht sich auf den Durchmesser der reinen Partikel, die Messwerte des DLS beziehen sich auf den hydrodynamischen Durchmesser, der durch Makromoleküle im Dispersanten (8 % w/w), Hydrathüllen der Partikel, sowie Agglomerate beeinflusst wird, was sich zusätzlich in der Polydispersität (PDI 0,511) widerspiegelt.

6.1.1. Einfluss der AgNM auf die Abbauleistung in der Kläranlage und deren struktureller Diversität

Der Betrieb der Laborkläranlagen diente primär der Produktion von Klärschlamm, der mit AgNM beaufschlagt war. Die Wahl der Zulaufkonzentrationen richtete sich nach den Zielgehalten in Böden, bei denen Effekte auf die Bodenmikroflora erwartet wurden. Die Abbau- und Stoffumsatzfunktion der Laborkläranlagen wiesen keine Beeinflussung durch die getesteten NM-300K-Konzentrationen bis zu 1 mg Ag/L auf. Dass bei dieser kontinuierlichen Einlaufkonzentration keine Effekte auf die Stoffumsätze zu erwarten waren, wurde bereits in diversen Studien gezeigt (z.B. Schlich, 2013, Burkhardt et al., 2010). Die Simulationsversuche von Schlich (2013) mit einem kontinuierlichen Zulauf über 10 Tage zeigten bei einer Einlaufkonzentration von 16 mg Ag/L leichte Effekte auf die DOC-Elimination. Bei einer zweiten Studie mit dem gleichen Testdesign blieben diese Effekte aus (Brüggemann, 2015). Yang et al. (2014) konnten mit ihrer Studie über den Einfluss auf die strukturelle mikrobielle Diversität in Klärschlämmen zeigen, dass eine AgNM-Konzentration von 40 ppm Spezies wie z.B. *Nitrosomonas* oder *Chloroflexi* hemmten, was Auswirkungen auf die Stickstoffbeseitigung und die Flockenstruktur des Schlammes in der Kläranlage haben kann.

Die DGGE-Untersuchungen zeigten in beiden Studien zu jedem Probenahmezeitpunkt die Abundanz von SRB in Klär- und Faulschlämmen, was aufgrund der ubiquitären Anwesenheit von SRB in Abwasserhabitaten (Dar et al., 2007) zu erwarten war. Dennoch schienen die SRB sowohl durch AgNM als auch durch die Sulfatkonzentration des synthetischen

Abwassers beeinflusst zu werden, da sich Unterschiede zwischen den Kontrollen und den AgNM-Behandlungen, sowie zwischen den beiden Sulfatkonzentrationen zeigten. Jedoch wiesen diese Unterschiede keinen Trend in Bezug auf eine reduzierte Bandenzahl auf, da im Gegenzug neue DNA-Banden erschienen. Vielmehr deuteten die Unterschiede auf eine unterschiedliche Entwicklung der Klärschlämme hin, da sich die DNA-Banden an unterschiedlichen Positionen befanden. Obwohl es sich bei Testbeginn um den gleichen Klärschlamm handelte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich dieser aufgrund der heterogenen Matrix unterschiedlich entwickelte. Das Auftreten neuer Banden und damit neuer SRB-Gruppen ist durch das Wachstum von Gruppen zu erklären, die in den vorhergegangenen Untersuchungen unterhalb der Nachweisgrenze von 1 % Anteil DNA lagen. Die Beobachtung, dass neue DNA-Banden auftraten, war in der zweiten Studie mit nur einer Sulfatstufe und mehreren Testgegenständen, sowohl bei den SRB, als auch bei den gesamten Bakterien weniger ausgeprägt.

Auch wenn die Methode aufgrund ihrer geringen Sensitivität keine Effekte auf SRB oder gesamten Bakterien im Klär- und Faulschlamm herausstellte, ist es sehr unwahrscheinlich, dass keine mikrobiellen Konsortien durch AgNM beeinflusst werden. Yang et al. (2014) entdeckten stärkere Effekte auf Mikroorganismen im Klärschlamm, die durch AgNM hervorgerufen wurden als durch Ag^+ . Diese Effekte erklärten sie damit, dass die AgNM direkt an die Zellmembran gelangen und lokal hohe Ag^+ -Konzentrationen erzeugen können. Freie Ag^+ Ionen werden hingegen schnell von organischer Substanz oder anorganischen Liganden abgefangen (Xiu et al., 2011). Für AgNM mit Größen zwischen 1 nm und 10 nm wurde nachgewiesen, dass sie die Zellmembran passieren können und in das Innere der Zelle gelangen, wo sie unmittelbar Zellschäden hervorrufen (Morones et al., 2005).

Trotz ihrer antimikrobiellen Eigenschaften und der hohen Silberkonzentrationen im Kläranlageneinlauf wurde die DNA von SRB in drei Studien mit zwei unterschiedlichen Methoden (PCR und DGGE) detektiert. Die Detektion über RNA, die ein Parameter für aktive Bakterien ist, war für die SRB aus unersichtlichen Gründen nicht möglich. Bei der Recherche fand sich zudem keine Studie, bei der SRB über RNA nachgewiesen wurden. Der reine Nachweis von SRB-DNA lässt grundsätzlich nicht auf die Aktivität der Organismen schließen, jedoch deutete das Erscheinen von neuen Banden auf das Wachstum von neuen Populationen und somit ihrer Aktivität hin. Darüber hinaus ist die Stabilität von DNA in Abwasserhabitaten durch die hohe DNase-Aktivität zeitlich sehr begrenzt. Eine hohe DNase-Aktivität wies beispielsweise Piterina et al. (2010) in dem Wasser eines autothermen, thermophilen aerob stabilisierten Klärschlammes nach. Die konstante Anwesenheit von SRB-DNA zu allen Untersuchungszeitpunkten spricht somit für die Aktivität der Organismen, andernfalls würde die DNA schnell abgebaut. Die Anwesenheit und Aktivität von SRB, die Schwefel reduzieren (Blume et al., 2010) und dadurch in Abhängigkeit des pH-Wertes H_2S ,

HS⁻ oder S²⁻ (Blume et al., 2010, Morel and Hering, 1993) entsteht, ermöglichen somit die Sulfidierung von Ag zu Ag₂S.

6.2. Einfluss von verschiedenen Klärschlammaufbereitungen auf die Bioverfügbarkeit von AgNM

Effekte auf die Nitrifikation in Böden wurden durch die potentielle Ammoniumoxidation nachgewiesen. Hier zeigte sich in den ersten beiden Langzeitversuchen, die alle vier Klärschlammaufbereitungen mit mindestens einer Variante umfassten, ein ähnliches Bild. Die Aktivitäten der Nitrifikanten in den Klärschlammkontrollen lagen auf einem ähnlichen Niveau und nahmen über die Versuchsdauer ab, da die Ressourcen der Böden gezehrt wurden. Die gekalkten Ansätze zeigten ein etwas anderes Bild als die übrigen Aufbereitungsvarianten. Gegen Testende waren aufgrund der höheren pH-Werte die Aktivitäten des gesamten gekalkten Ansatzes (Kontrollen und AgNM-Behandlungen) gegenüber den anderen Behandlungen gesteigert. Obwohl im ersten Langzeitversuch keine Effekte bei der Kalkbehandlung auftraten, führte im zweiten Langzeitversuch auch die niedrigere AgNM-Behandlung zu einer Hemmung. Die gegenüber den anderen Behandlungen reduzierten Effekte werden offenbar durch die höheren pH-Werte und das freie Ca²⁺ bedingt. Die höheren und über die Testdauer stabileren pH-Werte begünstigen die Mikroorganismen, deren pH-Optimum bei pH 5,5 bis pH 8 (Blume et al., 2010) liegt. Die niedrigen, ungünstigen pH-Werte entfallen so als zweiter Stressor, was das Ausmaß der Effekte reduziert. Außerdem steht das eingebrachte, freiwerdende Ca²⁺ als Reaktionspartner für die Ag⁺-Ionen zur Verfügung. Bereits in millimolaren Konzentrationen führen Ca²⁺-Ionen zur Agglomeration der AgNM (Piccapietra et al., 2012, Badawy et al., 2010), was die Verfügbarkeit reduziert.

Dass die Effekte der weiteren Aufbereitungsvarianten mit Studienverlauf zunahmen, spricht dafür, dass die Bioverfügbarkeit der AgNM zunächst eingeschränkt ist, dann aber, über die Versuchsdauer von 140 bzw. 196 Tagen, der Bodengehalt an Ag⁺-Ionen ansteigt. Bereits in der Dissertation von Schlich (2013) zeigte sich, dass die Effekte von über unbehandelten Klärschlamm eingetragenen AgNM (NM-300K) über die Zeit von 140 Tagen zunahmen. Nach 140 Tagen Inkubation entsprachen die Hemmungen denen von reinem NM-300K, das direkt in die Böden eingebracht wurde, nach 28 Tagen. In der vorliegenden Studie mit direkt, ohne über den Klärschlamm pfad eingebrachten Testgegenständen bestätigten sich die schnell auftretenden deutlichen Hemmungen. Da sich bei der Arbeit von Schlich (2013) bereits reduzierte Effekte nach der Faulung von Klärschlamm andeuteten, wurden besonders in den gefaulten Varianten im Vorfeld geringere Effekte erwartet, da von einer Sulfidierung der AgNM zu Ag₂S unter anaeroben Bedingungen ausgegangen wurde. Aufgrund der extrem geringen Löslichkeit von Ag₂S in Wasser von $6,2 \cdot 10^{-15}$ g/L (20 °C) sollte die Toxizität

gegenüber AgNM reduziert sein. Laut Kaegi et al. (2011) sulfidieren 90 % der AgNM unter anaeroben Bedingungen im Denitrifikationsbecken in weniger als zwei Stunden bei einer Konzentration von 0,5 mg Ag/L. Die 25 bzw. 35 Tage Faulung unter anoxischen Bedingungen und die nachgewiesene Anwesenheit von SRB sollten somit ausgereicht haben die AgNM vollständig zu sulfidieren.

Die funktionelle Diversität in Böden wurde neben der potentiellen Ammoniumoxidation in dem ersten Langzeitversuch mittels zweier Verfahren untersucht. Zum einen wurde mit fluorogenen Substraten gearbeitet, zum anderen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, die veratmet werden. Beide Verfahren zeigten bei den gewählten Konzentrationen keine konsistenten, signifikanten Effekte über die Versuchsdauer. Die verschiedenen fluorogenen Substrate wurden unabhängig von der Behandlung unterschiedlich stark abgebaut, was auf die spezifischen Abbauraten der unterschiedlichen mikrobiellen Konsortien in Böden zurückzuführen ist. Die Respiration der Kohlenstoffquellen lieferte ebenfalls keine eindeutigen Daten. Aufgrund der hohen Standardabweichungen und den nicht über den zeitlichen Testverlauf konsistenten Hemmungen müssen die aufgetretenen Effekte auf dieser Datenbasis als natürliche Variabilität bezeichnet werden. Für die gewählte Testkonzentration zeigten sich die beiden Verfahren als nicht sensitiv genug und wurden daher nicht mehr in den darauf folgenden Studien angewendet.

Als möglicher Grund für die aufgetretenen Effekte bei der potentiellen Ammoniumoxidation in allen AgNM-Behandlungen, unabhängig von der Klärschlammaufbereitungsvariante, wurde eine zu geringe, verfügbare Menge reduzierter Schwefelspezies in Erwägung gezogen. Über das reguläre synthetische Abwasser wurde mit 13 mg S/L nur etwa die Hälfte der Menge an Sulfat eingetragen wie es in Haushaltsabwasser der Stadt Schmallingenberg exemplarisch gemessen wurde (26 mg S/L im Zulauf der Kläranlage Schmallingenberg). Dieser Hypothese wurde in den drei Sulfatversuchen nachgegangen, bei denen neben einem ökotoxikologisch relevanten AgNM-Gehalt, der über Beaufschlagung des Klärschlammes in den Batchversuchen bzw. 1 mg Ag/L im Kläranlageneinlauf erzielt wurde, unterschiedliche Sulfatkonzentrationen zugegeben wurden.

6.3. Einfluss der verfügbaren Sulfatmenge auf die Bioverfügbarkeit von AgNM

Für die Sulfidierung von AgNM zu Ag_2S in der Umwelt werden ausreichende Mengen reduzierbaren Schwefels und die Anwesenheit von SRB benötigt, die den Schwefel reduzieren (Blume et al., 2010), wobei H_2S , HS^- oder S^{2-} entstehen (Blume et al., 2010, Morel and Hering, 1993). In Abwassersystemen (Kaegi et al., 2013) und Pilotkläranlagen (Ma et al., 2014, Kaegi et al., 2011) wurde die Sulfidierung von AgNM bereits nachgewiesen. In einer echten kommunalen Kläranlage mit hohen Silberkonzentrationen im Kläranlagenzulauf wurden Ag_2S -NM gefunden (Kim et al., 2010).

6.3.1. Ag- Bodengehalte und Charakterisierung der AgNM

Auch in der vorliegenden Studie mit einer Kläranlagensimulation zum Einfluss der verfügbaren Schwefelkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM (Kapitel 5.4.2) deuteten die Ergebnisse der TEM-Untersuchungen aller Klärschlämme (mit vs. ohne Sulfatzugabe und Direktapplikation vs. Klärschlammfäulung vs. Kalkung) vor der Einarbeitung in den Boden auf die komplette Sulfidierung der AgNM hin. Die mit EDX untersuchten Partikel hatten Signalintensitäten für die Ag- und S-Signale in einem 2:1-Verhältnis (Ag:S), was die komplette Sulfidierung der Partikel indiziert. In anderen Studien, mit zum Teil sehr aufwändiger Speziierung des Silbers, wurde ebenfalls überwiegend Ag_2S in Klärschlämmen detektiert (Pradas del Real et al., 2016, Ma et al., 2014, Kaegi et al., 2013, Impellitteri et al., 2013, Kaegi et al., 2011). Lombi et al. (2013) zeigten in ihrer Studie zur Transformation von vier Ag- / AgCl-NM während der anaeroben Abwasserbehandlung und der anaeroben Klärschlammbehandlung, dass am Testende alle Materialien, Ag^0 , AgNM und sogar AgCl komplett sulfidiert waren. In der vorliegenden Studie waren die einzelnen Partikel gleichmäßig in den untersuchten Schlämmen verteilt. Es wurden keine größeren Agglomerationen oder Aggregationen beobachtet. Die Partikelgrößen und die Partikelform entsprachen noch in etwa den Größen des reinen NM-300Ks. Das ist ein Zeichen dafür, dass die Partikel unmittelbar, ohne nennenswerten Größenverlust durch die Lösung von Ag^+ sulfidiert wurden. Die direkte Sulfidierung von AgNM wurde von Liu et al. (2011) als der dominante Transformationsprozess bei hohen Sulfidkonzentrationen bestimmt.

Auch die Studie von Kent et al. (2014), in der die Sulfidierung von AgNM in einer kommunalen Kläranlage und in Laborexperimenten betrachtet wurde, wurde die direkte Sulfidierung der Partikel ohne die Lösung von Ag^+ und sekundären Ausfällungen beobachtet. Allerdings zeigte sich in der Studie ein etwas größerer Höhenzuwachs der Partikel, um den Faktor $1,28 \pm 0,01$, gegenüber dem theoretischen Faktor von 1,2 (Chen et al., 2008) für Ag_2S als kristalline Form. Der größere gemessene Höhenzuwachs der Partikel, gegenüber dem theoretischen Zuwachs, deutet auf eine andere Kristallstruktur als die von kristallinem Ag_2S hin.

In den Boden-Klärschlammgemischen veränderte sich die Morphologie der Partikel über 140 Tage Inkubation nicht auffallend. Jedoch wurden neben den Partikeln mit Größen um 15 nm, die zuvor schon in dem reinen Material und auch dem Klärschlamm detektiert wurden, auch eine gesteigerte Anzahl deutlich kleinere Partikel mit Größen um etwa 5 nm und erheblich größere Partikel zwischen 50 und 60 nm detektiert. Diese größeren Partikel wurden zuvor nicht im Klärschlamm beobachtet, allerdings wurden die 5 nm-Partikel in dem untersuchten reinen NM-300K und auch in der Charakterisierung des Materials (Klein et al., 2011) mit TEM detektiert, wenn auch nicht mit dieser subjektiven Häufigkeit. Während der Inkubation müssen sich die größeren Partikel sekundär gebildet haben, da sie vorher nicht beobachtet wurden. Kent et al. (2014) fanden in ihrer Studie nach der Sulfidierung Ag_2S -Partikel, die sie für sekundäre Ausfällungen hielten, allerdings handelte es in dem Fall um kleine Partikel, was die subjektiv empfundene größere Anzahl (die Partikel wurden nicht gezählt) kleiner Partikel unterstützt. Grundsätzlich wird die Stabilität von Ag_2S jedoch als sehr hoch eingestuft. In einer Studie zeigte sich Ag_2S über 6 Monate Kompostierung bzw. Langzeitstabilisierung resistent gegenüber Oxidierung (Lombi et al., 2013), wohingegen andere Metallsulfide wie Zn- oder Cu-Sulfide durchaus ihre Spezierung während der Kompostierung veränderten (Donner et al., 2011).

Auffällig war die in der vorliegenden Studie beobachtete morphologische Veränderung der großen Partikel (+55 nm) unter dem EDX-Strahl ohne dabei die Stöchiometrie zu verändern. Insbesondere diese Partikel schienen amorph zu sein. Auch Kent et al. (2014) konnten mittels dark field TEM amorphe Ag_2S -Strukturen nach einer chemischen Sulfidierung durch Na_2S und mittels high resolution TEM nach der Sulfidierung in der Kläranlage nachweisen. In einer weiteren Studie zur Sulfidierung von AgNM in wässrigen Medien waren über 60 % des gebildeten Ag_2S amorph (Levard et al., 2011). In der Studie von Pradas del Real et al. (2016) mit AgNM, die über Klärschlamm in den Boden eingebracht wurden, zeigte sich, dass ein großer Teil des gebildeten Ag_2S nicht kristallin war, sondern zu einer Ag-thiol und/oder amorphen Ag-S Phase zählte. Dieser Anteil war im Boden nicht konstant, sondern veränderte sich im Boden über die Versuchsdauer nochmals. Die nachträgliche Veränderung des gebildeten Ag_2S deutet darauf hin, dass besonders unter umweltrelevanten Bedingungen in der Kläranlage gebildetes Ag_2S instabil ist.

Donner et al. (2015) untersuchten die Labilität von Ag in 20 verschiedenen Klärschlammproben. Die Proben unterschieden sich hinsichtlich ihres Alters und ihrer Lagerbedingungen. Die in Glasgefäßen archivierten Proben hatten mit 12 bis 30 % einen deutlich größeren Anteil labiler Silberfraktion im Vergleich zu den kompostierten, gelagerten Proben mit 3 bis 6 % labiler Fraktion. Das zeigt, dass der Anteil labilen Silbers mit der Zeit abnimmt, bzw. das Silber gelöst und ausgewaschen wird und der stabile Anteil zurückbleibt.

6.3.2. Effekte der sulfidierten AgNM auf die Bodenmikroflora

Die zwei Batchversuche mit einem angezielten Ag-Bodengehalt und vier unterschiedlichen Sulfatstufen zeigten keine Unterschiede der Bioverfügbarkeit der AgNM für ammoniumoxidierende Bakterien. Sowohl in den gefaulten als auch den direkt applizierten Ansätzen war die Nitrifikation fast komplett gehemmt. Die Ag-Bodengehalte in den Studien ergaben sich durch das Testdesign, das sich mit der gleichbleibenden Klärschlammmenge von 1,67 g/kg TM an dem Expositionsszenario der AbfKlärV (1992) orientierte. Die Ag-Gehalte waren durch den Gehalt im Klärschlamm und somit von der Einlaufkonzentration und Schlammproduktion bei der Kläranlagensimulation, bzw. der Klärschlammrockensubstanz bei der Batchapplikation abhängig. Aufgrund des Abbaus von organischer Substanz während der Faulung und der daraus resultierenden Akkumulation von AgNM sind die Ag-Bodengehalte in den Ansätzen mit Faulschlamm höher und die Hemmungen traten in den ersten Phasen der Studien bereits deutlicher hervor. Die aufgetretenen Hemmungen, sowohl in der aeroben Direktbehandlung als auch der anaeroben, gefaulten Behandlung, ließen sich nicht durch die enorm hohen Sulfatzugaben reduzieren. Als Ursache wurde der fehlende Wechsel zwischen oxischen und anoxischen bzw. anaeroben Verhältnissen bei der Batchapplikation herangezogen, der für die Oxisulfidierung der AgNM oder des Silbers benötigt wird (Liu et al., 2011), da die Abundanz von SRB exemplarisch nachgewiesen wurde. Die zwei Batchversuche dienten als vereinfachte, schnelle alternative Applikationsmethode anstelle der Kläranlagensimulation. Ihr Nachteil ist eine weitere Vereinfachung der umweltrelevanten Prozesse. Daher wurde im Anschluss an die Batchversuche eine Applikation mittels Kläranlagensimulation durchgeführt, die mit erhöhter Relevanz die Prozesse in der Umwelt simuliert, was das Ziel der vorliegenden Dissertation ist.

Für die Studie mit Klärschlämmen, die über die Kläranlagensimulation appliziert wurden, zeigten sich ähnliche Effekte wie in den zwei Versuchen, bei denen im Batch appliziert wurde. Die Daten der potentiellen Ammoniumoxidation in den Kontrollen und den reinen Böden zeigten eine konstante Aktivität und einen stimulierenden Effekt des Klärschlammes, der als Nährstoffquelle für die nährstoffarme Braunerde diente. Die Aktivitäten des gefaulten Ansatzes einschließlich der AgNM-Behandlungen und der Kontrollen waren am ersten Untersuchungszeitpunkt (Tag 60) aus nicht ersichtlichen Gründen gegenüber den Aktivitäten der aeroben Behandlung reduziert. Die Aktivitäten stiegen danach wieder auf ein ähnliches Niveau. Eine geringere Aktivität aufgrund von nicht verfügbaren Nährstoffen, einschließlich Kohlenstoff, erscheint unwahrscheinlich, da die Aktivitäten anschließend wieder anstiegen und dieser Effekt nicht bei den gefaulten Ansätzen aller anderen Langzeitversuche auftrat. Aufgrund der unterschiedlichen Ag-Gehalte in den direkt applizierten Ansätzen (~5 mg Ag/kg TM) und dem Ansatz mit Faulschlamm (~8-9 mg Ag/kg TM) fielen die Hemmungen mit 50%

und 90 % Hemmung unterschiedlich aus. Aufgrund der hohen pH-Werte, der guten Nährstoffzufuhr und des Ca^{2+} als Reaktionspartner waren die Effekte in der zuvor gekalkten Behandlung von Anfang an gering und verschwanden dann komplett. Diese reduzierten bzw. nicht auftretenden Effekte zeigten sich bereits in den ersten zwei Langzeitversuchen, in denen alle vier Aufbereitungsvarianten nebeneinander getestet wurden.

Die Stabilität von Ag_2S wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Obwohl verschiedene Studien eine detoxifizierende Wirkung der Sulfidierung von AgNM zeigen (Levard et al., 2013), die Langzeitstabilität von Ag_2S (Navarro et al., 2014) und den großen Anteil der nicht labilen Fraktion von Ag_2S (Donner et al., 2015) herausstellen, zeigen andere Studien, dass auch sulfidierte AgNM noch toxische Effekte hervorrufen können. Levard et al. (2013) zeigte die reduzierte Toxizität in Kurzzeitstudien auf Zebrafische, Medaka, Nematoden und Wasserlinsen sogar nach einer Teilsulfidierung und der Bildung von „ $\text{Ag}^0/\text{Ag}_2\text{S}$ core/shell“-Partikeln und erklärte die reduzierte Toxizität mit der unlöslichen Ag_2S -Oberfläche der Partikel. Gleichzeitig zweifelte er die Langzeitstabilität besonders kleiner Partikel unter oxidischen Bedingungen wegen ihrer hohen Reaktivität und Oxidationsraten an. Auch die Effekte auf Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) durch nanopartikuläres Ag_2S waren gegenüber den Effekten von AgNM und AgNO_3 deutlich reduziert (Starnes et al., 2015), dennoch traten nach wie vor noch Effekte auf.

In Studien mit terrestrischen Organismen zeigten sich ebenfalls durch sulfidierte AgNM hervorgerufene Effekte. Judy et al. (2015) untersuchten die Effekte von unterschiedlichen Ag-Spezies auf das Wachstum von Tomatenpflanzen, Mykorrhizapilzen und die mikrobielle Struktur in klärschlammbeaufschlagten Böden. Die Ag_2S -NM zeigten sich dabei weniger toxisch auf die drei untersuchten Parameter als Ag^+ und PVP gecoatete AgNM. Obwohl sich bei den Ag_2S -NM keine Dosis-Wirkungsbeziehungen zeigten, war die mikrobielle Biomasse selbst bei niedrigen Bodengehalten von 1 mg Ag/kg TM negativ beeinflusst. Eine weitere Studie mit Ag-Gehalten von 0,14 mg Ag/kg in mit Klärschlamm beaufschlagten Böden zeigte viermal stärkere Effekte von AgNM auf terrestrische Pflanzen und die Bodemikroflora als AgNO_3 (Colman et al., 2013). Beide Studien zeigen, genau wie die vorliegende Studie der Langzeitversuche, einen erheblichen Effekt von sulfidierten AgNM auf terrestrische Organismen, insbesondere Bodenmikroorganismen. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Partikel in der Studie von Judy et al. (2015) im Labor synthetisiert wurden und die Sulfidierung nicht natürlich, während der Abwasser- oder Schlammbehandlung erfolgte und die Versuchs- bzw. Inkubationszeiträume erheblich kürzer waren. In der Studie von Colman et al. (2013) wurden die AgNM bzw. AgNO_3 erst kurz vor der Applikation auf den Boden in den rehydrierten Klärschlamm (Class A Biosolids) gegeben, sodass die Zeit für die Sulfidierung sehr kurz war. Die Speziierung mit EXAFS zeigte nur eine teilweise Sulfidierung der AgNM. Daher sind diese Ergebnisse nicht unmittelbar mit den Ergebnissen der

vorliegenden Promotion mit sulfidiertem NM-300K nach Transformation in der Kläranlage zu vergleichen. Die Inkubationsdauer von 140 Tagen als große Zeitspanne der Ionenfreisetzung mit dem natürlich sulfidierten NM-300K kann als Erklärung für die extremen Effekte auf die potentielle Ammoniumoxidation gegenüber den Effekten der im Labor synthetisierten Ag_2S -Partikeln über kleinere Zeitspannen in der Studie von Judy et al. (2015) herangezogen werden. Die starken Effekte der teilsulfidierten AgNM in der Studie von Colman et al. (2013), die nach wie vor einen erheblichen metallischen Anteil Ag^0 aufweisen und somit größere Mengen Ionen freisetzen können, treten bereits kurzfristig auf. Die zeitnäher auftretenden Effekte von metallischem AgNM zeigten sich ebenfalls bei reinem NM-300K gegenüber AgNM, die nach einer Kläranlagensimulation über zehn Tage über den Klärschlamm in die Böden (Schlich et al., 2013) eingebracht wurden. Pradas del Real et al. (2016) beobachteten ein reduziertes Wurzelwachstum bei monokotylen und dikotylen Pflanzen durch transformierte AgNM (überwiegend Ag_2S und organisch und / oder amorphes Ag_2S) in mit Klärschlamm beaufschlagten Pflanztopfen und die Aufnahme in die Pflanzen. Diese Studien zeigen, dass die Sulfidierung von AgNM die Bioverfügbarkeit nicht vollständig herabsetzt, was die beobachteten Effekte in den vorliegenden Studien, insbesondere den Sulfatstudien, bestätigt.

Schlich et al. (2013) hatten ein ähnliches Studiendesign wie die Studien dieser Promotion. Sie führten Kläranlagensimulationen mit NM-300K gefolgt von einer Langzeitinkubation mit Bodengehalten von bis zu 9 mg Ag/kg TM durch. Sie untersuchten mit der potentiellen Ammoniumoxidation die Effekte von NM-300K nach der Kläranlagensimulation und verglichen sie mit den Effekten von reinem unmittelbar in Böden eingebrachtem NM-300K. Die AgNM wurden über entwässerten, nicht weiter aufbereiteten Klärschlamm in die Böden eingebracht (Direktapplikation) und zeigten nach 140 Tagen bei einem Ag-Bodengehalt von 5,2 mg Ag/kg fast eine vollständige Hemmung der Nitrifikation. Sie berechneten eine EC_{10} (Konzentration mit 10 % Effekt) von 1,4 mg Ag/kg TM für reines NM-300K nach 28 Tagen Inkubation in Böden, was in einer zweiten Studie bestätigt wurde (Hund-Rinke and Schlich, 2014) und ungefähr in dem gleichen Bereich liegt wie die EC_{10} von AgNO_3 in einem Arenosol auf Grundlage von OECD-Nitrifikationsstudien (Langdon et al., 2014). Der Vergleich der Hemmungen der Versuche mit reinem NM-300K und mit über Klärschlamm appliziertem NM-300K stellte die gleichermaßen ausgeprägten Hemmungen heraus. Allerdings stiegen die Effekte der über Klärschlamm applizierten AgNM nach einer längeren Inkubationszeit von 140 Tagen an (Schlich et al., 2013), wohingegen die Effekte von reinem NM-300K kurzfristig auftraten. Auch in der im Rahmen dieser Promotion durchgeführten Studie mit unmittelbar (ohne vorherige Kläranlagensimulation) in Böden eingebrachten Testgegenständen zeigten sich die Effekte durch NM-300K bereits kurzfristig, nach 28 Tagen Inkubation und nicht wie in den anderen Studien mit vorhergegangener Kläranlagensimulation mit über 140 Tagen

langsam zunehmender Hemmung. Unter der Annahme, dass die aufgetretenen Effekte von AgNM auf Bodenmikroorganismen überwiegend auf Ag⁺-Ionen basieren, zeigen die Ergebnisse von Schlich et al. (2013) und die Ergebnisse der rein applizierten Partikeln in der Studie dieser Promotion kurzfristig auftretende Effekte durch einen starken Ionenfreisetzung bei dem reinen NM-300K gegenüber dem eingeschränkten Ionenfreisetzung der sulfidierten AgNM, was zu Hemmungen nach einer längeren Inkubationsdauer führt. Die Freisetzung aus den sulfidierten Materialien ist demnach so stark reduziert, dass es deutlich längere Inkubationszeiten (~28 Tage vs. ~140 Tage) benötigt, um die entsprechenden Toxizitätsschwellenwerte der Ag⁺-Ionenkonzentrationen in der Flüssigphase von Böden zu überschreiten.

Es ist nicht ganz klar, was diese sehr starken Effekte auf die ammoniumoxidierenden Bakterien in der Sulfatstudie, aber auch der anderen Langzeitstudien, hervorruft, da fast die kompletten AgNM bereits während der Abwasserklärung sulfidierten. Selbst unter Berücksichtigung dessen, dass es sich bei dem gebildeten Ag₂S nicht um kristallines Ag₂S handelt, ist das Ausmaß der Effekte enorm. Die folgenden Punkte können als Erklärung für die Effekte dienen.

- I. Es wurde nach wie vor eine kleine Fraktion leicht lösliches Ag⁰ und weniger stabiles AgCl als Ag₂S bei den TEM-Untersuchungen gefunden.
- II. Eine große Anzahl kleiner Partikel (<5 nm), die eventuell sekundär, durch Lösung und Niederschlag während der Inkubation gebildet wurden. Aufgrund der Größe können diese Partikel in die Zellen gelangen (Morones et al., 2005) und sind in der Zelle aufgrund intrazellulärer „Reactive Oxygen Species“ gefährdet oxidiert zu werden, dadurch lokale hohe Konzentrationen an Ag⁺-Ionen zu erzeugen und dadurch die Zelle zu schädigen.
- III. Amorphe oder instabile „Ag-S“-Spezies mit einer höheren Löslichkeit gegenüber dem kristallinen Ag₂S rufen die Effekte über Ionenfreigabe hervor.
- IV. Die lange Studiendauer führt bei langsamer oder geringer Ionenabgabe (Punkte I - III) zum Überschreiten von Schwellenwerten der Toxizität durch Akkumulation der Ag⁺-Ionen.

Verschiedene Studien haben unterschiedliche Anteile amorpher Strukturen oder die Instabilität des Ag₂S gezeigt (Levard et al., 2011), besonders wenn die Sulfidierung bei umweltrelevanten Prozessen bei der Abwasserklärung oder der Klärschlammaufbereitung „natürlich“ entstanden ist (Pradas del Real et al., 2016, Kent et al., 2014). Obwohl die Labilität oder amorphe Strukturen in der vorliegenden Sulfatstudie nicht analytisch bestimmt worden sind (da die analytischen Anforderungen für diese Untersuchungen die Ausstattung der meisten Institutionen übersteigt), wiesen die Veränderungen der Morphologie zumindest

der großen Partikel, die bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung beobachtet wurden, sehr stark darauf hin, dass es sich bei dem gebildeten Ag_2S nicht um hochkristallines Ag_2S handelt und die Löslichkeit demnach höher ist als erwartet. Dabei ist es sehr unwahrscheinlich, dass die höhere Löslichkeit nur auf die größeren Partikel, die sich während der Inkubation gebildet haben, beschränkt ist. Auch die kleinsten Partikel können sich, aufgrund der großen Anzahl und des Ausbleibens in dem reinen Klärschlamm, während der 140 Tage sekundär aus Ionen gebildet haben.

6.4. Einfluss der Ag - Einlaufkonzentration auf die Bioverfügbarkeit von AgNM

Die Langzeitversuche 6 und 7 erhielten ihre Ag-Gehalte über unterschiedliche Herangehensweisen: mit dem konventionellen Ansatz und Ansätzen mit zehnfacher Klärschlammmenge (16,7 g TM). Durch diese Herangehensweise sollte den für die Wirkung erforderlichen hohen AgNM-Konzentrationen in Böden und damit in den Kläranlagensimulationen und eventuellen Einflüssen auf die Sulfidierung der AgNM Rechnung getragen werden. Die PEC für Klärschlamm liegt in Europa bei 1,68 mg Ag/kg (Gottschalk et al., 2009), was circa Faktor 2000 unter den Ag-Klärschlammgehalten des konventionellen Ansatzes liegt (Daten nicht abgebildet). Um die Einlaufkonzentration zu verringern und dennoch in ökotoxikologische Wirkbereiche zu gelangen, wurde die Einlaufkonzentration um den Faktor zehn verringert und die Klärschlammmenge um den gleichen Faktor erhöht, womit sich der Unterschied zur PEC auf circa 200 verringerte. Die abgeschätzten Ag-Gehalte im Klärschlamm der Kläranlagensimulation mit 0,1 mg Ag/L (~300 mg Ag /kg) waren jedoch nur etwa doppelt so hoch wie die höchsten Messwerte in Klärschlamm (195 mg Ag /kg; (856 mg Ag /kg=Ausreißer)), die von der USEPA (2009) untersucht worden waren.

Bei den Ansätzen mit erhöhter Klärschlammmenge in den Böden fand eine Variante mit einem Zehntel der Einlaufkonzentration bei der Kläranlagensimulation (0,1 mg Ag/L) und eine Variante mit einem Teil konventionellem Schlamm (1,67 g TS) und neun Teilen Kontrollschlamm (15,03 g TS) als Referenz Anwendung. Hier zeigte sich, dass die erhöhten Klärschlammengen in allen Ansätzen mit erhöhter Klärschlammmenge zu einer gesteigerten Aktivität der Nitrifikanten führten. Es gab jedoch keine Hinweise dafür, dass die hohen Einlaufkonzentrationen, wie sie in den zuvor durchgeführten Kläranlagensimulationen (für die Langzeitversuche 1, 2 und 5) eingeleitet worden waren, zu falsch positiven Effekten, das heißt zu einem Auftreten von Effekten, führten. Durch die Variante mit reduzierter Einlaufkonzentration ($10 \cdot 0,1$ mg Ag/L) wurden nach Direktapplikation in beiden Durchgängen und nach Klärschlammfäulung im siebten Langzeitversuch trotz der Konzentrationsunterschiede deutliche Effekte auf die Nitrifikanten hervorgerufen. Die Ursache für die geringen gemessenen Ag-Gehalte im Vergleich zu den erwarteten und

denen des vorherigen Langzeitversuchs 6 wurde nicht untersucht, da grundsätzlich Effekte hervorgerufen wurden. Die Ursache muss jedoch im Zusammenhang mit der Ag-Konzentration der Stammdispersion stehen, da in allen Behandlungen gleichermaßen niedrige Werte gemessen wurden. Ob die Stammdispersion falsch angesetzt wurde oder die Charge zu wenig Silber enthielt, ließ sich rückwirkend nicht mehr nachvollziehen. Das Ausbleiben der Effekte im sechsten Versuch nach Faulschlammapplikation muss auf die geringe Aktivität der Kontrolle bezogen werden. In dem kombinierten Ansatz (1+9) mit regulärem Faulschlamm, der in dem einfachen Ansatz (1,67 g TS) Effekte hervorrief, sind daher ebenfalls keine Hemmungen aufgetreten. Der Grund für die geringe Aktivität der Kontrolle war jedoch unersichtlich.

Ein negativer Einfluss der hohen Ag-Konzentrationen auf die SRB während der Kläranlagensimulation ist aus den folgenden Gründen unwahrscheinlich. SO_4^{2-} lag im Überschuss zur Sulfidierung der AgNM vor (Kapitel 4.8.4) und die Anwesenheit von SRB wurde in zwei unabhängigen Kläranlagensimulationen und einer Batchapplikation nachgewiesen. Zudem zeigten sich keine Unterschiede zwischen den zwei Ansätzen mit zehnfacher Klärschlammmenge, die ihre Wirkgehalte in Böden einmal über die reduzierte Konzentration im Einlauf ($10 \cdot 0,1 \text{ mg Ag/L}$) erhielten und einmal über die reguläre Konzentration im Einlauf plus unbelasteten Klärschlamm ($1 \cdot 1,0 \text{ mg Ag/L} + 9 \text{ Kontrolle}$). Ein negativer Einfluss auf die SRB und damit die Sulfidierung ist darüber hinaus unwahrscheinlich, da die Sulfidierung sehr schnell abläuft ($>90\%$ innerhalb von 2 Std im Denitrifikationsbecken (Kaegi et al., 2011)) und die Ionenfreisetzung dadurch stark reduziert wird. Auf Grundlage dieser Daten kann ein Einfluss auf die Funktion des Stoffumsatzes, die Reduktion von Schwefel und die Bildung von Ag_2S ausgeschlossen werden. Effekte auf einzelne Spezies können wie unter Kapitel 6.1.1 diskutiert nicht ausgeschlossen werden, insbesondere da sich AgNM toxischer als Ag^+ darstellen können (Yang et al., 2014).

6.5. Bioverfügbarkeit von chemisch synthetisiertem Ag_2S

Die verschiedenen Referenzmaterialien hemmten die Aktivität der Nitrifikanten nach 140 Tagen unabhängig davon, ob sie über Klär- oder Faulschlamm in die Böden eingebracht wurden. Sogar das als sehr stabil erachtete Ag_2S NonNM zeigte in der gefaulten Behandlung eine leichte Wirkung. Die Hemmungen der anderen sulfidierten Materialien lagen auf dem Niveau von NM-300K, die von AgNO_3 lagen darüber. Das spricht dafür, dass es für die Toxizität auf die Bodenmikroorganismen keinen Unterschied macht, wie es zu der Sulfidierung gekommen ist, auch unter optimalen Bedingungen im Labor bleiben die sulfidierten AgNM weiterhin bioverfügbar.

Der Test der Substanzen ohne vorherige Kläranlagensimulation zeigt die Wirkung der nicht sulfidierten reinen Materialien (AgNO_3 , NM-300K). Vor allem das im Ansatzwasser gelöste

AgNO₃ wirkte unmittelbar. Das metallische NM-300K zeigte ebenfalls Hemmungen, die mit der Zeit zunahmen. Die Effekte der sulfidierten Materialien blieben zunächst aus, ab Tag 56 traten jedoch Effekte auf, die bis zum letzten Beprobungstag nach 140 Tagen noch deutlicher wurden. Das unterstützt die These, dass die sulfidierten AgNM nicht nahezu unlöslich sind wie kristallines Ag₂S, sondern die Materialien in geringem Maße Ionen abgeben. Daher braucht es eine längere Zeit bis die Schwellenwerte für die (Öko-)Toxizität überschritten sind und negative Effekte sichtbar werden. Die Toxizität ist demnach eine Funktion der Zeit. Schon bei der Arbeit von Schlich et al. (2013) zeigte sich, dass die Effekte der über Klärschlamm applizierten AgNM deutlich später auftraten als bei reinem NM-300K ohne Klärschlamm, was mit der Sorption an den Klärschlamm diskutiert wurde. Vielmehr scheint es nicht die Anwesenheit des Schlammes, sondern die damit verbundene Sulfidierung der AgNM und geringere Freisetzung von Ag⁺ zu sein, die die zeitliche Verschiebung begründen.

6.6. Übertragbarkeit von Labordaten auf Daten aus Freilandversuchen

Ein Ziel der Freilandlysimeterstudie war es, die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus standardisierten Laborexperimenten mit denen aus umweltrelevanteren, realistischeren Freilandexperimenten abzugleichen. Für die Gefährdungsabschätzung nach REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) wird im Regelfall die Toxizität von Chemikalien anhand von Effektkonzentrationen, die aus Laborstudien ermittelt werden, beurteilt (European Chemicals Agency, 2008). Unterschreiten diese Effektkonzentrationen unter Berücksichtigung von Sicherheitsfaktoren die erwarteten Umweltkonzentrationen (predicted environmental concentration, PEC), so muss eine verfeinerte Risikoabschätzung durch realistischere / umweltrelevantere Studien durchgeführt werden. Freilandlysimeter stellen für terrestrische Systeme ein solches System dar. Um einen negativen Umwelteinfluss in der Gefährdungsabschätzung ausschließen zu können, müssen die Daten, die mittels Laborstudien ermittelt wurden, also eine höhere Sensitivität des Organismus gegenüber dem Testgegenstand aufweisen, als die Daten der Freilandlysimeterstudie.

6.6.1. Effekte auf Bodenmikroorganismen und Pflanzen

In den folgenden Unterkapiteln werden die ökotoxischen Effekte von AgNM auf ein- und mehrzellige Bodenorganismen und die Entwicklung von Pflanzen in Labor- und Freilandstudien diskutiert.

6.6.1.1. Langzeiteffekte auf Bodenmikroorganismen

Die mikrobielle Aktivität in dem Boden des höher beaufschlagten Lysimeter mit 7,0 mg Ag/kg TM war über den Testzeitraum von 26 Monaten kontinuierlich gehemmt. Die ammoniumoxidierenden Bakterien zeigten sich dabei sensitiver als die aeroben heterotrophen Mikroorganismen (als substratinduzierte Respiration gemessen), was sich in weniger ausgeprägten Hemmungen der Aktivität gegenüber der Aktivität in der Kontrollbehandlung zeigte. Die höhere Sensitivität der spezifisch getesteten ammoniumoxidierenden Bakterien gegenüber den allgemeinen aerob heterotrophen wurde bereits in weiteren Studien herausgestellt (Hund-Rinke and Schlich, 2014, Schlich et al., 2013, Hänsch and Emmerling, 2010).

Eine durchgängige signifikante Hemmung der mikrobiellen Aktivität in dem Boden des niedriger beaufschlagten Lysimeters mit 1,8 mg Ag/kg TM wurde mit keinem der beiden angewendeten Testsysteme nachgewiesen. In zwei anderen Freilandexperimenten traten ebenfalls Effekte wie bei der vorliegenden Freilandlysimeterstudie auf (Durenkamp et al., 2016, Colman et al., 2013).

Colman et al. (2013) zeigten mit ihren Untersuchungen Effekte von AgNM auf Pflanzen und Bodenmikroorganismen bei einem Ag-Gehalt von 0,14 mg Ag/kg TM in einer Freilandlysimeterstudie. Die AgNM hatten ein PVP (Polyvinylpyrrolidon) coating und waren mit einer mit TEM bestimmten Größe von 21 nm etwas größer als das im Rahmen der Promotion verwendete NM-300K. Die AgNM wurden unmittelbar vor der Applikation auf die Böden in rehydrierten Klärschlamm zugegeben. Die Böden bestanden zu 63,5 % aus Sand, zu 10,5 % aus Schluff und zu 26 % aus Ton und waren zum Zeitpunkt der Klärschlammapplikation bereits mit Pflanzen bewachsen. Die Enzymaktivität der Leucinaminopeptidase und Phosphatase waren um 52 % bzw. 27 % gegenüber der Kontrolle gehemmt. Die mikrobielle Biomasse war um 35 % gegenüber der Behandlung mit Kontrollschlamm gehemmt. Die stärkeren Effekte in der Studie von Colman et al. (2013) sind vermutlich dem abweichenden Testdesign, vor allem der Applikation der AgNM und des Klärschlammes geschuldet. Die unmittelbare Zugabe der AgNM und fehlende Zeit der Transformation führte zu nicht vollständig sulfidierten AgNM mit metallischen Anteilen, wie die Speziierung mit EXAFS zeigte. Dieses metallische Ag⁰ ist wesentlich leichter löslich und

gibt dementsprechend schneller und in größeren Mengen Ionen frei, wie bereits in Kapitel 6.3 diskutiert.

Zudem unterschieden sich die Studien hinsichtlich der Klärschlammaufbereitung. Der Klärschlamm in der vorliegenden Studie wurde durch die durchgeführten Kläranlagensimulationen aufbereitet, nach der Applikation und einer Einwirkzeit von 24 Stunden wurde ein kationisches Acrylamid als Flockungsmittel nach Angaben der kommunalen Kläranlage Schmallenberg (2014, persönliche Mitteilung) hinzugegeben und das Wasser mechanisch über Gaze aus dem Schlamm gepresst. Anschließend wurde in Anlehnung an die AbfKlärV (1992) 0,405 kg TS/m² Klärschlamm auf den Lysimeterboden aufgebracht und 20 cm tief eingearbeitet, was zu einem Schlamm-Boden-Verhältnis von 1,67 g TS/kg TM wie in den übrigen Laborversuchen führte. Colman et al. (2013) rehydrierten 200 g Klärschlamm (Class A Biosolids), versetzten ihn mit Testsubstanz und gaben diesen auf 80 kg Boden, was zu einem Schlamm-Boden-Verhältnis von 2,5 g TS/kg TM führte. Darüber hinaus haben die Bodeneigenschaften wie C_{org}, pH-Wert oder die Bodenart einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der AgNM (Schlich and Hund-Rinke, 2015, Cupi et al., 2015, Collin et al., 2014). In der vorliegenden Lysimeterstudie und allen weiteren Laborstudien wurde ein schwach lehmiger Sand verwendet, der für die biologischen Untersuchungen (nach der Applikation) nochmals auf 2 mm gesiebt wurde. Colman et al. (2013) verwendeten einen Auenboden mit hohem Tongehalt (26 %), der auf 10 mm gesiebt wurde. Die Bodeneigenschaften des Auenbodens würden bei gleichem Testdesign jedoch eher geringere Effekte erwarten lassen, was die Annahme bestätigt, dass die nicht vollständig sulfidierten AgNM der maßgebende Faktor für die Effekte sein muss. Eine vollständige Sulfidierung der AgNM in der im Rahmen dieser Promotion vorliegenden Lysimeterstudie wurde nicht direkt analytisch untersucht. Aufgrund der geringen benötigten Zeit für die Sulfidierung im Abwasser und im Klärbecken (Kaegi et al., 2013, Kaegi et al., 2011) kann jedoch von einer Sulfidierung im Batchansatz über fast 24 Stunden ausgegangen werden. Durch die starke O₂-Zehrung durch den Klärschlamm kommt es zu anoxischen Bereichen ähnlich dem von Kaegi et al. (2013) untersuchten Abwasserkanal.

Durenkamp et al. (2016) untersuchten den Einfluss von AgNM auf die strukturelle Diversität von Bodenmikroorganismen nach Applikation von Klärschlamm in Freilandlysimetern (0,11 m * 0,23 m) über ein halbes Jahr. Sie untersuchten die Effekte von AgNM mit einer Konzentration von 140 mg Ag/kg TM in einem Gemisch aus über 40 % Klärschlamm mit fast 60 % sandigem Boden bei einer WHK von 50 %. Die AgNM führten zu Veränderungen im Stickstoffkreislauf und einer Reduktion der Methanproduktion, darüber hinaus wurden Einflüsse auf die Bodenpilze beobachtet, die sich auf den Abbau von organischer Bodensubstanz oder den Nährstoffkreislauf sowie das Pflanzenwachstum auswirken können

(Durenkamp et al., 2016). Auch hier zeigte sich, dass die Organismen, die am Abbau des organischen Stickstoffs beteiligt sind, sehr sensitiv reagieren.

6.6.1.2. Vergleich der Ergebnisse aus dem Labor- und dem Freilandexperiment

Der Abgleich der Daten aus dem Laborteil der vorliegenden Lysimeterstudie mit den Daten aus dem Freilandteil zeigte, dass zum einen die Effekte in den im Labor inkubierten Böden ausgeprägter sind als in den im Freiland inkubierten Böden und zum anderen, dass die Effekte in den im Labor inkubierten Böden über die Versuchsdauer zunahmen. Die Effekte der im Freiland inkubierten Böden hingegen blieben über 26 Monate konstant.

Die genauen Gründe für die unterschiedlichen ansteigenden bzw. konstanten Effekte bleiben unklar, aber es ist sehr wahrscheinlich, dass im Freiland Sickerwasser und Pflanzenbewuchs für ausgeglichene regulierte pH-, Nährstoff- und Ag^+ - Verhältnisse sorgen, wohingegen die im Labor inkubierten Böden keinen Austrag durch Sickerwasser und Pflanzenbewuchs haben. Allerdings können aufgrund des hohen Rückhalts von AgNM in Böden (Hoppe et al., 2015, Hoppe et al., 2014, Cornelis et al., 2014) und die nicht gemessene direkte Verlagerung von Ag in Böden ein Auswaschen von größeren Mengen AgNM ausgeschlossen werden. Jedoch zeigten sich in dem Lysimeter mit der höchsten Beaufschlagung über die gesamte Versuchsdauer hinweg in allen Lysimetern eine geringfügige Ag-Konzentration im Sickerwasser (56 ng Ag/L), die in der Behandlung mit 7,0 mg Ag/kg TM gegenüber der Kontrolle erhöht war. Das spricht für eine konstante Freisetzung von Ag^+ und Auswaschungen mit dem Sickerwasser. Wie bereits im Kapitel 6.3 erwähnt, zeigten langfristig im Freiland gelagerte bzw. kompostierte Klärschlammte eine deutlich geringeren Anteil an labilem Ag_2S als Klärschlammte, die in Glasgefäßen archiviert wurden (Donner et al., 2015), was ebenfalls mit Auswaschungen über das Sickerwasser erklärt wurde. In dieser Studie zeigte sich darüber hinaus, dass trotz eines geringen Anteils von labilem Ag_2S der Anteil des CaNO_3 -extrahierbaren Silbers nach mehrjähriger Lagerung noch immer bei 1,1 % vom totalen Silbergehalt lag (Donner et al., 2015) und somit über mehrere Jahre, wenn auch in kleinen Mengen, bioverfügbar bleibt. Zudem zeigten die Untersuchungen der Pflanzen der Lysimeterstudie eine Aufnahme und damit Zwischenspeicherung von Ag, was zu Gleichgewichtsverhältnissen führen sollte. Die Aufnahme von AgNM und Ag in Pflanzen wurde in weiteren Studien belegt (Pradas del Real et al., 2016, Stegemeier et al., 2015, Lowry et al., 2012). Im Gegensatz zu der Inkubation in dem „offenen System Freilandlysimeter“ findet im Labor weder ein Austrag über Sickerwasser oder Pflanzenernte noch Zwischenspeicherung im Pflanzengewebe statt. Darüber hinaus sanken vermutlich aufgrund der Nitrifikation (Nitratakkumulation in anderen Studien gemessen, Daten nicht dargestellt) die pH-Werte der im Labor gelagerten Böden (pH-Werte nach 180 Tagen: Labor

~5,3; Freilandlysimeter ~5,8), was als zusätzlicher Stressor auf die ammoniumoxidierenden Bakterien wirkt.

Grundsätzlich zeigen die Aktivitätsdaten der im Freiland inkubierten Böden sowohl bei der substratinduzierten Respiration, als auch bei der potentiellen Ammoniumoxidation höhere Werte als in den im Labor inkubierten Böden. Aufgrund von Pflanzenwachstum, Abbau des organischen Pflanzenmaterials und der Abgabe von Wurzelexsudaten ist die Aktivität der Lysimeterböden erhöht. Da diese Faktoren in den im Labor inkubierten Böden fehlen, ist die Versuchsdauer von Laborstudien begrenzt (OECD Guideline 217, 2000). Der Verbrauch von Nährstoffen über die Versuchsdauer und die resultierenden reduzierten Aktivitäten der Ammoniumoxidation und der Respiration führte zu der Beendigung der Studie nach 180 Tagen.

Die Ergebnisse der potentiellen Ammoniumoxidation des Laborteils der Freilandlysimeterstudie liegen trotz anderer Applikationsmethodik über eine Batchapplikation und manuellem Untergraben „im Feld“ in dem Bereich der anderen Langzeitstudien, die im Rahmen dieser Promotion durchgeführt worden sind. Der Vergleich der Daten der im Labor inkubierten Böden mit den in Freilandlysimetern inkubierten Böden dieser Studie zeigte einen deutlichen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen. Damit sind Daten aus Laborversuchen durchaus geeignet für die Gefährdungsbeurteilung von AgNM, wie sie von Voelker et al. (2015) durchgeführt wurde. Auch wenn die Hemmungen der in den in Freilandlysimetern inkubierten Böden geringer ausfielen, waren sie über 26 Monate konstant.

6.6.1.3. Effekte auf Regenwürmer nach Langzeitinkubation im Freiland

Die in den Freilandlysimetern inkubierten Böden zeigten keine signifikanten Effekte auf Regenwürmer. Weder die Reproduktion war beeinträchtigt noch zeigten die Regenwürmer ein Fluchtverhalten bei den getesteten Ag-Bodengehalten von 1,8 mg Ag/kg TM und 7,0 mg Ag/kg TM. Schlich (2013) untersuchte ebenfalls, wie NM-300K das Fluchtverhalten und die Reproduktion von Regenwürmern beeinträchtigte. Die NOEC (No observed effect concentration) lag bei der Reproduktion der Regenwürmer bei <15 mg Ag/kg TM, die EC₁₀ bei 24,2 mg Ag/kg TM. Ab einem Ag-Bodengehalt von 3,7 mg Ag/kg TM zeigte sich ein deutliches Fluchtverhalten der Tiere. Im Gegensatz zu den Versuchen dieser Studie nutzte Schlich (2013) reines NM-300K, was er unbehandelt in die Böden einarbeitete. In der vorliegenden Studie wurden die AgNM über Klärschlamm appliziert und im Freiland für 18 Monate gelagert, sodass zum einen von der vollständigen Sulfidierung der AgNM ausgegangen wird (Kapitel 6.6.1.1) und zum anderen durch die Langzeitlagerung ein Teil des labilen Silbers durch Sickerwasser ausgespült wurde (Donner et al., 2015). Demnach können die Regenwürmer sulfidierte AgNM nicht so sensitiv wahrnehmen wie metallische AgNM. Die Reproduktion kann aufgrund der großen Diskrepanz der Ag-Bodengehalte nicht

beurteilt werden. Aufgrund der bereits diskutierten verminderten Ionenabgabe kann jedoch auch hier von reduzierten Effekten ausgegangen werden.

6.6.1.4. Effekte auf das Pflanzenwachstum nach Langzeitinkubation im Freiland

Die Pflanzenversuche, die mit den Böden der Lysimeterversuche (Kontrolle; 1,8 mg Ag/kg TM; 7,0 mg Ag/kg TM) durchgeführt wurden, zeigten fast keine Effekte bei der Pflanzenkeimung. Nur der Winterraps Treffer war in der 7,0 mg Ag/kg-Behandlung gehemmt. Bei den Pflanzenversuchen von Schlich (2013) traten für Hafer und Bohne keine Hemmungen der Keimungsraten bis zu Ag-Bodengehalten von 100 mg Ag/kg auf. Der monokotyle Hafer hatte allerdings ab einem Ag-Bodengehalt von 1 mg Ag/kg ein gehemmtes Pflanzenwachstum, das sich durch ein geringeres Frischgewicht äußerte. Die in den Lysimeterböden herangezogenen monokotylen und dikotylen Pflanzen waren, abgesehen von dem Winterraps, ab einem Ag-Bodengehalt von 1,8 mg Ag/kg gehemmt. Die Rapspflanzen der 7,0 mg Ag/kg TM-Behandlung waren vermutlich aufgrund der geringeren Pflanzenzahl und damit besseren Platz- und Ressourcenverhältnisse nicht gegenüber der Kontrolle gehemmt. Die niedrigere Behandlung (1,8 mg Ag/kg TM) mit höherer Keimzahl hingegen wies eine reduzierte Biomasseproduktion auf. Auf Grundlage dieser Daten ist davon auszugehen, dass selbst sulfidierte AgNM für die Pflanzen verfügbar sind, bzw. dass sie einen Nachteil durch deren Anwesenheit haben, beispielsweise durch Effekte auf Mikroorganismen in der Rhizosphäre und damit schlechtere Nährstoffversorgung. Auf die Bioverfügbarkeit von sulfidierten AgNM kann geschlossen werden, da sich sowohl in den Wurzeln der Pflanzen als auch im Sickerwasser der Lysimeter Silber nachweisen ließ und deutliche Effekte auf die Bodenmikroorganismen auftraten. Auch Sekine et al. (2015) berichteten über eine erhöhte Löslichkeit von Ag_2S durch Wurzelexsudate.

6.6.2. Verlagerung und Pflanzenaufnahme im Freiland

Die Königswasseraufschlüsse der horizontbezogenen Bodenproben (10 cm-Horizonte) zeigten keine Verlagerung der AgNM in messbaren Größenordnungen über die gesamte Versuchsdauer. Die schwankenden Messwerte zwischen und innerhalb der Probenahmezeitpunkte können auf die Bewirtschaftung der Lysimeter (Umgraben) und die Probenahme mit dem Pürkhauer Bohrstock (Verschleppung) in Zusammenhang gebracht werden. Lowry et al. (2012) führte Langzeitstudien in Süßwassermesokosmen durch und fand große Mengen der zugeführten AgNM im Boden und dem Sediment. Durenkamp et al. (2016) detektierten geringe Ag-Konzentrationen in dem Sickerwasser von Freilandlysimetern, die mit AgNM über Klärschlamm beaufschlagt wurden. Nach Alterung über 92 Tage wurden noch 99 % der applizierten AgNM in den Böden aus Säulenversuchen mit künstlichem Regenwasser zurückgehalten (Hoppe et al., 2015). Für diese

Säulenversuche und für sämtliche Versuche dieser Promotion, einschließlich der Lysimeterversuche, wurden die gleichen Böden (HagenAM2013) und die gleichen AgNM (NM-300K) verwendet. Trotz der unterschiedlichen Testansätze der beiden Studien, insbesondere hinsichtlich der Applikation und der Versuchs- und Inkubationsdauer, zeigten beide Studien eine sehr geringe Mobilität der AgNM. Die sehr geringen gemessenen Ag-Konzentrationen in den Sickerwässern der Lysimeter (55 ng Ag/L in dem Sickerwasser der 7,0 mg Ag/kg TM-Behandlung) bestätigen die sehr geringe aber vorhandene Mobilität der AgNM. Aufgrund der bereits erwähnten Applikations-, Bewirtschaftungs- und Beprobungstechnik der Lysimeterböden und der erforderlichen Ag-Extraktionen konnte eine Verlagerung in Böden entgegen der direkten Bestimmung im Perkolat nicht detektiert werden. Die AgNM wurden manuell eingebracht und untergegraben, die Böden regelmäßig zur Ernte aufgebrochen und erneut umgegraben, dadurch ergaben sich unscharfe Horizontgrenzen die immer wieder leicht verändert wurden. Zudem waren die Böden immer etwas feucht und neigten aufgrund des Klärschlammes zur Bildung von Klumpen, wodurch die Verteilung der AgNM kleinräumige Ungleichmäßigkeiten aufwies. Aufgrund der schnellen Sulfidierung der AgNM braucht das Coating der Partikel nicht berücksichtigt zu werden, wenn sie über Klärschlamm appliziert werden (Whitley et al., 2013). Die Aussagen sind somit auch auf weitere AgNM übertragbar, die eine andere Stabilisierung als NM-300K aufweisen (NM-300K = sterisch stabilisiert).

Verschiedene Studien bestätigen die These, dass Böden eine finale Senke für ENM (engineered nano materials) darstellen (Cornelis et al., 2014, Pan and Xing, 2012). Nowack et al. (2015) bemängelten fehlende analytische Mittel, ENPs getrennt von natürlichen NM zu detektieren, was auch auf diese Lysimeterstudie zutrifft. Dessen ungeachtet passen die Ergebnisse der Lysimeterstudie gut zu den Ergebnissen anderer Langzeitstudien (Durenkamp et al., 2016, Lowry et al., 2012). Grundsätzlich war in Böden selbst keine Verlagerung der AgNM nachzuweisen, aber eine sehr geringe Remobilisierung der AgNM über die geringen Konzentrationen im Sickerwasser. Über Klärschlamm applizierte AgNM sind demnach nur annähernd immobil und auch geringste Mengen, sogar Konzentrationen von unter 1 µg Ag /L stellen eine große Anzahl an Partikeln dar. Auch Donner et al. (2015) vermuteten Auswaschungen des labilen Ag-Anteils bei langfristig kompostierten Klärschlämmen. Andere experimentelle Herangehensweisen, die Bodensäulen mit AgNM perkolierten, zeigten potentielle Mobilität der AgNM und induzieren damit ein Risiko für das Grundwasser (Liang et al., 2013). Jedoch sollte die Herangehensweise über den Eintrag über Klärschlamm und anschließende Langzeitinkubation in Lysimetern das realistischere Szenario gegenüber der Perkolation von Bodensäulen mit hochstabilen, kolloidalen AgNM-Dispersionen darstellen.

Trotz des geringen Austrags von Silber aus den Böden über das Sickerwasser wurde Ag in den Weizen-, Gersten- und Rapsurzeln nachgewiesen. Neben dem Nachweis über eine Extraktion wurden die Pflanzenwurzeln mittels TOF SIMS (time-of-flight secondary ion mass spectrometry) exemplarisch am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) untersucht (Daten nicht dargestellt), was eindeutig das Vorliegen im Inneren der Pflanzenwurzel zeigte. Eine epidermale Verunreinigung mit AgNM kann somit als alleinige Ag-Quelle ausgeschlossen werden. Die Ag-Aufnahme zeigt, dass verschiedene physikochemische Bedingungen in der Rhizosphäre die Verfügbarkeit von Ag für die Pflanze erhöhen und neben Wachstumshemmungen (Kapitel 6.6.1.4) zur Aufnahme führen. Sekine et al. (2015) diskutierten, dass Wurzelexsudate zu einer erhöhten Löslichkeit von Ag₂S führen können. Auch Pradas del Real et al. (2016) beobachteten eine erhöhte Freisetzung in Anwesenheit von Wurzelexsudaten. Da in der Rhizosphäre die mikrobielle Aktivität besonders groß ist, führen die induzierten höheren Ionenkonzentrationen besonders hier zu Effekten. Die Pflanzenwurzeln wachsen vermutlich aufgrund der begrenzten Nährstoffe der sandigen Braunerde gezielt in die Nähe der nährstoffreichen Klärschlämme mit ihren inkorporierten AgNM. Da Silber kein Nährelement für Pflanzen darstellt, muss es sich um eine nicht gezielte Aufnahme des Silbers mit den Nährstoffen handeln. Die AgNM-Aufnahme in Pflanzen und mögliche Anreicherung in der Nahrungskette wurde schon von Gardea-Torresdey et al. (2014) kritisch diskutiert. In einer Studie zur Aufnahme von AgNM in Luzerne, die in Hydrokulturen herangezogen wurden, zeigte sich die Akkumulation von Ag entlang des Apoplasten in den Wurzeln, der Weitertransport war dabei allerdings minimal (Stegemeier et al., 2015). Die Messdaten der Pflanzen aus dem Lysimeterversuch zeigten ebenfalls eine Aufnahme in die Pflanzenwurzeln aller Pflanzensorten, aber im Gegensatz zu den Bedenken von Gardea-Torresdey et al. (2014) keine Weiterverteilung in den Spross oder die Früchte der Pflanzen. Jedoch kann die Klärschlammapplikation auf gärtnerisch genutzten Flächen oder auf Äckern für Wurzelgemüse, was zumindest in Deutschland gemäß der AbfKlärV (1992) derzeit ausgeschlossen ist, zum Eintrag in die Nahrungskette führen.

7. Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Studien und deren Diskussion können hinsichtlich der anfangs gestellten Fragen folgende Schlussfolgerungen abgeleitet werden:

- Welchen Einfluss hat die Klärschlammaufbereitung auf die Bioverfügbarkeit von nanopartikulärem Silber für Bodenmikroorganismen, wenn es über den Klärschlammfad in Böden eingebracht wird? Wie hoch ist das verbleibende Risiko?

Die Bioverfügbarkeit wurde anhand von ökotoxikologischen Effekten mittels biologischer Verfahren bestimmt, nachdem die Klärschlämme unter praxis- und damit umweltrelevanten Bedingungen zunächst in Laborkläranlagen beaufschlagt und anschließend aufbereitet wurden, wobei sie unterschiedlichen physikochemischen Einflussfaktoren (Temperatur, pH-Wert, Redoxpotential) ausgesetzt waren. Um grundsätzliche Aussagen zum Verhalten der AgNM und zur Reduktion von Effekten treffen zu können, musste von aktuellen Umweltkonzentrationen abgewichen und ökotoxikologisch wirksame Ag-Bodengehalte angestrebt werden.

- I. Die Kombination aus hohen Ag-Bodengehalten und niedrigen pH-Werten führt zu erheblichen Einschränkungen der Nitrifikation in Böden. Durch eine Verbesserung der Bodenverhältnisse, z.B. durch Klärschlammhygienisierung durch Kalkung, lassen sich Effekte zumindest zeitweise reduzieren.
 - II. Im Vergleich zur Direktapplikation führen die Faulung und Pasteurisierung von Klärschlamm nicht zu einer Reduktion der Effekte auf die Bodenmikroflora.
 - III. Eine Herangehensweise über ökotoxikologisch wirksame Bodengehalte über den Umweltgehalten (PEC) ist gerechtfertigt, um grundsätzliche Aussagen zum Einfluss von Faktoren auf die Bioverfügbarkeit nachweisen zu können.
 - IV. Versuche mit vereinfachten Herangehensweisen, zum Beispiel über Kurzzeittests, mit nicht oder chemisch sulfidierten AgNM, spiegeln umweltrelevante Faktoren nicht wieder und können zu falschen Ergebnissen führen.
- Welche Faktoren beeinflussen die Sulfidierung der AgNM, die als „natürliche Detoxifizierung“ von Silber gilt? Wird bei der Abwasser- oder der Klärschlammaufbereitung Ag_2S gebildet?

Die Sulfidierung der AgNM zu Ag_2S stellte sich als entscheidender Faktor für die Bioverfügbarkeit heraus. Die für die Sulfidierung notwendigen Faktoren, der Einfluss der Menge an reduzierbarem Schwefel und der Einfluss der Silberkonzentration in der Kläranlage, wurden in Versuchsansätzen, bei denen nur jeweils einer dieser Faktoren bei der

Kläranlagensimulation angepasst wurde, mit Langzeituntersuchungen zur Bioverfügbarkeit der AgNM für Bodenmikroorganismen mittels funktioneller Verfahren untersucht. Zudem wurden die Anwesenheit und Aktivität von schwefelreduzierenden Bakterien (SRB) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kläranlagensimulation und der Klärschlammaufbereitung überprüft. Über Elektronenmikroskopie mit gekoppelter energiedispersiver Röntgenspektroskopie wurde auf die Silberspezies im Klärschlamm und in den Klärschlamm Bodengemischen rückgeschlossen. Die Effekte der natürlich entstandenen Ag₂S-Partikel wurden abschließend mit Referenzmaterialien abgeglichen, die (I) unter optimierten Laborbedingungen sulfidiert wurden, (II) die nicht nanopartikulär waren und (III) die als leicht lösliches Silbersalz direkt in Lösung gehen konnten.

- V. Bereits vor der Klärschlammaufbereitung sulfidieren die AgNM im Zulauf zur Kläranlage (Abwasser) oder der Kläranlage zu Ag₂S, die Klärschlammaufbereitung selbst hat somit keinen direkten Einfluss auf die Bioverfügbarkeit.
 - VI. Die Menge reduzierbaren Schwefels in Abwässern (in Form von Na₂SO₄ als Waschmittelfüllsalz) und die Anwesenheit von schwefelreduzierenden Bakterien (ubiquitär in Abwasserhabitaten) stellen keinen limitierenden Faktor für die Sulfidierung von AgNM dar.
 - VII. Die Sulfidierung führt nicht zu einer vollständigen Detoxifizierung der AgNM. Die Löslichkeit ist zwar deutlich reduziert, aber über längere Zeit werden Toxizitätsschwellenwerte der Ionen überschritten und die Bodenmikroflora über Jahre konstant gehemmt.
 - VIII. Die (Öko-)Toxizität einer Substanz anhand von rein physikalisch oder chemisch bestimmten Parametern abzuschätzen und biologische Testungen unberücksichtigt zu lassen, kann zu falschen Ergebnissen führen. Beispielsweise lässt die geringe Löslichkeit von Ag₂S in Wasser fast keine Bioverfügbarkeit von Ag⁺ und somit keine Effekte erwarten.
 - IX. Die Sulfidierung in der Kläranlage beeinflusst maßgeblich die Bioverfügbarkeit der AgNM und sollte für eine Gefährdungsabschätzung berücksichtigt werden.
- Können Laborversuche als Indikatoren für das Verhalten von AgNM im Freiland genutzt werden?

Des Weiteren wurde der ökologische Einfluss des AgNM-Eintrags in die Umwelt und die Bedeutung für die Chemikalienregulierung abgewägt. Dazu wurden die Laboruntersuchungen zur mikrobiellen Bioverfügbarkeit mit einer Freilandlysimeterstudie und Pflanzen- sowie Regenwurmstudien abgerundet. Die Lysimeterstudie sollte langfristige Wirkungen der AgNM (ungefähr zwei Jahre) auf die Bodenmikroflora unter

Freilandbedingungen aufzeigen, was im Labor zum einen zeitlich, aufgrund der Ressourcenzehrung in den Böden, nicht realisierbar war und zum andern Umwelteinflüsse unberücksichtigt ließ. Über drei Vegetationsperioden wurden die Verlagerung der AgNM und die Aufnahme in landwirtschaftliche Nutzpflanzen mit gezielter Probenahme und der Bestimmung der Ag-Gesamtgehalte bestimmt.

- X. Im Freiland stellt sich eine gleichbleibende Toxizität ein, vermutlich über ein Gleichgewicht der Silberionen über Freisetzung, Bindung (z.B. Aufnahme, Fällung, Sorption) und Austrag.
- XI. Bei aktuellen Umweltkonzentrationen von AgNM können Einflüsse auf die Bodenmikroflora ausgeschlossen werden. Aufgrund der starken antimikrobiellen Wirkung von Silber sollten sie bei der Novellierung der AbfKlärV (1992) vorsorglich den Substanzen für ein Monitoring zugeordnet werden. Da eine nanospezifische Differenzierung derzeit nicht praktikabel ist, wäre die Bestimmung von Silber über den mit Königswasser extrahierbaren Bodengehalt angemessen.
- XII. Eine Gefährdung des Grundwassers spielt aufgrund der Silbermenge selbst auf kritischen Ackerstandorten (geringer Grundwasserflurabstand, saurer pH-Wert und sandige Böden) gegenüber anderen Metallen eine untergeordnete Rolle.
- XIII. Ein Eintrag in die Nahrungskette über Wurzelgemüse ist derzeit in Deutschland gesetzlich ausgeschlossen.
- XIV. Laborversuche stellen gegenüber Freilandversuchen ein „worstcase scenario“ dar und sind daher grundsätzlich zur Gefährdungsabschätzung geeignet.

Für die Beantwortung der drei thematischen Fragestellungen wurden Methoden erfolgreich entwickelt oder angepasst. Daran waren in besonderem Maße die folgenden Personen und Institutionen beteiligt. Franziska Wege fertigte eine Abschlussarbeit zur Optimierung eines molekularbiologischen Verfahrens zum Nachweis von schwefelreduzierenden Bakterien an. In Kooperation mit Jonas Schubert (Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.) wurde ein Verfahren zur chemischen Sulfidierung von NM-300K und zur Synthese von Ag₂S-NM umgesetzt. Das bestehende Verfahren von Kaegi (nicht publiziert) zur Probenvorbereitung von Klärschlamm- und Bodenproben für die Elektronenmikroskopie der AgNM-Proben wurde an der Eawag angepasst und angewendet.

8. Zusammenfassung

8.1. Deutsch

Aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung werden Silbernanomaterialien in unterschiedlichsten Verbraucherprodukten eingesetzt, besonders zur Funktionalisierung von Fasern in der Textilindustrie. Das Auswaschen der AgNM aus den Textilien, der Transport über das Abwasser in die Kläranlage und die Akkumulation der AgNM in dem anfallenden Klärschlamm sind unumstritten. Die landwirtschaftliche Klärschlammverwertung stellt in der Bundesrepublik Deutschland, aber auch europaweit, trotz sinkender Gesamtmengen einen bedeutenden Entsorgungsweg dar. Aufgrund hoher Nährstoffgehalte, insbesondere der limitierten Ressource Phosphor, und deren guter Pflanzenverfügbarkeit wurden in Deutschland im Jahr 2010 etwa ein Drittel des in öffentlichen biologischen Anlagen angefallenen Klärschlammes diesem Verwertungsweg zugeführt. Da Silber oder AgNM nicht über die sich in der Novellierung befindenden AbfklärV (1992) geregelt werden, besteht die Gefahr des unkontrollierten Eintrags in Bodenökosysteme. Bei der Novellierung der AbfklärV wird besonders die Notwendigkeit der Klärschlammhygienisierung diskutiert, um den Eintrag von pathogenen Keimen zu minimieren. Um diese Hygienisierung durchzuführen, stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, die unterschiedlich physikalisch oder chemisch auf den Klärschlamm und die darin akkumulierten AgNM einwirken. Die Verfahren können somit zu unterschiedlichen Ag-Spezies, sowie unterschiedlicher Bioverfügbarkeit der AgNM für Bodenorganismen führen.

In der Literatur wurde die toxische Wirkung von AgNM auf Bodenorganismen genauso beschrieben (z.B. Hund-Rinke and Klawonn, 2012) wie die Sulfidierung der AgNM in der Kläranlage (Kaegi et al., 2011). In Studien, die über reguläre Versuchszeiträume, über maximal 28 oder 56 Tage, wie sie in den OECD- oder ISO-Richtlinien vorgegeben sind, durchgeführt wurden, wurde eine reduzierte Bioverfügbarkeit von sulfidierten AgNM nachgewiesen (z.B. Reinsch et al., 2012). Die Ergebnisse von Langzeitversuchen mit nitrifizierenden Bodenbakterien zeigten nach einer Inkubationszeit von 140 Tagen jedoch ähnlich ausgeprägte Effekte durch AgNM, die über Klärschlamm in Böden eingebracht wurden, wie die Effekte der reinen, ohne Klärschlamm applizierten AgNM nach 28 Tagen (Schlich et al., 2013). Bei einem Ansatz über zuvor anaerob gefaulten Klärschlamm deutete sich wiederum eine reduzierte Bioverfügbarkeit der AgNM durch weniger ausgeprägte Effekte an (Schlich, 2013).

Auf diesen Erkenntnissen basierend hatte die Promotion die Ziele, (I) den Einfluss der Klärschlammaufbereitung auf die Bioverfügbarkeit von AgNM zu untersuchen, (II) die umweltrelevanten Faktoren, die die Sulfidierung, als wichtigsten Mechanismus der

Detoxifizierung von AgNM, beeinflussen, genauer zu betrachten und (III) die ökologische Bedeutung des Eintrags von AgNM in die Umwelt unter umweltrelevanten Bedingungen mit Hilfe einer Freilandlysimeterstudie abzuwägen.

Dazu wurden Simulationsversuche mit einem sphärischen AgNM (15 nm) und unterschiedlichen Referenzmaterialien in einer dreistufigen Herangehensweise durchgeführt. Die Referenzmaterialien bestanden aus zwei Ag₂S-NM, einem nicht nanopartikulärem Ag₂S und leicht verfügbarem AgNO₃. In dem ersten Schritt wurde die Abwasseraufbereitung mit Laborkläranlagen über 10 Tage oder mit Batchversuchen simuliert und dabei dem Klärschlamm AgNM zugeführt, um mit AgNM belasteten Klärschlamm zu erhalten. Bei der Applikation über die Laborkläranlagen wurde untersucht, ob und inwieweit die AgNM den Stoffabbau von Kohlen- und Stickstoff in der Kläranlage beeinflussen. Im zweiten Schritt wurde die Klärschlammvorbehandlung simuliert, dazu wurden die Klärschlämme vier unterschiedlichen Aufbereitungsvarianten (Direktapplikation, Hygienisierung durch Kalkung, Hygienisierung durch Pasteurisierung und Klärschlammfäulung) unterzogen und im dritten Schritt die landwirtschaftliche Klärschlammverwertung simuliert. In Anlehnung an die AbfKlärV (1992), die über einen Zeitraum von drei Jahren die Menge auf fünf Tonnen Klärschlammrockensubstanz pro Hektar beschränkt, wurden 1,67 g Klärschlammrockensubstanz pro Kilogramm Boden eingearbeitet und für mindestens 140 Tage bei 20±1 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden die Effekte der AgNM auf die Bodenmikroflora mit dem Testverfahren der „potentiellen Ammoniumoxidation“ (ISO Guideline 15685, 2004) untersucht, um die Bioverfügbarkeit der AgNM zu erfassen.

In einer Freilandlysimeterstudie mit mehr als zwei Jahren Laufzeit über drei Vegetationsperioden, wurden AgNM über den Klärschlammfad in die Lysimeterböden eingebracht. Während der drei Vegetationsperioden wurde eine Fruchtfolge bestehend aus Sommerweizen, Winterraps und Wintergerste angebaut. In der Studie wurden Langzeiteffekte auf die Bodenmikroflora untersucht und mit Toxizitätsdaten aus einem parallelen Laboransatz (applizierte Böden aus den Lysimetern, aber im Labor inkubiert) verglichen. Neben der Ermittlung der Toxizität wurden die Ag-Konzentrationen im Sickerwasser bestimmt und zu den Erntezeitpunkten die Ag-Gehalte in den Böden sowie in den einzelnen Pflanzenteilen (Wurzel, Spross, Frucht) ermittelt, um eine Pflanzenaufnahme und Verlagerung der Materialien zu untersuchen.

Trotz der sehr hohen Ag-Konzentration von 1 mg Ag/L im Einlauf der Kläranlagen war die Funktionsfähigkeit der Anlagen hinsichtlich des Abbaus von organischem Stickstoff und von Kohlenstoffverbindungen nicht negativ beeinflusst.

Die Ergebnisse der Langzeitversuche über 140 bis 196 Tage zeigten keinen direkten Einfluss der Klärschlammaufbereitung auf die Bioverfügbarkeit der AgNM. Die Unterschiede

der Nitrifikation in Böden mit AgNM-Behandlungen im Vergleich zu den Kontrollen waren in den drei Behandlungen Direktapplikation, Hygienisierung durch Pasteurisierung und Klärschlammfäulung signifikant. Die Hemmungen betragen über 50 % im Vergleich zu den aufbereitungsartspezifischen Kontrollen. Die Behandlungen nach der Hygienisierung der Schlämme durch Kalkung wiesen eine geringere Hemmung auf, was sich im Wesentlichen auf die geringere Löslichkeit der AgNM bei höheren pH-Werten und die für die Mikroorganismen besseren Boden-pH-Werte durch den Kalk beziehen lässt und damit eher eine zeitlich begrenzte Konditionierung darstellt.

Aufgrund der reduzierten Effekte, die in der Literatur beschrieben sind und der niedrigen Löslichkeit von Ag_2S wird die Sulfidierung der AgNM als entscheidende Transformation für die langfristige und natürliche Detoxifizierung der AgNM angesehen. Mit verschiedenen Versuchen wurde überprüft, ob die Bildung von Ag_2S in den zuvor durchgeführten Versuchen eingeschränkt war, wodurch sich die beobachtete Wirkung erklären ließe. Durch mehrere Studien wurde nachgewiesen, dass die Menge an reduzierbarem Schwefel ausreichend für die vollständige Sulfidierung war und dass während der Kläranlagensimulation und der Klärschlammfäulung schwefelreduzierende Bakterien vorhanden und aktiv waren, um das dafür notwendige Sulfid über 10 Tage (Kläranlagensimulation = Direktapplikation) bzw. maximal 45 Tage (Kläranlagensimulation + Fäulung) zu produzieren. Die Klärschlammfäulung führte nicht zu einer Reduktion der Effekte, sondern durch den Abbau der organischen Substanz und akkumulierenden AgNM während der Fäulung zu höheren Ag-Gehalten und damit zu stärker ausgeprägten Hemmungen der Nitrifikanten. Die mit TEM EDX untersuchten Partikel waren unabhängig von der im Versuch zugesetzten Sulfatmenge bereits nach der Kläranlagensimulation vollständig sulfidiert und die Klärschlammfäulung führte zu keiner weiteren Veränderung der Materialien. Die Klärschlammaufbereitung hat demnach keinen direkten Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der AgNM. Durch die TEM EDX-Untersuchungen im Anschluss an die Langzeitinkubation fanden sich Hinweise darauf, dass die AgNM instabil waren und wahrscheinlich eine andere Löslichkeit als kristallines Ag_2S haben und somit ursächlich für die aufgetretenen Effekte waren.

Um einen negativen Einfluss der hohen Ag-Einlaufkonzentrationen auf die Sulfidierung der Partikel zu überprüfen, wurden Versuche mit einer um den Faktor 10 verringerten Ag-Einlaufkonzentration und der zehnfachen Klärschlammmenge in Böden angesetzt, um Wirkgehalte zu erzielen. Die aufgetretenen Effekte lagen im Bereich der regulären Ansätze, sodass ein Einfluss der hohen Ag-Gehalte, beispielsweise durch zu langsame Sulfidierungsraten oder Effekte auf die SRB, unwahrscheinlich ist.

Die Versuche mit unter optimierten Laborbedingungen sulfidierten und synthetisierten Ag_2S -NM über den Klärschlammfad, aber auch direkt in Böden eingetragen, führten ebenfalls zu

ausgeprägten Effekten. Sie bestätigten somit die These, dass die Sulfidierung nicht zu einer vollständigen Detoxifizierung der AgNM führt. Die Löslichkeit scheint zwar herabgesetzt, aber über längere Zeit, die die Versuchszeiträume von Versuchen nach OECD oder DIN überschreitet, werden Toxizitätsschwellenwerte der Ionen überschritten und Effekte hervorgerufen. Die (Öko-) Toxizität von Materialien kann demnach nicht rein analytisch bzw. anhand von Literaturwerten ohne eine biologische Testung (Simulationsversuche) abgeschätzt werden.

In einer Freilandlysimeterstudie wurden über die Dauer von zwei Jahren Hemmungen von über 20 % auf die Nitrifikation und über 10 % auf die substratinduzierte Respiration bei einer Testkonzentration von 7,0 mg Ag/kg ermittelt. Im Vergleich dazu stiegen die Hemmungen der im Labor inkubierten Böden aus den Lysimetern an und resultierten in Hemmungen von 80 % auf die Nitrifikation und 30 % auf die substratinduzierte Respiration. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass es sich bei der Inkubation im Labor um ein geschlossenes System ohne Ein- oder Austrag handelt und sowohl Ag⁺-Ionen als toxische Substanz akkumulierte, und zusätzlich durch die Nitrifikation der Boden-pH-Wert abgesenkt wurde, was zum einen die Löslichkeit erhöht, zum anderen als zweiter Stressor für die Mikroorganismen wirkt. Im Gegensatz dazu fand im Freiland als offenes System ein Austausch mit Pflanzen, Fällungen und Sorption sowie ein Austrag über das Sickerwasser statt, sodass sich die Ag⁺- und Nährstoffverhältnisse regulierten. Die Laborversuche stellen damit ein „worst case-Szenario“ dar, das sich jedoch für eine Gefährdungsbeurteilung eignet. Die Effekte in der Lysimeterstudie zeigen, dass die AgNM trotz Sulfidierung während der Abwasserbehandlung bioverfügbar bleiben und über sehr lange Zeiträume negative Effekte hervorrufen.

Durch die Messung der Ag-Gesamtgehalte in Boden-, Sickerwasser- und Pflanzenproben zeigte sich eine Verfügbarkeit der AgNM, was sich in einem geringfügigen Austrag über das Sickerwasser, aber auch über die Aufnahme in Pflanzen darstellte. Eine Gefährdung des Grundwassers kann jedoch aufgrund der hohen eingesetzten Ag-Mengen und der geringen detektierten Mengen im Sickerwasser genauso ausgeschlossen werden wie ein Eintrag in die Nahrungskette, da Silber nur in der Wurzel der Feldfrüchte detektiert wurde und der Anbau von Wurzelgemüse auf klärschlammgedüngten Flächen in Deutschland gesetzlich ausgeschlossen ist.

8.2. Englisch

Silver nanomaterials (AgNM) find a broad application in different consumer products, especially for functionalizing of textiles, due to their antimicrobial properties. The discharge from textiles, the transport to wastewater treatment plants via sewer and their accumulation in the sewage sludges are uncontroversial. Despite the decreasing total amount of sludges, their usage as biosolids in agriculture is still an important way of waste management in the Federal Republic of Germany and Europe. Because of their high amount of nutrients with high plant availability, especially of the limited resource phosphorous, one third of the sewage sludges from German municipal wastewater treatment plants were applied on fields in 2010. The sewage sludge application is regulated by the German sewage sludge ordinance (AbfKlärV, 1992), which is currently being amended. Silver and AgNM are not regulated by this ordinance, thus uncontrolled immission in soil ecosystems is possible. One important issue which is discussed in this amendment is the reduction of pathogens by hygienisation. For this purpose several techniques are available where sludges with incorporated AgNM are treated physically and chemically. This may lead to different Ag species with different bioavailability.

There is diverse literature on toxic effects of AgNM on soil microorganisms (e.g. Hund-Rinke and Klawonn, 2012) as well as about sulfidation of AgNM in wastewater treatment plants (Kaegi et al., 2011). Short term studies with a regular duration of 28 to a maximum of 56 days, as described in OECD or DIN guidelines, have demonstrated the reduced bioavailability of sulfidized AgNM (e.g. Reinsch et al., 2012). However, long term studies over 140 days exhibit effects of AgNM applied via sewage sludge, which have the same magnitude of pristine AgNM after 28 days incubation time (Schlich et al., 2013). Another approach with anaerobic digested sludge indicated a reduced bioavailability (Schlich, 2013).

Based on these results, the aim of this dissertation was (I) to examine the influence of sewage sludge treatment on the bioavailability of AgNM, (II) to inspect the environmentally relevant factors which influence the important detoxifying mechanism of sulfidation of silver, and (III) to evaluate the consequence of AgNM immission under environmentally relevant conditions using outdoor lysimeters.

For this purpose simulation experiments with three experimental steps were conducted with a spherical AgNM (15 nm) and various reference materials. The reference material set consisted of two different Ag₂S NM, a nonNM Ag₂S and soluble AgNO₃. In a first step the waste water treatment was simulated to produce AgNM contaminated sludges, using either laboratory wastewater treatment plants over ten days or batches. During the waste water treatment plant simulation the degradation of dissolved organic carbon and organic nitrogen was determined. In the second step the sewage sludge treatment was simulated with four

approaches (direct application, hygienisation by liming, hygienisation by temperature and anaerobic digestion) followed by the agricultural usage of sewage sludge as the third step. The simulation of agricultural use was based on the German sewage sludge ordinance (AbfKlärV, 1992) that permits an application of 5 tons per hectare within three years. Referring to this ordinance 1.76 g Ag/kg sludge were mixed into soil and incubated for up to 196 days at 20 ± 1 °C. The bioavailability was examined conducting the potential ammonium oxidation test (ISO Guideline 15685, 2004) at regular intervals.

AgNM were applied via sewage sludge on lysimeter soils and incubated over 2 years, 3 growing seasons respectively. During this period a crop sequencing consisting of summer wheat, winter oilseed and winter barley was cultivated. In this lysimeter study, long-term effects on soil micro flora were compared with a parallel laboratory setup (contaminated lysimeter soil, but incubated in the laboratory). Additionally to these toxicity data, Ag concentrations in the leachate, soil and plant material (root, shoot, fruit) were analyzed to examine dislocation and plant uptake of silver.

In spite of the high Ag concentrations of 1 mg Ag/L in the influent, the sewage treatment plants were not affected in terms of degradation of organic nitrogen and carbon compounds. The results from the long-term studies over 140 till 196 days showed no influence on the bioavailability of AgNM. The differences in nitrification between the AgNM treatments compared to the control treatments were significant in the setups after direct application, hygienisation by temperature and anaerobic digestion. The AgNM treatments were more than 50 % inhibited compared with their controls. Only the setups after hygienisation by liming showed reduced inhibitions, but this can be related to a lower solubility at higher pH values and the better conditions for the soil microflora due to the liming procedure, which is rather a short- to mid-term remediation of soil than a real detoxification of AgNM.

Due to the reduced effects reported in literature and the low solubility of Ag₂S, sulfidation is expected to be the most important process for long-term detoxification of AgNM. Different approaches were conducted to test if formation of Ag₂S was hindered, which could explain the effects seen in former studies. In three independent studies it was shown that on the one hand there was enough reducible sulfur for a complete sulfidation and on the other hand sulfur reducing bacteria were present and active to produce the sulfide over 10 days (wastewater treatment = direct application) or 45 days (wastewater treatment and anaerobic digestion). The digestion procedure did not lead to reduced effects, instead the magnitude of effects increased due to higher Ag concentrations in sludge after degradation of organic matter and an accumulation of Ag residue during the digestion.

TEM EDX analysis revealed that the particles were completely sulfidized after the wastewater treatments, the sulfur addition and sewage sludge treatment did not further alter

their speciation. Therefore the sewage sludge treatment has direct impact on the bioavailability of AgNM. After the long-term incubation, TEM EDX analysis indicated the instability of Ag₂S particles. These particles might have a different solubility than highly crystalline Ag₂S explaining the strong effects.

To examine a possible negative impact of the high Ag concentrations in the influent, an experimental approach with a influent concentration reduced by factor of ten and a ten times higher amount of sludge, to reach ecotoxicological relevant concentrations in soil, was conducted. The effects in these studies were in the same range as effects of the regular approach. Thus, a negative impact of the high AgNM amount, for example by toxic effects or too slow sulfidation rates can be excluded.

Ag₂S NM, sulfidized or synthesized in the laboratory also inhibited the soil nitrification process strongly when applied via sewage sludge as well as pristine material. Therefore it can be stated that the sulfidation did not lead to a complete detoxification of AgNM. The solubility seems to be drastically reduced but over a longer incubation time than recommended in OECD or DIN guidelines the Ag⁺-ion concentration exceeds trigger level. According to this, the (eco) toxicity of materials cannot be determined only by literature and analytical testing without biological testing in simulation experiments.

The lysimeter study revealed a constant inhibition of more than 20 % on the nitrification and more than 10 % on the respiratory activity in soil at concentrations of 7 mg Ag/kg over two years. In contrast, the inhibitions of the incubated soils from the laboratory increased over the test period and resulted in 80 % effect on the nitrification and 30 % on the respiration respectively. This could be explained by the difference in the test setup, the laboratory incubation as a closed system without any in- or output and an accumulation of Ag⁺-ions besides the decreasing pH-values which lead to both, a higher solubility of Ag and worse conditions for the microorganisms. In contrast Ag⁺-ions and nutrients in the outdoor lysimeters were regulated by exchange with plants, discharge by soil water and sorption to soil colloids or precipitation. Regarding this it can be concluded that laboratory studies represent a „worst case-scenario“, which nevertheless is an appropriate tool for the risk assessment of nanomaterials. Effects in the outdoor experiment demonstrate that AgNM stay bioavailable and may cause effects on a very long term - even after sulfidation.

The determination of silver concentrations in soil, leachate, and plant samples revealed the bioavailability of AgNM by the slight discharge over the leachate and plant uptake into the roots. Due to the low detected amounts the danger of groundwater contamination is not evident. AgNM entering the food chain was also not relevant, because Ag was only detected in the roots and the cultivation of root vegetables on sludge fertilized fields is prohibited in Germany.

9. Literaturverzeichnis

- ABFKLÄRV 1992. Deutsche Klärschlammverordnung. 15. April 1992 (BGBl. I S. 912): 15. April 1992 (BGBl. I S. 912).
- ABFKLÄRV §6 ABSATZ 1 1992. Deutsche Klärschlammverordnung. 15. April 1992 (BGBl. I S. 912).
- AD-HOC-AG, B. 2005. Bodenkundliche Kartieranleitung. *Auflage, Hannover*.
- BADAWY, A. M. E., LUXTON, T. P., SILVA, R. G., SCHECKEL, K. G., SUIDAN, M. T. & TOLAYMAT, T. M. 2010. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspension. *Environ Sci Technol*, 44, 1260 - 1266.
- BENN, T., CAVANAGH, B., HRISTOVSKI, K., POSNER, J. D. & WESTERHOFF, P. 2010. The release of nanosilver from consumer products used in the home. *J Environ Qual*, 39, 1875-82.
- BENN, T. M. & WESTERHOFF, P. 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ Sci Technol*, 42, 4133-9.
- BERGS, C. G. 2010. Neuerungen im Abfall-Düngerecht - Auswirkungen auf die Verwertung und Beseitigung von Klärschlamm. *VDI-Fachkonferenz Offenbach*.
- BERNHARD, C. 2013. Dissertation: *Erprobung und Vergleich der 3-Phasen-Extraktion - Bewertung belasteter Flächen auf Basis der Verfügbarkeit von Kontaminanten*. FU Berlin. http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000093916
- BLASER, S. A., SCHERINGER, M., MACLEOD, M. & HUNGERBUHLER, K. 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment*, 390, 396-409.
- BLUME, H.-P., BRÜMMER, G. W., HORN, R., KANDELER, E., KÖGEL-KNABNER, I., KRETZSCHMAR, R., STAHR, K., WILKE, B.-M. & SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG, -. S. 2010. *Scheffer / Schachtschabel Lehrbuch der Bodenkunde*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- BRADHAM, K. D., DAYTON, E. A., BASTA, N. T., SCHRODER, J., PAYTON, M. & LANNO, R. P. 2006. Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to earthworms. *Environ Toxicol Chem*, 25, 769-75.
- BRÜGGEMANN, M. 2015. Masterthesis: *Einfluss verschiedener Konservierungsmaßnahmen für Wässrige Proben auf die Ökotoxizität von Silbernanomaterialien in Kläranlagenausläufen*. M. Sc., Justus Liebig Universität Gießen. <http://publica.fraunhofer.de/dokumente/N-426075.html>
- BUNDESAMT, S. 2016. Abwasserbehandlung - Klärschlamm Ergebnisbericht. *Umwelt*. Wiesbaden: Statistischen Bundesamt.
- BURKHARDT, M., ENGLERT, A., ITEN, R. & SCHÄRER, S. 2011a. Entsorgung nanosilberhaltiger Abfälle in der Textilindustrie - Massenflüsse und Behandlungsverfahren -. Rapperswil, Schweiz: Forschungsbericht, HSR Hochschule für Technik.
- BURKHARDT, M., ENGLERT, A., ITEN, R. & SCHÄRER, S. 2011b. Entsorgung nanosilberhaltiger Abfälle in der Textilindustrie - Massenflüsse und Behandlungsverfahren. Forschungsbericht, HSR Hochschule für Technik, Rapperswil, Schweiz.
- BURKHARDT, M., ZULEEG, S., KÄGI, R., SINNET, B., EUGSTER, J., BOLLER, M. & SIEGRIST, H. 2010. Verhalten von Nanosilber in Kläranlagen und dessen Einfluss auf die Nitrifikationsleistung in Belebtschlamm. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 22, 529-540.
- CAPIZZI-BANAS, S., DELOGE, M., REMY, M. & SCHWARTZBROD, J. 2004. Liming as an advanced treatment for sludge sanitisation: helminth eggs elimination - Ascaris eggs as model. *Water Research*, 38, 3251-3258.

- CHALOUPKA, K., MALAM, Y. & SEIFALIAN, A. M. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol*, 28, 580-8.
- CHEN, R., NUHFER, N. T., MOUSSA, L., MORRIS, H. R. & WHITMORE, P. M. 2008. Silver sulfide nanoparticle assembly obtained by reacting an assembled silver nanoparticle template with hydrogen sulfide gas. *Nanotechnology*, 19.
- COLLIN, B., OOSTVEEN, E., TSYUSKO, O. V. & UNRINE, J. M. 2014. Influence of natural organic matter and surface charge on the toxicity and bioaccumulation of functionalized ceria nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol*, 48, 1280-9.
- COLMAN, B. P., ARNAOUT, C. L., ANCIAUX, S., GUNSCH, C. K., HOHELLA, M. F., JR., KIM, B., LOWRY, G. V., MCGILL, B. M., REINSCH, B. C., RICHARDSON, C. J., UNRINE, J. M., WRIGHT, J. P., YIN, L. & BERNHARDT, E. S. 2013. Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario. *PLoS One*, 8, e57189.
- CORNELIS, G., HUND-RINKE, K., KUHLBUSCH, T. A. J., VAN DEN BRINK, N. & NICKEL, C. 2014. Fate and bioavailability of engineered nanoparticles in soils: a review. *Environ Sci Technol*, DOI: 10.1080/10643389.2013.829767.
- CUPI, D., HARTMANN, N. B. & BAUN, A. 2015. The influence of natural organic matter and aging on suspension stability in guideline toxicity testing of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles with *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*, 34, 497-506.
- DAR, S. A., YAO, L., VAN DONGEN, U., KUENEN, J. G. & MUYZER, G. 2007. Analysis of diversity and activity of sulfate-reducing bacterial communities in sulfidogenic bioreactors using 16S rRNA and *dsrB* genes as molecular markers. *Appl Environ Microbiol*, 73, 594-604.
- DIN 4049 1992. DIN 4049-1:1992-12 : Hydrologie; Grundbegriffe *In*: DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (ed.). Berlin, Deutschland.
- DIN 38402-11 2009. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge - General information (group A) - Part 11: Sampling of waste water (A 11). *In*: BEUTH-VERLAG (ed.). Berlin, Germany.
- DIN 38414-7 1983. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge, sludge and sediments (Group S), Digestion using Aqua Regia for Subsequent Determination of the Acid-Soluble Portion of Metals (S7). *In*: BEUTH-VERLAG (ed.). Berlin, Germany.
- DIN EN ISO 17402 2008. Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials (ISO 17402:2008);. *In*: STANDARDIZATION, I. O. F. (ed.). Genf, Schweiz.
- DIN ISO 10390 2005. Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des pH-Wertes. *In*: DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (ed.). Berlin, Deutschland.
- DIN ISO 11465 1996. DIN ISO 11465:1996-12 Soil quality - Determination of dry matter and water content on a mass basis - Gravimetric method (ISO 11465:1993). *In*: INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ed.). Genf, Schweiz.
- DONNER, E., HOWARD, D. L., DE JONGE, M. D., PATERSON, D., CHEAH, M. H., NAIDU, R. & LOMBI, E. 2011. X-ray absorption and micro X-ray fluorescence spectroscopy investigation of copper and zinc speciation in biosolids. *Environ Sci Technol*, 45, 7249-57.
- DONNER, E., SCHECKEL, K., SEKINE, R., POPELKA-FILCOFF, R. S., BENNETT, J. W., BRUNETTI, G., NAIDU, R., MCGRATH, S. P. & LOMBI, E. 2015. Non-labile silver species in biosolids remain stable throughout 50 years of weathering and ageing. *Environ Pollut*, 205, 78-86.
- DURENKAMP, M., PAWLETT, M., RITZ, K., HARRIS, J. A., NEAL, A. L. & MCGRATH, S. P. 2016. Nanoparticles within WWTP sludges have minimal impact on leachate quality and soil microbial community structure and function. *Environmental Pollution*, 211, 399-405.

- DWA, D. V. F. W., ABWASSER UND ABFALL E. V. 2010a. Stand der Klärschlamm-Desinfektion im Jahr 2010; Arbeitsbericht der DWA-Arbeitsgruppe AK-2.2 „Entseuchung“. *Korrespondenz Abwasser, Abfall*.
- DWA, D. V. F. W., ABWASSER UND ABFALL E. V. 2010b. Positionen zur Klärschlamm Entsorgung.
- EGERTON, R. F. 2005. *Physical principles of electron microscopy*, Springer.
- ELSTNER, P., HAHN, A., MARTINETZ, D., SCHNABEL, M., STROBEL, U., TAEGLICH, H.-J., LOHS, K. & STEPHAN, U. 1990. *Fachlexikon Toxikologie*, Springer-Verlag.
- EUROPÄISCHE_UNION 2011. Empfehlung der Kommission vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien. *Amtsblatt der Europäischen Union*.
- EUROPEAN CHEMICALS AGENCY 2008. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment. Helsinki, Finnland: ECHA.
- EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY, E. 2001. Sewage sludge - a future waste problem?
- FARKAS, J., PETER, H., CHRISTIAN, P., GALLEGU URREA, J. A., HASSELLOV, M., TUORINIEMI, J., GUSTAFSSON, S., OLSSON, E., HYLLAND, K. & THOMAS, K. V. 2011. Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environ Int*, 37, 1057-62.
- FENT, K. 2007. Ökotoxikologie–Umweltchemie. *Toxikologie, Ökologie.–288 p., Stuttgart, New York*.
- GARDEA-TORRESDEY, J. L., RICO, C. M. & WHITE, J. C. 2014. Trophic transfer, transformation, and impact of engineered nanomaterials in terrestrial environments. *Environ Sci Technol*, 48, 2526-40.
- GERANIO, L., HEUBERGER, M. & NOWACK, B. 2009. The Behaviour of Silver Nanotextiles during Washing. *Environ Sci Technol*, 43, 8113-8118.
- GOTTSCHALK, F., SONDERER, T., SCHOLZ, R. W. & NOWACK, B. 2009. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environ Sci Technol*, 43, 9216 - 9222.
- GREIM, H. & DEML, E. 2005. *Toxikologie: eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner*, Wiley-VCH [Imprint].
- HAGENDORFER, H., LORENZ, C., KAEGI, R., SINNET, B., GEHRIG, R., GOETZ, N. V., SCHERINGER, M., LUDWIG, C. & ULRICH, A. 2010. Size-fractionated characterization and quantification of nanoparticle release rates from a consumer spray product containing engineered nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 2481-2494.
- HÄNSCH, M. & EMMERLING, C. 2010. Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173, 554-558.
- HOPPE, M., MIKUTTA, R., UTERMANN, J., DUIJNISVELD, W. & GUGGENBERGER, G. 2014. Retention of sterically and electrosterically stabilized silver nanoparticles in soils. *Environ Sci Technol*, 48, 12628-35.
- HOPPE, M., MIKUTTA, R., UTERMANN, J., DUIJNISVELD, W., KAUFHOLD, S., STANGE, C. F. & GUGGENBERGER, G. 2015. Remobilization of sterically stabilized silver nanoparticles from farmland soils determined by column leaching. *European Journal of Soil Science*, 66, 898-909.
- HUND-RINKE, K. & KLAWONN, T. 2012. Investigation of widely used nanomaterials (TiO₂, Ag) and gold nanoparticles in standardised ecotoxicological tests. Project No. (FKZ) 3709 65 416. *Federal Environmental Agency*.
- HUND-RINKE, K., MARSCHIEDER-WEIDEMANN, F. & KEMPER, M. 2008. Beurteilung der Gesamtumweltexposition von Silberionen aus Biozid-Produkten, FKZ 36004020. In: *UMWELTBUNDESAMT* (ed.). Berlin, Deutschland.
- HUND-RINKE, K. & SCHLICH, K. 2014. The potential benefits and limitations of different test procedures to determine the effects of Ag nanomaterials and AgNO₃ on microbial nitrogen transformation in soil. *Environmental Sciences Europe*, 26.
- HYPERSOIL.UNI.MUENSTER.DE. 2004. <http://hypersoil.uni-muenster.de/Glossar/index.htm#Bodenfauna> [Online]. [Zugriff 17.02.2017].

- IMPELLITTERI, C. A., HARMON, S., SILVA, R. G., MILLER, B. W., SCHECKEL, K. G., LUXTON, T. P., SCHUPP, D. & PANGULURI, S. 2013. Transformation of silver nanoparticles in fresh, aged, and incinerated biosolids. *Water Res*, 47, 3878-86.
- IMPELLITTERI, C. A., TOLAYMAT, T. M. & SCHECKEL, K. G. 2009. The speciation of silver nanoparticles in antimicrobial fabric before and after exposure to a hypochlorite/detergent solution. *J Environ Qual*, 38, 1528-30.
- ISO GUIDELINE 11466 1995. Soil quality - Extraction of trace elements soluble in aqua regia. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ed.). Geneva, Switzerland.
- ISO GUIDELINE 15685 2004. Soil quality – determination of potential nitrification and inhibition of nitrification – rapid test by ammonium oxidation. Genf, Schweiz: International Organization for Standardization.
- ISO GUIDELINE 17512-1 2008. Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). In: INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ed.). Genf, Schweiz.
- ISO GUIDELINE 18512 2007. Soil quality - Guidance on long and short term storage of soil samples. International Organization for Standardization, Genf, Schweiz.
- ISO/TS 22939 2010. Bodenbeschaffenheit. Messung von Enzymaktivitätsmustern in Bodenproben mit fluorogenen Substraten in Mikrotiterplatten. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ed.). Genf, Schweiz.
- JOHNSEN, A. R., WICK, L. Y. & HARMS, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133, 71-84.
- JUDY, J. D., KIRBY, J. K., CREAMER, C., MCLAUGHLIN, M. J., FIEBIGER, C., WRIGHT, C., CAVAGNARO, T. R. & BERTSCH, P. M. 2015. Effects of silver sulfide nanomaterials on mycorrhizal colonization of tomato plants and soil microbial communities in biosolid-amended soil. *Environmental Pollution*, 206, 256-263.
- KAEGI, R., SINNET, B., ZULEEG, S., HAGENDORFER, H., MUELLER, E., VONBANK, R., BOLLER, M. & BURKHARDT, M. 2010. Release of silver nanoparticles from outdoor facades. *Environ Pollut*, 158, 2900-5.
- KAEGI, R., VOEGELIN, A., ORT, C., SINNET, B., THALMANN, B., KRISMER, J., HAGENDORFER, H., ELUMELU, M. & MUELLER, E. 2013. Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water Res*, 47, 3866-77.
- KAEGI, R., VOEGELIN, A., SINNET, B., ZULEEG, S., HAGENDORFER, H., BURKHARDT, M. & SIEGRIST, H. 2011. Behavior of Metallic Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science & Technology*, 45, 3902-3908.
- KENT, R. D., OSER, J. G. & VIKESLAND, P. J. 2014. Controlled evaluation of silver nanoparticle sulfidation in a full-scale wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol*, 48, 8564-72.
- KIM, B., PARK, C.-S., MURAYAMA, M. & HOHELLA, M. F. 2010. Discovery and Characterization of Silver Sulfide Nanoparticles in Final Sewage Sludge Products. *Environmental Science & Technology*, 44, 7509-7514.
- KLAGES, S., SCHULTHEIß, D. U., FREI, T., BECKER, C., DÖHLER, H., SCHNEIDER, U. & HABERKERN, B. 2009. Anforderungen an die Novellierung der Klärschlammverordnung unter besonderer Berücksichtigung von Hygieneparametern.
- KLÄRANLAGE_SCHMALLENBERG. 2014. *Verwendung von Flockungsmitteln. Persönliche Mitteilung vom 04.02.2014.*
- KLEIN, C. L., COMERO, S., STAHLMECKE, B., ROMAZANOV, J., KUHLEBUSCH, T. A. J., VAN DOREN, E., DE TEMMERMAN, P.-J., MAST, J., WICK, P., KRUG, H., LOCORO, G., HUND-RINKE, K., KÖRDEL, W., FRIEDRICH, S., MAIER, G., WERNER, J., LINGSINGER, T. & GAWLIK, B. M. 2011. NM-Series of Representative Manufactured Nanomaterials NM-300 Silver Characterisation, Stability, Homogeneity. *JRC Scientific and Technical Reports*.
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC60709>.
- KOALITIONSVERTRAG 2013. Koalitionsvertrag zwischen CDU, CSU UND SPD. Union Betriebs-GmbH, Rheinbach, Best-Nr: 5283.

- KULA, C. & RÖMBKE, J. 1998. Testing organic matter decomposition within risk assessment of plant protection products. *Environmental Science Pollution Research*, 5, 55-60.
- KULTHONG, K., SRISUNG, S., BOONPAVANITCHAKUL, K., KANGWANSUPAMONKON, W. & MANIRATANACHOTE, R. 2010. Determination of silver nanoparticle release from antibacterial fabrics into artificial sweat. *Part Fibre Toxicol*, 7, 8.
- KUMARI, P., CHANDRAN, P. & KHAN, S. S. 2014. Synthesis and characterization of silver sulfide nanoparticles for photocatalytic and antimicrobial applications. *J Photochem Photobiol B*, 141, 235-40.
- LANGDON, K. A., MCLAUGHLIN, M. J., KIRBY, J. K. & MERRINGTON, G. 2014. The effect of soil properties on the toxicity of silver to the soil nitrification process. *Environ Toxicol Chem*, 33, 1170-8.
- LANNO, R., WELLS, J., CONDER, J., BRADHAM, K. & BASTA, N. 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicol Environ Saf*, 57, 39-47.
- LEVAR, C., HOTZE, E. M., COLMAN, B. P., DALE, A. L., TRUONG, L., YANG, X. Y., BONE, A. J., BROWN, G. E., TANGUAY, R. L., DI GIULIO, R. T., BERNHARDT, E. S., MEYER, J. N., WIESNER, M. R. & LOWRY, G. V. 2013. Sulfidation of Silver Nanoparticles: Natural Antidote to Their Toxicity. *Environmental Science & Technology*, 47, 13440-13448.
- LEVAR, C., REINSCH, B. C., MICHEL, F. M., OUMAH, C., LOWRY, G. V. & BROWN, G. E. 2011. Sulfidation processes of PVP-coated silver nanoparticles in aqueous solution: impact on dissolution rate. *Environ Sci Technol*, 45, 5260-6.
- LIANG, Y., BRADFORD, S. A., SIMUNEK, J., HEGGEN, M., VERECKEN, H. & KLUMPP, E. 2013. Retention and remobilization of stabilized silver nanoparticles in an undisturbed loamy sand soil. *Environ Sci Technol*, 47, 12229-37.
- LIU, J., PENNELL, K. G. & HURT, R. H. 2011. Kinetics and mechanisms of nanosilver oxysulfidation. *Environ Sci Technol*, 45, 7345-53.
- LOMBI, E., DONNER, E., TAHERI, S., TAVAKKOLI, E., JÄMTING, Å. K., MCCLURE, S., NAIDU, R., MILLER, B. W., SCHECKEL, K. G. & VASILEV, K. 2013. Transformation of four silver/silver chloride nanoparticles during anaerobic treatment of wastewater and post-processing of sewage sludge. *Environ. Pollut.*, 176, 193.
- LORENZ, C., WINDLER, L., VON GOETZ, N., LEHMANN, R. P., SCHUPPLER, M., HUNGERBUHLER, K., HEUBERGER, M. & NOWACK, B. 2012. Characterization of silver release from commercially available functional (nano)textiles. *Chemosphere*, 89, 817-24.
- LOWRY, G. V., ESPINASSE, B. P., BADIREDDY, A. R., RICHARDSON, C. J., REINSCH, B. C., BRYANT, L. D., BONE, A. J., DEONARINE, A., CHAE, S., THEREZIEN, M., COLMAN, B. P., HSU-KIM, H., BERNHARDT, E. S., MATSON, C. W. & WIESNER, M. R. 2012. Long-term transformation and fate of manufactured ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland. *Environ Sci Technol*, 46, 7027-36.
- MA, R., LEVAR, C., JUDY, J. D., UNRINE, J. M., DURENKAMP, M., MARTIN, B., JEFFERSON, B. & LOWRY, G. V. 2014. Fate of zinc oxide and silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant and in processed biosolids. *Environ Sci Technol*, 48, 104-12.
- MACHOLZ, R. M., KAISER, D. B., KÖRDEL, W., HUND-RINKE, K., DERZ, K. & BERNHARDT, C. 2011. Evaluierung vorhandener Bewertungsansätze und Entwicklung eines Konzepts zur integrierten Wirkungsbewertung prioritärer Schadstoffe über alle Pfade auf der Grundlage der Bioverfügbarkeit, FKZ 370872200. In: UMWELTBUNDESAMT (ed.). Dessau-Roßlau.
- MOREL, F. M. M. & HERING, J. G. 1993. *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*, New York, A. Wiley.
- MORONES, J. R., ELECHIGUERRA, J. L., CAMACHO, A., HOLT, K., KOURI, J. B., RAMIREZ, J. T. & YACAMAN, M. J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346-53.

- MÜLHARDT, C. 2013. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- NAVARRO, D. A., KIRBY, J. K., MCLAUGHLIN, M. J., WADDINGTON, L. & KOOKANA, R. S. 2014. Remobilisation of silver and silver sulphide nanoparticles in soils. *Environ Pollut*, 193, 102-10.
- NCBI. 2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Zugriff am 04.05.2016].
- NO.1, O. 1997. OECD No.1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (as revised in 1997. *OECD SERIES ON PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE AND COMPLIANCE MONITORING Number 1*). Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- NOWACK, B., BAALOUSHA, M., BORNHOFT, N., CHAUDHRY, Q., CORNELIS, G., COTTERILL, J., GONDIKAS, A., HASSELLOV, M., LEAD, J., MITRANO, D. M., VON DER KAMMER, F. & WONTNER-SMITH, T. 2015. Progress towards the validation of modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials by analytical measurements. *Environmental Science: Nano*, 2, 421-428.
- OECD GUIDELINE 208 2006. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD GUIDELINE 216 2000. OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD GUIDELINE 217 2000. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test Guideline 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD GUIDELINE 222 2004. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*). Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD GUIDELINE 303A 2001. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 303: Simulation Test - Aerobic Sewage Treatment -- A: Activated Sludge Units; B: Biofilms. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OEHLMANN, J. & MARKERT, B. 1997. *Humantoxikologie: eine Einführung für Apotheker, Ärzte, Natur-und Ingenieurwissenschaftler; mit 30 Tabellen*, Wiss. Verlag-Ges.
- PAN, B. & XING, B. 2012. Applications and implications of manufactured nanoparticles in soils: a review. *European Journal of Soil Science*, 63, 437-456.
- PEIJNENBURG, W. J., POSTHUMA, L., EIJSACKERS, H. J. & ALLEN, H. E. 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol Environ Saf*, 37, 163-72.
- PICCAPIETRA, F., SIGG, L. & BEHRA, R. 2012. Colloidal stability of carbonate-coated silver nanoparticles in synthetic and natural freshwater. *Environ Sci Technol*, 46, 818-25.
- PICCINNO, F., GOTTSCHALK, F., SEEGER, S. & NOWACK, B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14.
- PIETSCH, M., YVONNE SCHLEUSNER, MÜLLER, P., RENÉ ELING, WERNER PHILIPP & HOELZLE, L. E. 2015.
- PITERINA, A. V., BARTLETT, J. & PEMBROKE, T. J. 2010. Evaluation of the removal of indicator bacteria from domestic sludge processed by Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion (ATAD). *Int J Environ Res Public Health*, 7, 3422-41.
- PRADAS DEL REAL, A. E., CASTILLO-MICHEL, H., KAEGI, R., SINNET, B., MAGNIN, V., FINDLING, N., VILLANOVA, J., CARRIERE, M., SANTAELLA, C., FERNANDEZ-MARTINEZ, A., LEVARD, C. & SARRET, G. 2016. Fate of Ag-NPs in Sewage Sludge after Application on Agricultural Soils. *Environ Sci Technol*, 50, 1759-68.
- QLA, Q. L. A. 2013. Qualitäts- und Prüfbestimmungen für Klärschlämme der VDLUFA-Gesellschaft für Qualitätssicherung Landbauliche Abfallverwertung mbH, Rheinbach; (VDLUFA-QLA GmbH).

- REINSCH, B. C., LEVARD, C., LI, Z., MA, R., WISE, A., GREGORY, K. B., BROWN, G. E. & LOWRY, G. V. 2012. Sulfidation of Silver Nanoparticles Decreases Escherichia coli Growth Inhibition. *Environmental Science & Technology*, 46, 6992-7000.
- RESCH, H. & SCHATZ, R. 2010. *Abwassertechnik Verstehen*, München, F. Hirthammer.
- SACACA C., S., IÑIGUEZ R., V. & ROULET, M. 2009. Diversidad y distribución de bacterias sulfato reductoras en sedimentos de lagunas de la cuenca Milluni contaminada por desechos mineros. *BIOFARBO*, 17, 39-50.
- SCHERINGER, M., MACLEOD, M., BEHRA, R., SIGG, L. & HUNGERBUHLER, H. 2010. Environmental risks associated with nanoparticulate silver used as biocide. *Household Pers Care Today*, 1, 34–37.
- SCHLICH, K. 2013. Dissertation: *Untersuchungen zur ökotoxikologischen Wirkung von Silbernanopartikeln – Der Weg von der Kläranlage bis zum Eintrag in landwirtschaftliche Flächen*. FU Berlin.
http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000093858
- SCHLICH, K. & HUND-RINKE, K. 2015. Influence of soil properties on the effect of silver nanomaterials on microbial activity in five soils. *Environmental Pollution*, 196, 321-330.
- SCHLICH, K., KLAWONN, T., TERYTZE, K. & HUND-RINKE, K. 2013. Hazard assessment of a silver nanoparticle in soil applied via sewage sludge. *Environmental Sciences Europe*, 25, 17.
- SEKINE, R., BRUNETTI, G., DONNER, E., KHAKSAR, M., VASILEV, K., JAMTING, A. K., SCHECKEL, K. G., KAPPEN, P., ZHANG, H. & LOMBI, E. 2015. Speciation and lability of Ag-, AgCl-, and Ag₂S-nanoparticles in soil determined by X-ray absorption spectroscopy and diffusive gradients in thin films. *Environ Sci Technol*, 49, 897-905.
- SHAFER, M. M., OVERDIER, J. T. & ARMSTONG, D. E. 1998. Removal, partitioning, and fate of silver and other metals in wastewater treatment plants and effluent-receiving streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 630-641.
- SODHI, R. N. 2004. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS):— versatility in chemical and imaging surface analysis. *Analyst*, 129, 483-487.
- STARNES, D. L., UNRINE, J. M., STARNES, C. P., COLLIN, B. E., OOSTVEEN, E. K., MA, R., LOWRY, G. V., BERTSCH, P. M. & TSYUSKO, O. V. 2015. Impact of sulfidation on the bioavailability and toxicity of silver nanoparticles to *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 196, 239-246.
- STEGEMEIER, J. P., SCHWAB, F., COLMAN, B. P., WEBB, S. M., NEWVILLE, M., LANZIROTTI, A., WINKLER, C., WIESNER, M. R. & LOWRY, G. V. 2015. Speciation Matters: Bioavailability of Silver and Silver Sulfide Nanoparticles to Alfalfa (*Medicago sativa*). *Environ Sci Technol*, 49, 8451-60.
- STREIT, B. 1991. *Lexikon Ökotoxikologie*, VCH.
- TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN 2011. Standard Operating Procedure - Empfehlung zur Herstellung und Handhabung von Silbernanopartikel-Suspensionen.
- TERYTZE, K., WAGNER, R., SCHATTEN, R., VOGEL, I., HUND-RINKE, K., KAISER, D. B., WORZYK, F., FRIEDE, K., KÖRDEL, W., MACHOLZ, R., LIESE, M., ROTARD, W. & SUSCHKE, B. 2011. *Handlungsanleitung-Untersuchung der Verfügbarkeit/Bioverfügbarkeit von organischen Schadstoffen zur Bewertung kontaminierter Flächen*, Aachen, Shaker.
- TERYTZE, K., WAGNER, R., VOGEL, I., SCHATTEN, R., HUND-RINKE, K., DERZ, K., BERNHARDT, C., ROTARD, W. & MACHOLZ, R. 2010. Bewertungsmaßstäbe zur Beurteilung von Schadstoffbelastungen in Böden anhand der Bioverfügbarkeit. *Environmental Sciences Europe*, 22, 63-67.
- TIEDE, K., BOXALL, A. B. A., WANG, X., GORE, D., TIEDE, D., BAXTER, M., DAVID, H., TEAR, S. P. & LEWIS, J. 2010. Application of hydrodynamic chromatography-ICP-MS to investigate the fate of silver nanoparticles in activated sludge. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25, 1149-1154.
- TOXRAT SOLUTIONS GMBH Online Version 2.09 und 2.10. ToxRat Professional - Statistische Auswertung von Biotests.

- USEPA. 2009. *Targeted national sewage sludge survey statistical analysis*. [Online]. Available: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-04/documents/tnsss_stat_anal_report_revised_april_2009.pdf [Zugriff 17.11.2016].
- VANCE, M. E., KUIKEN, T., VEJERANO, E. P., MCGINNIS, S. P., HOHELLA, M. F., JR., REJESKI, D. & HULL, M. S. 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol*, 6, 1769-80.
- VOELKER, D., SCHLICH, K., HOHNDORF, L., KOCH, W., KUEHNEN, U., POLLEICHTNER, C., KUSSATZ, C. & HUND-RINKE, K. 2015. Approach on environmental risk assessment of nanosilver released from textiles. *Environmental Research*, 140, 661-672.
- WANG, Y., WESTERHOFF, P. & HRISTOVSKI, K. D. 2012. Fate and biological effects of silver, titanium dioxide, and C60 (fullerene) nanomaterials during simulated wastewater treatment processes. *J Hazard Mater*, 201-202, 16-22.
- WHITLEY, A. R., LEVARD, C., OOSTVEEN, E., BERTSCH, P. M., MATOCHA, C. J., VON DER KAMMER, F. & UNRINE, J. M. 2013. Behavior of Ag nanoparticles in soil: effects of particle surface coating, aging and sewage sludge amendment. *Environ Pollut*, 182, 141-9.
- WIECHMANN, B., DIENEMANN, C., KABBE, C., BRANDT, S., VOGEL, I. & ROSKOCH, A. 2012. Klärschlamm Entsorgung in der Bundesrepublik Deutschland.
- WWW.WASSER-WISSEN.DE. 2000. <http://www.wasser-wissen.de/abwasserlexikon.htm>. [Zugriff 17.02.2017].
- XIU, Z. M., MA, J. & ALVAREZ, P. J. 2011. Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environ Sci Technol*, 45, 9003-8.
- YANG, Y., QUENSEN, J., MATHIEU, J., WANG, Q., WANG, J., LI, M. Y., TIEDJE, J. M. & ALVAREZ, P. J. J. 2014. Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than Ag⁺ on the microbial community structure of activated sludge. *Water Research*, 48, 317-325.
- YUAN, G. & CRANSTON, R. 2008. Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles. *Textile Research Journal*, 78, 60-72.

10. Anhang

Anhang 1:	Geräteliste	156
Anhang 2:	Chemikalienliste	159
Anhang 3:	Primer für die nestedPCR.....	162
Anhang 4:	Temperaturprogramm für die nestedPCR.....	162
Anhang 5:	Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 60 nach Direktapplikation und Hygienisierung durch Kalkung.	163
Anhang 6:	Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 90 nach Direktapplikation und Hygienisierung durch Kalkung.	164
Anhang 7:	Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 140 nach Direktapplikation und Hygienisierung durch Kalkung.	165
Anhang 8:	Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 60 nach Hygienisierung durch Pasteurisierung über eine und drei Stunden.	166
Anhang 9:	Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 90 nach Hygienisierung durch Pasteurisierung über eine und drei Stunden.	167
Anhang 10:	Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 140 nach Hygienisierung durch Pasteurisierung über eine und drei Stunden.	168
Anhang 11:	Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 60 nach Klärschlammfäulung über 25 und 35 Tage.	169
Anhang 12:	Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 60 nach Klärschlammfäulung über 25 und 35 Tage.	170
Anhang 13:	Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 60 nach Klärschlammfäulung über 25 und 35 Tage.	171
Anhang 14:	Respirationsaktivität als Freisetzungsrates von CO ₂ durch den Abbau spezifischer Substrate nach Direktapplikation und Hygienisierung durch Kalkung.	172

Anhang 15:	Respirationsaktivität als Freisetzungsrate von CO ₂ durch den Abbau spezifischer Substrate nach Hygienisierung durch Pasteurisierung über eine und drei Stunden.....	173
Anhang 16:	Respirationsaktivität als Freisetzungsrate von CO ₂ durch den Abbau spezifischer Substrate nach Klärschlammfäulung über 25 und 35 Tage.	174
Anhang 17:	Nicht quantitative Darstellung der Anwesenheit der SRB-Art <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> . Untersucht wurden die niedrigsten und höchsten Sulfatstufe der Kontrolle und der NM-300K-Behandlung. Bandenintensität nach einer nestedPCR im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle.....	175
Anhang 18:	Nicht quantitative Darstellung der Anwesenheit der SRB-Art <i>Desulfobulbus elongatus</i> . Untersucht wurden die niedrigsten und höchsten Sulfatstufe der Kontrolle und der NM-300K-Behandlung. Bandenintensität nach einer nestedPCR im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle.....	176
Anhang 19:	Nicht quantitative Darstellung der Anwesenheit der SRB-Art <i>Desulfococcus multivans</i> . Untersucht wurden die niedrigsten und höchsten Sulfatstufe der Kontrolle und der NM-300K-Behandlung. Bandenintensität nach einer nestedPCR im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle.....	177
Anhang 20:	Nicht quantitative Darstellung der Anwesenheit der SRB-Art <i>Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris</i> . Untersucht wurden die niedrigsten und höchsten Sulfatstufe der Kontrolle und der NM-300K-Behandlung. Bandenintensität nach einer nestedPCR im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle.....	178
Anhang 21:	Langzeitversuch 4 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Direktapplikation.....	179
Anhang 22:	Langzeitversuch 4 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit unterschiedlicher Sulfatzugaben nach Direktapplikation.....	179
Anhang 23:	Langzeitversuch 4 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Klärschlammfäulung.....	180
Anhang 24:	Langzeitversuch 4 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit unterschiedlicher Sulfatzugaben nach Klärschlammfäulung.....	180

Anhang 25:	TEM- Aufnahme des in synthetisierten Ag ₂ S-Nanomaterials.....	181
Anhang 26:	Größenverteilung (PSD) der Nanomaterialien NM-300K, Ag ₂ S NM und NM-300K Ag ₂ S (sulfidiert) mit Dynamic Light Scattering bestimmt.....	182
Anhang 27:	Größenverteilung (PSD) der Nanomaterialien NM-300K, Ag ₂ S NM und NM-300K Ag ₂ S (sulfidiert) mit TEM bestimmt.....	183
Anhang 28:	Sulfatreduzierende Bakterien (SRB) – DNA im Klär- und Faulschlamm der unbeaufschlagten Kontrolle, NM-300K- und der AgNO ₃ -Behandlungen zu Testbeginn der Kläranlagensimulation, Testende der Kläranlagensimulation und nach Ende der Klärschlammfäulung.....	184
Anhang 29:	Bakterien cDNA im Klär- und Faulschlamm der unbeaufschlagten Kontrolle, NM-300K und der Ag ₂ S NonNM Behandlungen zu Testbeginn der Kläranlagensimulation, Testende der Kläranlagensimulation und nach Ende der Klärschlammfäulung.	185
Anhang 30:	Bakterien cDNA im Klär- und Faulschlamm der unbeaufschlagten Kontrolle, AgNO ₃ , Ag ₂ S NM und der NM-300K Ag ₂ S Behandlungen zu Testende der Kläranlagensimulation und nach Ende der Klärschlammfäulung.	186
Anhang 31:	pH-Werte der Böden der Lysimeterstudie unterteilt in Böden die im Freiland und die im Labor inkubiert wurden.	187

Anhang 1: Geräteliste

Geräteliste

Gerät	Hersteller (Name Sitz)
“glow discharge system”	ELMO (<10-1 mbar, 2,5 mA, 30 Sek), Cordouan Technologies, Pessac, Frankreich
Autoklav	DX 65, Systec GmbH, Linden, Deutschland
Beater	FastPrep®-24 Instrument, Santa Ana, USA
Drucksprühgerät	GLORIA Haus- und Gartengeräte GmbH, Witten, Deutschland
EDX System	EDAX, Mahwah, USA
Gefriertrocknung	Alpha 1-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland)
Halogentrockner	HB 43, Mettler Toledo, Columbus, USA
ICP-MS	Agilent 7700; ICP-MS, 7500 Series, Agilent, Santa Clara, California, USA)
ICP-OES	Agilent 720, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) Ciros Vision, Spectro, Kleve, Deutschland
Inkubationsschrank	Universalschrank Dishwasher UFP800DW Memmert, Schwabach, Deutschland
Inkubationsschüttler	Multitron Pro, Infors Ag; Bottmingen, Schweiz
Klimakammer	Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen, Deutschland
Klimaschrank	Heratherm Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kohlenstoff Analyzer	TOC V _{PCH} mit ASI-V, Shimadzu, Kyoto, Japan
Kühlschrank	Comfort Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Laborkläranlage	behrotest® Laborkläranlage KLD 4N, behr Labortechnik GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Magnetrührer mit Heizung und Temperaturfühler	C-MAG HS 7, PT 1000, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Magnetrührern	Ika RH basic 2, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Plattenphotometer	Epoch Mikroplatten-Spektralphotometer Fa. BioTek Winooski, USA
Plattenphotometer	Synergy MX, BioTek Germany, Bad Friedrichshall, Deutschland
Sapromat	IBUK, Königsbronn, Deutschland
Sauerstoffelektroden mit Multiparameter Taschenmessgerät	CellOx® 325 mit ProfiLine Multi 3320, Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW, Weilheim, Deutschland
Scanning TEM	HD-2700-Cs, Hitachi Ltd. Corporation, Chiyoda, Japan
Schüttelinkubator	Celltron Infors Ag; Bottmingen, Schweiz
Schwermetall-Aufschlusseinheit	SMA20A, Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter Deutschland)
Spektrometer	NanoDrop2000, Wilmington, USA
Stößelmühle	RM 100, Retsch Technology GmbH, Haan, Deutschland
TEM grids	Carbon coated Cu grids, Quantifoil GmbH Jena, Deutschland holey carbon Cu grids, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Thermocycler	Prime Full Size, Techne Staffordshire, UK
Tiefgefrierschrank	Herafreeze basic, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ultra Turrax®	T 25 digital, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland

Ultraschallbad	RK 510, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
UV-Kammer	Gene Flash, Syngene, Cambridge, UK)
Vakuumbrottschränken	Heraeus VT5050EK, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
VialTweeter sonotrode, Ultrasonic processor	UP200St, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland
Waagen	PM32, Mettler Toledo, Columbus, USA; MSE5203S-100-RD Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen, Deutschland AUW 2200, Shimadzu Kyoto, Japan
Zentrifuge	Avanti J-26S, Beckman Coulter, Brea, USA

Anhang 2: Chemikalienliste

Chemikalie (ggf. Reinheit)	Hersteller (Name Sitz)
1-Oktanol (C ₈ H ₁₈ O) ≥99%	Sigma, St. Louis, USA
2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure (MES)	Sigma, St. Louis, USA
4-MUF-a-D-glucopyranosid	glycosynth, Cheshire, UK
4-MUF-N-acetyl-β-D-glucosaminid	glycosynth, Cheshire, UK
4-MUF-nonanoat	glycosynth, Cheshire, UK
4-MUF-phosphat	glycosynth, Cheshire, UK
4-MUF-β-cellobiopyranosid	glycosynth, Cheshire, UK
4-MUF-β-D-glucopyranosid	glycosynth, Cheshire, UK
4-MUF-β-D-xylopyranosid	glycosynth, Cheshire, UK
4-MUF-sulfat	glycosynth, Cheshire, UK
Agar	Merck, Darmstadt, Deutschland
bis-(4-MUF)-phosphat	glycosynth, Cheshire, UK
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, St. Louis, USA
Calciumcarbonat CaCO ₃ , ≥99.0%	Sigma, St. Louis, USA
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ * 2 H ₂ O)	Chemsolute®, TH.Geyer, Renningen, Deutschland
CaO puriss.	Sigma, St. Louis, USA
Compo Grünpflanzendünger“	Compo, Münster, Deutschland
D+ Glucosemonohydrat (C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Fluka, Sigma, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Chemsolute®, TH.Geyer, Renningen, Deutschland
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Chemsolute®, TH.Geyer, Renningen, Deutschland
Fleischextrakt	Sigma, St. Louis, USA
Formamid (CH ₃ NO)	Chemsolute®, TH.Geyer, Renningen, Deutschland

Hakaphos® soft plus 14+6+24+3;	Compo, Münster, Germany
Harnstoff (>99,5)	Sigma, St. Louis, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka, Sigma, St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Chemsolute®, TH.Geyer, Renningen, Deutschland
Kaolin	Erbslöh Lohrheim GmbH, Lohrheim, Deutschland
Kresol Rot	Sigma, St. Louis, USA
L-Alanin-AMC	glycosynth, Cheshire, UK
L-Leucin-AMC	glycosynth, Cheshire, UK
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ * 7 H ₂ O)	Sigma, St. Louis, USA
multi-element Merck IV Standard	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorat (NaClO ₃)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium EDTA (C ₁₀ H ₁₄ O ₈ N ₂ Na ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃ >99,0%)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumsulfat (NaSO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronkalk mit Indikator	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (C ₁₂ H ₁₄ N ₂ · 2HCl)	Sigma, St. Louis, USA
Ortho-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Chemsolute®, TH.Geyer, Renningen, Deutschland
Pepton from casein tryptic digested	Sigma, St. Louis, USA
Polyacrylamid (C ₃ H ₅ NO) _n	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Salpetersäure, HNO ₃ 69 % Suprapur	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salpetersäure, HNO ₃ , 65 %, Suprapur	Merck, Darmstadt, Deutschland)
Salzsäure HCl (30 %)	J.T.Baker, Center Valley, USA
SEDIFLOC 154	Kemira, Helsinki, Finnland
Sulfanilamid (C ₆ H ₈ N ₂ O ₂ S)GR for anal.	Merck, Darmstadt, Deutschland
SYBR®Gold	Invitrogen, Carlsbad, USA
Talkum	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Temed , for electrophoresis, ≥99.0%	
(N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma, St. Louis, USA
Tris (hydroxymethyl-) amionmethan 99,9 p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trizma-Base	Sigma, St. Louis, USA
Trizma-HCl	Sigma, St. Louis, USA

Anhang 3: Primer für die nestedPCR.

16S DNAr: FD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG); RP2
(ACGGCTACCTTGTTACGACTT)

Untergruppe 1 *Desulfotomaculum* (DFM): (TAGMICYGGGATAACRSYKG,
ATACCCSCWWCWCTAGCAC).

Untergruppe 2 *Desulfobulbus* (DBB): (CGCGTAGATAACCTGTCYTCATG,
GTAGKACGTGTGTAGCCCTGGTC).

Untergruppe 3 *Desulfobacterium* (DBM): (CTAATRCCGGATRAAGTCAG,
ATTCTCARGATGTCAAGTCTG).

Untergruppe 4 *Desulfobacter* (DSB): (GATAATCTGCCTTCAAGCCTGG,
CYYYYYGCRRAGTCGSTGCCCT).

Untergruppe 5 *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* (DCC-DNM-DSS):
(GATCAGCCACACTGGRACCTGACA, GGGGCAGTATCTTYAGAGTYC).

Untergruppe 6 *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (DSV-DMB): (GRGYCYGCGTYYCATTAGC,
SYCCGRCACTAGYRXYCATC)⁹.

Anhang 4: Temperaturprogramm für die nestedPCR.

		Temperatur [°C]	Zeit [min.]
Initiale Denaturierung		95	1
Denaturierung	30 Zyklen	94	1
Annealing		60	1
Elongation		72	1
End-Elongation		72	5

Anhang 5: Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 60 nach Direktapplikation und Hygienisierung durch Kalkung.

Tag 60	K Direkt		1 mg/kg NM-300K Direkt		P	K Kalk		1 mg/kg NM-300K Kalk		P
Substrat	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD		MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	
4-MUF-nonanoat	2932,6	169,5	2717,1	131,7	*	2463,6	87,1	2392,5	117,1	
4-MUF- β -D-cellobiopyranosid	86,2	69,2	31,9	75,1		80,0	44,1	53,7	48,6	
4-MUF- β -D-xylopyranosid	133,2	89,9	163,4	43,4		125,4	64,0	233,4	104,8	
4-MUF- α -D-glucopyranosid	443,3	330,9	723,1	77,1		802,0	108,0	688,9	103,9	
bis-(4-MUF)-phosph.	493,1	36,4	424,2	23,9		572,0	32,6	586,0	62,0	
4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminid	290,5	130,3	328,0	83,8		397,4	179,7	408,6	86,8	
4-MUF-phosphat	3739,6	422,7	3324,4	168,1		3261,1	258,8	3321,6	75,7	
L-Leucin-AMC	1364,5	131,1	1753,2	107,2		1802,9	69,4	1924,1	84,9	
L-Alanin-AMC	4310,8	236,7	4364,2	264,3		5009,7	248,7	5055,8	309,6	

Anhang 6: Enzymaktivität als Freisetzungsrate von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 90 nach Direktapplikation und Hygienisierung durch Kalkung.

Tag 90	K Direkt		1 mg/kg NM-300K Direkt		P	K Kalk		1 mg/kg NM-300K Kalk		P
Substrat	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD		MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	
4-MUF-nonanoat	6986,7	403,7	6473,3	313,7	*	5869,3	207,5	5700,0	279,1	
4-MUF- β -D-cellobiopyranosid	205,3	164,8	76,0	178,9		190,7	105,2	128,0	115,8	
4-MUF- β -D-xylopyranosid	317,3	214,2	389,3	103,5		298,7	152,5	556,0	249,6	
4-MUF- α -D-glucopyranosid	1056,0	788,3	1722,7	183,6		1910,7	257,3	1641,3	247,5	
bis-(4-MUF)-phosph.	1174,7	86,8	1010,7	56,9		1362,7	77,7	1396,0	147,6	
4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminid	692,0	310,5	781,3	199,7		946,7	428,1	973,3	206,8	
4-MUF-phosphat	8909,3	1007,1	7920,0	400,5		7769,3	616,6	7913,3	180,3	
L-Leucin-AMC	543,6	52,2	698,4	42,7		718,3	27,7	766,5	33,8	
L-Alanin-AMC	1717,4	94,3	1738,6	105,3		1995,8	99,1	2014,2	123,3	

Anhang 7: Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 140 nach Direktapplikation und Hygienisierung durch Kalkung.

Tag 140	K Direkt		1 mg/kg NM-300K Direkt		P	K Kalk		1 mg/kg NM-300K Kalk		P
Substrat	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$] 1]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD		MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	
4-MUF-nonanoat	6364,1	178,2	5413,9	275,1	***	5029,3	194,9	7008,6	321,1	
4-MUF- β -D-cellobiopyranosid	109,1	198,6	84,7	175,0		-21,5	187,9	129,2	168,9	
4-MUF- β -D-xylopyranosid	292,8	230,5	208,1	97,2		364,6	193,5	456,4	128,3	
4-MUF- α -D-glucopyranosid	1083,6	746,8	776,5	20,6		1195,6	363,1	1230,0	167,9	
bis-(4-MUF)-phosph.	1197,0	184,2	1010,4	94,0		1377,9	100,9	1298,9	121,9	
4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminid	661,7	129,8	556,9	309,4		755,0	38,8	1192,7	751,7	
4-MUF-phosphat	9805,9	1383,3	7597,0	447,4		8143,9	363,5	8610,3	395,2	
L-Leucin-AMC	711,2	116,8	483,6	66,8		782,5	30,2	814,3	39,1	
L-Alanin-AMC	1473,4	842,7	822,4	109,5		1070,4	77,2	1372,8	48,8	

Anhang 8: Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 60 nach Hygienisierung durch Pasteurisierung über eine und drei Stunden.

Tag 60	K Past. 1h		1 mg/kg NM-300K Past. 1h		P	K Past. 3h		1 mg/kg NM-300K Past. 3h		P
Substrat	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD		MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	
4-MUF-nonanoat	2840,8	110,4	3070,9	133,0		2854,8	83,4	2636,6	87,3	
4-MUF- β -D-cellobiopyranosid	62,1	23,1	66,6	33,8		155,0	100,9	25,2	49,5	
4-MUF- β -D-xylopyranosid	78,4	46,6	140,5	56,8		139,9	23,6	140,5	71,6	
4-MUF- α -D-glucopyranosid	638,0	77,0	638,6	143,8		638,6	128,7	655,4	113,3	
bis-(4-MUF)-phosph.	495,9	73,9	527,2	15,8		532,8	42,0	505,4	69,7	
4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminid	385,0	61,3	369,4	45,4		391,8	59,8	428,1	137,5	
4-MUF-phosphat	4104,0	156,0	3886,8	112,2		4251,7	176,8	4006,6	478,4	
L-Leucin-AMC	1776,9	45,6	1828,3	154,8		1688,4	45,9	1882,1	73,8	
L-Alanin-AMC	5483,5	202,3	5326,3	275,5		5564,3	474,7	5417,1	585,0	

Anhang 9: Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 90 nach Hygienisierung durch Pasteurisierung über eine und drei Stunden.

Tag 90	K Past. 1h		1 mg/kg NM-300K Past. 1h		P	K Past. 3h		1 mg/kg NM-300K Past. 3h		P
Substrat	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD		MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	
4-MUF-nonanoat	6768,0	263,1	7316,0	316,8		6801,3	198,7	6281,3	208,0	
4-MUF- β -D-cellobiopyranosid	148,0	55,0	158,7	80,6		369,3	240,4	60,0	117,8	
4-MUF- β -D-xylopyranosid	186,7	111,1	334,7	135,3		333,3	56,2	334,7	170,5	
4-MUF- α -D-glucopyranosid	1520,0	183,4	1521,3	342,5		1521,3	306,6	1561,3	270,0	
bis-(4-MUF)-phosph.	1181,3	176,0	1256,0	37,6		1269,3	100,2	1204,0	166,0	
4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminid	917,3	146,1	880,0	108,2		933,3	142,4	1020,0	327,5	
4-MUF-phosphat	9777,3	371,6	9260,0	267,3		10129,3	421,2	9545,3	1139,7	
L-Leucin-AMC	707,9	18,2	728,4	61,7		672,6	18,3	749,8	29,4	
L-Alanin-AMC	2184,6	80,6	2121,9	109,8		2216,8	189,1	2158,1	233,1	

Anhang 10: Enzymaktivität als Freisetzungsrate von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 140 nach Hygienisierung durch Pasteurisierung über eine und drei Stunden.

Tag 140	K Past. 1h		1 mg/kg NM-300K Past. 1h		P	K Past. 3h		1 mg/kg NM-300K Past. 3h		P
Substrat	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD		MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	
4-MUF-nonanoat	6582,3	188,1	5389,5	441,4	**	5691,0	190,1	5722,5	169,6	
4-MUF- β -D-cellobiopyranosid	120,6	172,2	222,5	103,8		221,0	267,5	-8,6	261,2	
4-MUF- β -D-xylopyranosid	328,7	137,9	117,7	201,9		142,1	180,6	114,8	101,3	
4-MUF- α -D-glucopyranosid	1067,9	124,1	866,9	307,2		994,7	299,5	1290,3	211,6	
bis-(4-MUF)-phosph.	1151,1	77,4	882,7	99,7		1187,0	89,1	1033,4	200,3	
4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminid	627,2	136,5	397,6	94,0		488,0	107,6	722,0	237,6	
4-MUF-phosphat	9071,1	101,7	7439,1	384,7		9564,8	500,2	7905,6	396,3	
L-Leucin-AMC	616,8	37,2	524,7	33,5		764,2	29,1	834,7	44,1	
L-Alanin-AMC	1219,3	64,4	936,1	163,9		1223,0	47,0	907,7	143,0	

Anhang 11: Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 60 nach Klärschlammfäulung über 25 und 35 Tage.

Tag 60	K Faul. 25d		1 mg/kg NM-300K Faul. 25d		P	K Faul. 35d		1 mg/kg NM-300K Faul. 35d		P
Substrat	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD		MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	
4-MUF-nonanoat	3059,1	124,4	2829,1	122,1	*	2355,6	11,3	2492,2	221,1	
4-MUF- β -D-cellobiopyranosid	58,2	76,1	85,6	85,9		-24,6	33,6	51,5	46,1	
4-MUF- β -D-xylopyranosid	103,0	60,3	133,8	86,7		96,8	81,2	116,4	24,4	
4-MUF- α -D-glucopyranosid	-5,6	60,4	97,9	23,4		82,3	103,8	29,7	51,6	
bis-(4-MUF)-phosph.	426,5	64,3	490,8	84,5		451,6	79,9	415,3	81,7	
4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminid	314,0	24,7	416,9	79,5		236,2	132,9	237,3	61,4	
4-MUF-phosphat	3730,1	174,3	3349,0	52,4		3478,3	324,7	2581,7	130,9	
L-Leucin-AMC	2585,0	40,3	2956,3	222,8		2646,1	186,7	2254,4	172,4	
L-Alanin-AMC	4860,1	138,4	5102,5	328,2		4918,5	381,9	4169,8	46,1	

Anhang 12: Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 60 nach Klärschlammfäulung über 25 und 35 Tage.

Tag 90	K Faul. 25d		1 mg/kg NM-300K Faul. 25d		P	K Faul. 35d		1 mg/kg NM-300K Faul. 35d		P
Substrat	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD		MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	
4-MUF-nonanoat	5182,3	720,8	5119,6	327,5		5262,5	568,5	5218,7	463,2	
4-MUF- β -D-cellobiopyranosid	74,4	149,9	138,5	140,3		398,1	227,5	331,0	78,5	
4-MUF- β -D-xylopyranosid	189,6	70,1	175,0	119,1		503,1	221,4	357,2	55,6	
4-MUF- α -D-glucopyranosid	1039,7	288,0	1275,9	679,0		1243,8	118,3	1414,4	345,0	
bis-(4-MUF)-phosph.	1172,4	160,9	1029,5	185,0		1338,6	364,6	1060,1	205,2	
4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminid	559,9	145,5	501,6	257,4		608,0	134,1	603,7	142,6	
4-MUF-phosphat	9653,0	664,4	8598,7	901,5		10268,3	310,4	8942,8	521,1	
L-Leucin-AMC	1588,9	65,8	1503,7	74,4		1832,8	96,7	1496,0	27,5	
L-Alanin-AMC	944,7	64,8	967,9	30,3		1055,5	40,8	847,9	50,3	

Anhang 13: Enzymaktivität als Freisetzungsrates von MUF und AMC durch den Abbau spezifischer Substrate an Tag 60 nach Klärschlammfäulung über 25 und 35 Tage.

Tag 140	K Faul. 25d		1 mg/kg NM-300K Faul. 25d		P	K Faul. 35d		1 mg/kg NM-300K Faul. 35d		P
Substrat	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD		MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	MUF/AMC [$\mu\text{mol/L} \cdot (\text{gTM} \cdot \text{h})^{-1}$]	SD	
4-MUF-nonanoat	7223,1	117,8	7264,8	313,5		6049,0	29,1	6399,6	567,7	
4-MUF- β -D-cellobiopyranosid	207,0	174,6	219,9	220,5		-63,2	86,2	132,2	118,5	
4-MUF- β -D-xylopyranosid	120,7	156,6	343,5	222,7		248,6	208,6	298,9	62,6	
4-MUF- α -D-glucopyranosid	277,4	134,4	251,5	60,0		211,3	266,5	76,2	132,5	
bis-(4-MUF)-phosph.	1289,1	101,3	1260,4	217,1		1159,8	205,1	1066,4	209,8	
4-MUF-N-acetyl- β -D-glucosaminid	-3827,1	43,9	1070,7	204,2		606,5	341,2	609,4	157,7	
4-MUF-phosphat	3357,2	567,3	8599,9	134,5		8931,9	833,7	6629,6	336,2	
L-Leucin-AMC	1106,5	43,1	1142,5	86,1		1022,6	72,2	871,2	66,6	
L-Alanin-AMC	3908,6	57,6	1971,9	126,8		1900,8	147,6	1611,4	17,8	

Anhang 14: Respirationsaktivität als Freisetzungsrate von CO₂ [$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$] durch den Abbau spezifischer Substrate nach Direktapplikation und Hygienisierung durch Kalkung.

Substrat	Tag	K Direkt		1 mg/kg NM-300K Direkt		P	K Kalk		1 mg/kg NM-300K Kalk		P
		$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD	$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD		$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD	$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD	
Xylan	60	1,117	0,383	0,883	0,060		1,478	0,156	1,734	0,058	
Cellobiose	60	1,689	0,143	1,272	0,305		1,488	0,147	1,740	0,149	
L-Leucin	60	0,738	0,064	0,735	0,052		0,809	0,035	0,795	0,026	
N-Acetylglucosamine	60	1,140	0,163	1,198	0,178		1,509	0,149	1,389	0,069	
L-Lysine-HCl	60	0,731	0,034	0,725	0,026		0,778	0,053	0,792	0,069	
D-(+)-Glukose	60	1,646	0,186	1,550	0,130		1,775	0,178	1,725	0,142	
L-Arginin	60	1,470	0,217	1,480	0,171		0,475	0,080	0,563	0,032	
L-Alalin	60	1,052	0,148	0,959	0,167		1,103	0,189	1,118	0,091	
Xylan	90	1,382	0,050	1,641	0,180		0,785	0,009	1,221	0,035	
Cellobiose	90	1,651	0,126	1,725	0,222		1,625	0,184	1,788	0,145	
L-Leucin	90	0,815	0,064	0,753	0,089		0,741	0,079	0,741	0,011	
N-Acetylglucosamine	90	1,259	0,095	1,316	0,113		1,147	0,207	1,126	0,117	
L-Lysine-HCl	90	0,765	0,023	0,768	0,096		0,733	0,020	0,705	0,030	
D-(+)-Glukose	90	1,902	0,142	1,754	0,135		1,693	0,185	1,800	0,102	
L-Arginin	90	0,954	0,106	0,758	0,324		1,349	0,107	1,337	0,291	
L-Alalin	90	0,994	0,051	1,087	0,070		0,963	0,039	1,171	0,057	
Xylan	90	1,506	0,054	1,789	0,196		0,855	0,009	1,331	0,038	
Cellobiose	90	1,799	0,138	1,880	0,242		1,771	0,201	1,949	0,158	
L-Leucin	90	0,889	0,070	0,821	0,097		0,807	0,086	0,808	0,012	
N-Acetylglucosamine	90	1,372	0,103	1,434	0,123		1,251	0,226	1,228	0,128	
L-Lysine-HCl	90	0,834	0,025	0,838	0,104		0,799	0,022	0,768	0,032	
D-(+)-Glukose	90	2,074	0,155	1,912	0,147		1,845	0,202	1,962	0,111	
L-Arginin	90	1,040	0,115	0,826	0,353		1,470	0,117	1,458	0,318	
L-Alalin	90	1,083	0,055	1,185	0,076		1,050	0,043	1,276	0,062	

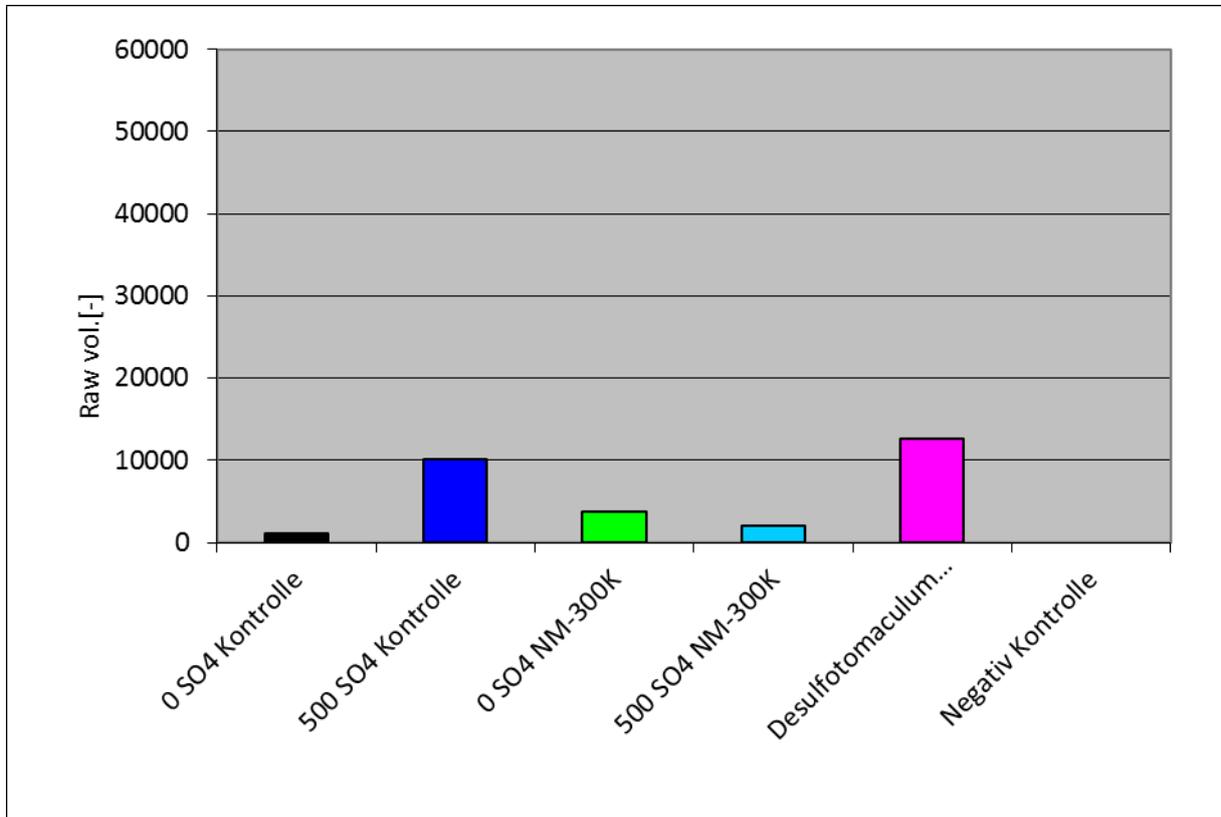
Anhang 15: Respirationsaktivität als Freisetzungsrates von CO₂ [$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$] durch den Abbau spezifischer Substrate nach Hygienisierung durch Pasteurisierung über eine und drei Stunden.

Substrat	Tag	K Past. 1h		1 mg/kg NM-300K Past. 1h		P	K Past. 3h		1 mg/kg NM-300K Past. 3h		P
		$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD	$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD		$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD	$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD	
Xylan	60	1,278	0,111	1,293	0,088		1,164	0,063	1,108	0,051	
Cellobiose	60	1,717	0,193	1,802	0,228		1,625	0,154	1,556	0,175	
L-Leucin	60	0,722	0,044	0,808	0,056		0,717	0,063	0,693	0,039	
N-Acetylglucosamine	60	1,152	0,106	1,320	0,086		1,106	0,040	1,178	0,079	
L-Lysine-HCl	60	0,710	0,025	0,714	0,014		0,680	0,024	0,665	0,012	
D-(+)-Glukose	60	1,773	0,106	1,752	0,113		1,392	0,100	1,584	0,059	
L-Arginin	60	1,160	0,027	1,033	0,145		0,936	0,087	1,001	0,051	
L-Alalin	60	1,152	0,065	1,090	0,066		1,055	0,097	1,027	0,054	
Xylan	90	1,443	0,068	1,277	0,103		0,900	0,070	1,224	0,088	
Cellobiose	90	1,671	0,155	1,835	0,261		1,394	0,208	1,613	0,179	
L-Leucin	90	0,729	0,030	0,786	0,049		0,744	0,057	0,742	0,105	
N-Acetylglucosamine	90	1,151	0,045	1,277	0,043		1,223	0,206	1,214	0,190	
L-Lysine-HCl	90	0,730	0,043	0,714	0,017		0,710	0,011	0,696	0,014	
D-(+)-Glukose	90	1,467	0,049	1,693	0,043		1,582	0,131	1,531	0,327	
L-Arginin	90	0,931	0,023	1,046	0,172		1,475	0,170	0,946	0,083	
L-Alalin	90	1,018	0,242	1,106	0,065		1,016	0,142	1,092	0,065	
Xylan	90	1,573	0,075	1,392	0,113		0,981	0,077	1,334	0,096	
Cellobiose	90	1,822	0,168	2,001	0,285		1,520	0,227	1,758	0,196	
L-Leucin	90	0,794	0,033	0,857	0,054		0,811	0,062	0,809	0,114	
N-Acetylglucosamine	90	1,255	0,049	1,392	0,047		1,333	0,225	1,323	0,207	
L-Lysine-HCl	90	0,796	0,047	0,778	0,019		0,774	0,012	0,759	0,016	
D-(+)-Glukose	90	1,600	0,053	1,845	0,047		1,724	0,143	1,669	0,357	
L-Arginin	90	1,015	0,025	1,141	0,188		1,608	0,186	1,031	0,090	
L-Alalin	90	1,110	0,264	1,206	0,071		1,108	0,154	1,190	0,071	

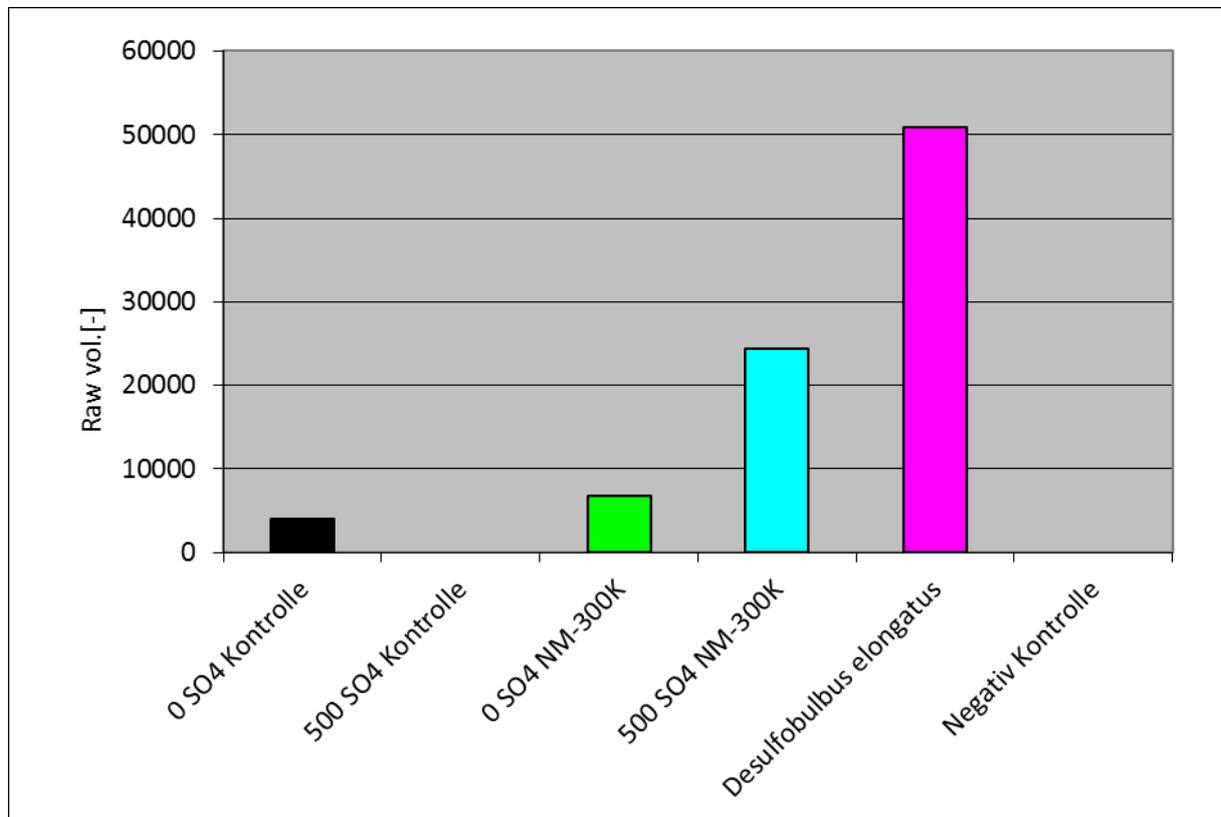
Anhang 16: Respirationsaktivität als Freisetzungsrate von CO₂ [$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$] durch den Abbau spezifischer Substrate nach Klärschlammfäulung über 25 und 35 Tage.

Substrat	Tag	K Faul. 25d		1 mg/kg NM-300K Faul. 25d		P	K Faul. 35d		1 mg/kg NM-300K Faul. 35d		P
		$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD	$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD		$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD	$\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/h}$	SD	
Xylan	60	1,182	0,160	1,121	0,089		1,661	0,111	1,118	0,054	
Cellobiose	60	1,484	0,147	1,565	0,176		1,624	0,074	1,522	0,033	
L-Leucin	60	0,800	0,040	0,710	0,090		0,797	0,025	0,710	0,008	
N-Acetylglucosamine	60	1,512	0,181	1,127	0,067		1,429	0,058	1,172	0,096	
L-Lysine-HCl	60	0,787	0,059	0,659	0,022		0,770	0,024	0,668	0,008	
D-(+)-Glukose	60	1,715	0,211	1,474	0,122		1,722	0,155	1,586	0,070	
L-Arginin	60	0,484	0,094	0,982	0,104		0,516	0,071	0,975	0,027	
L-Alalin	60	0,974	0,286	0,989	0,052		1,128	0,081	1,031	0,063	
Xylan	90	1,295	0,142	1,015	0,051	*	1,015	0,156	0,913	0,105	
Cellobiose	90	1,579	0,161	1,338	0,112		1,527	0,155	1,322	0,130	
L-Leucin	90	0,608	0,069	0,538	0,012		0,604	0,066	0,510	0,026	
N-Acetylglucosamine	90	0,969	0,082	0,947	0,075		0,983	0,188	0,939	0,053	
L-Lysine-HCl	90	0,508	0,022	0,532	0,029		0,520	0,040	0,540	0,027	
D-(+)-Glukose	90	1,422	0,054	1,325	0,052		1,441	0,118	1,325	0,136	
L-Arginin	90	0,896	0,105	1,081	0,102		0,853	0,094	1,089	0,130	
L-Alalin	90	0,792	0,065	0,838	0,045		0,799	0,132	0,855	0,078	
Xylan	90	0,480	0,015	1,163	0,290		1,578	0,123	1,453	0,314	
Cellobiose	90	1,258	0,316	1,006	0,061		1,324	0,256	1,274	0,027	
L-Leucin	90	0,616	0,028	0,570	0,026		0,588	0,016	0,609	0,028	
N-Acetylglucosamine	90	0,724	0,013	0,717	0,063		0,710	0,051	0,775	0,138	
L-Lysine-HCl	90	1,047	0,036	0,927	0,080		0,910	0,036	0,901	0,068	
D-(+)-Glukose	90	1,778	0,084	1,269	0,025		1,514	0,067	1,360	0,057	
L-Arginin	90	1,440	0,086	1,119	0,227		1,222	0,194	1,303	0,146	
L-Alalin	90	0,984	0,033	0,925	0,120		1,010	0,054	0,859	0,088	

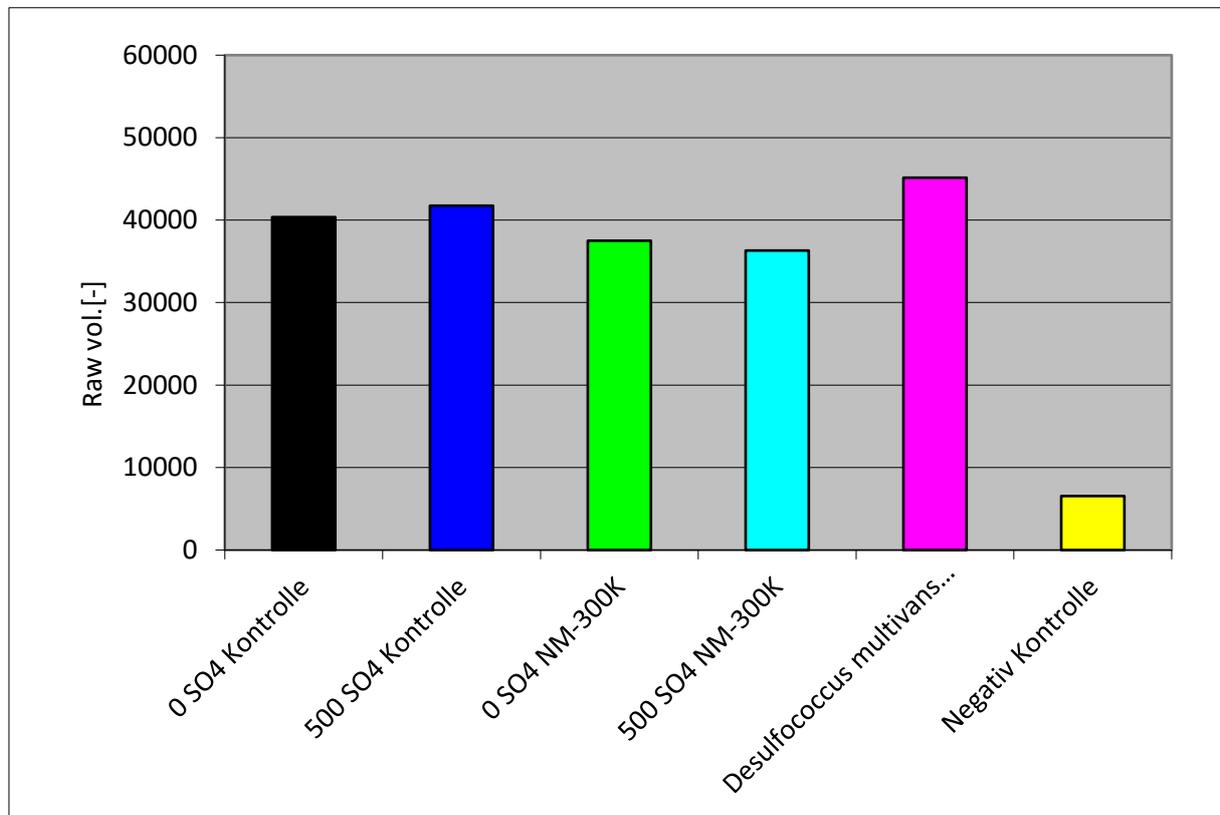
Anhang 17: Semiquantitative Darstellung der Anwesenheit (Bandenintensität) der SRB-Art *Desulfotomaculum nigrificans*. Untersucht wurden die niedrigsten und höchsten Sulfatstufe der Kontrolle und der NM-300K-Behandlung. Bandenintensität nach einer nestedPCR im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle.



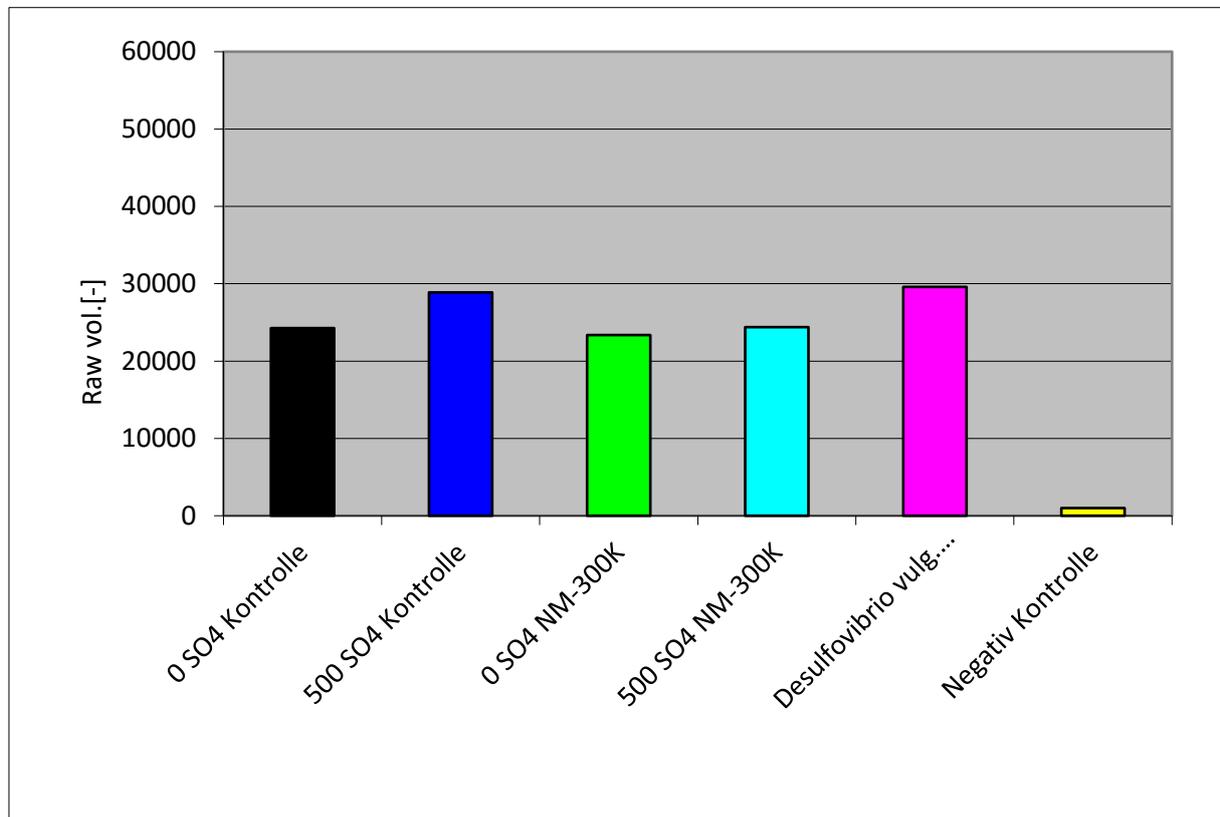
Anhang 18: Semiquantitative Darstellung der Anwesenheit (Bandenintensität) der SRB-Art *Desulfobulbus elongatus*. Untersucht wurden die niedrigsten und höchsten Sulfatstufe der Kontrolle und der NM-300K-Behandlung. Bandenintensität nach einer nestedPCR im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle.



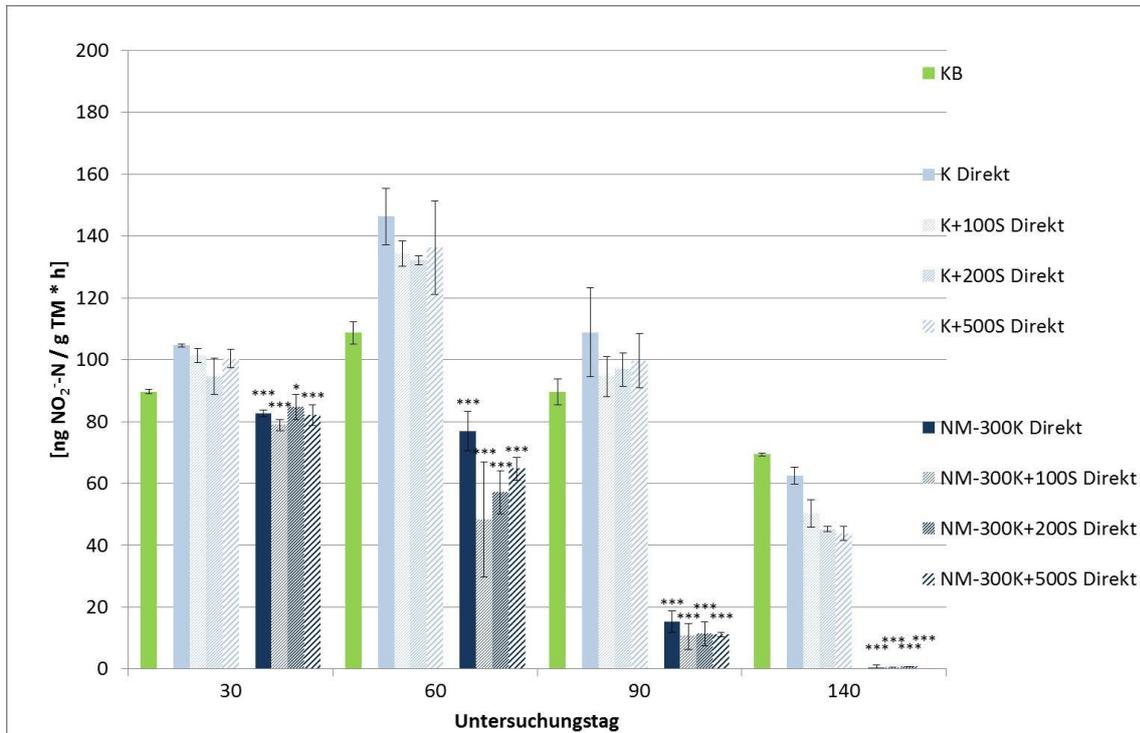
Anhang 19: Semiquantitative Darstellung der Anwesenheit (Bandenintensität) der SRB-Art *Desulfococcus multivans*. Untersucht wurden die niedrigsten und höchsten Sulfatstufe der Kontrolle und der NM-300K-Behandlung. Bandenintensität nach einer nestedPCR im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle.



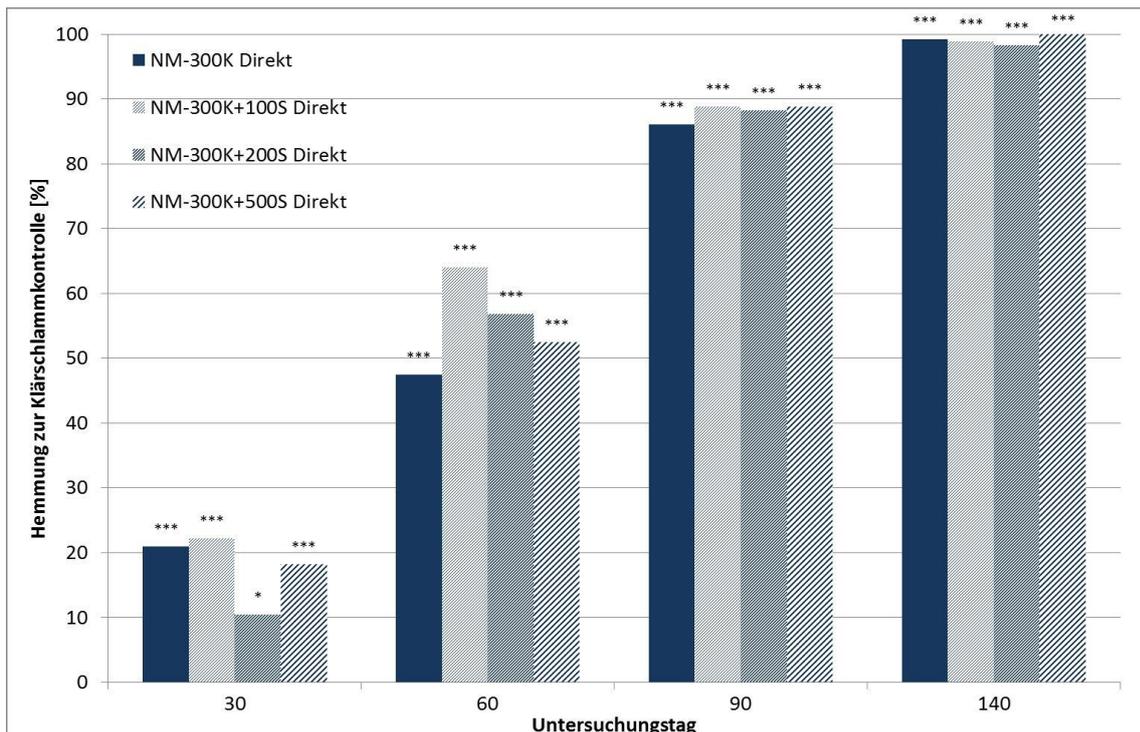
Anhang 20: Semiquantitative Darstellung der Anwesenheit (Bandenintensität) der SRB-Art *Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris*. Untersucht wurden die niedrigsten und höchsten Sulfatstufe der Kontrolle und der NM-300K-Behandlung. Bandenintensität nach einer nestedPCR im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle.



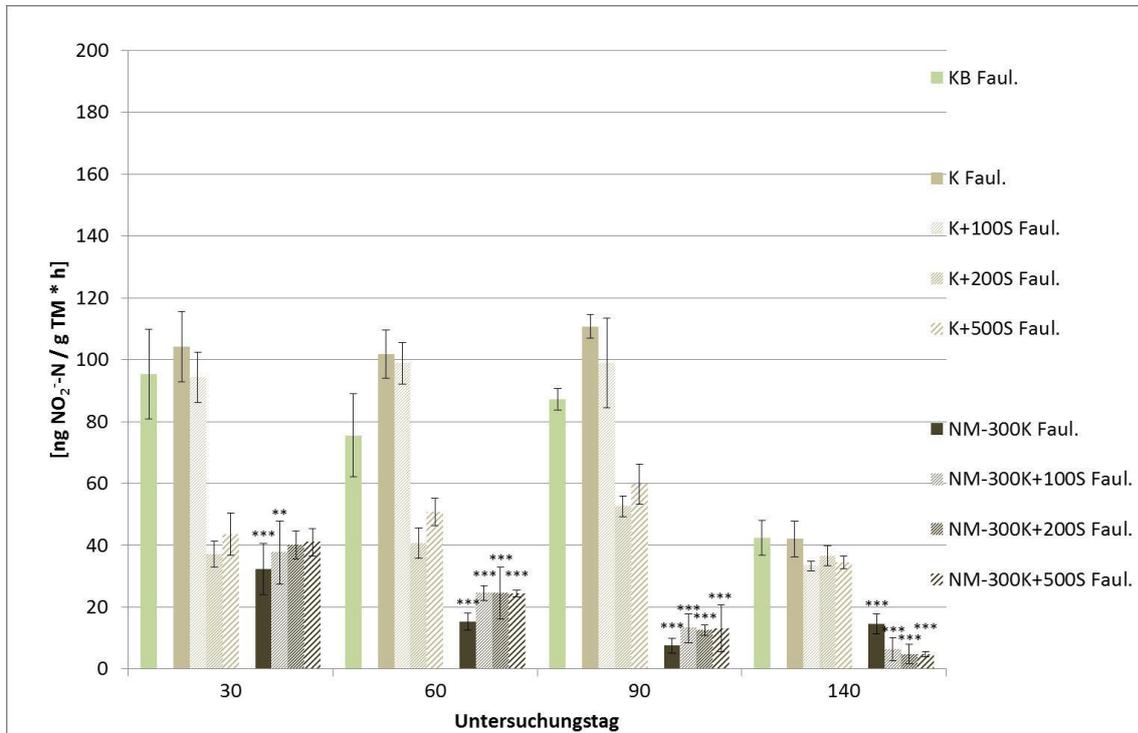
Anhang 21: Langzeitversuch 4 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Direktapplikation. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; *p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)**



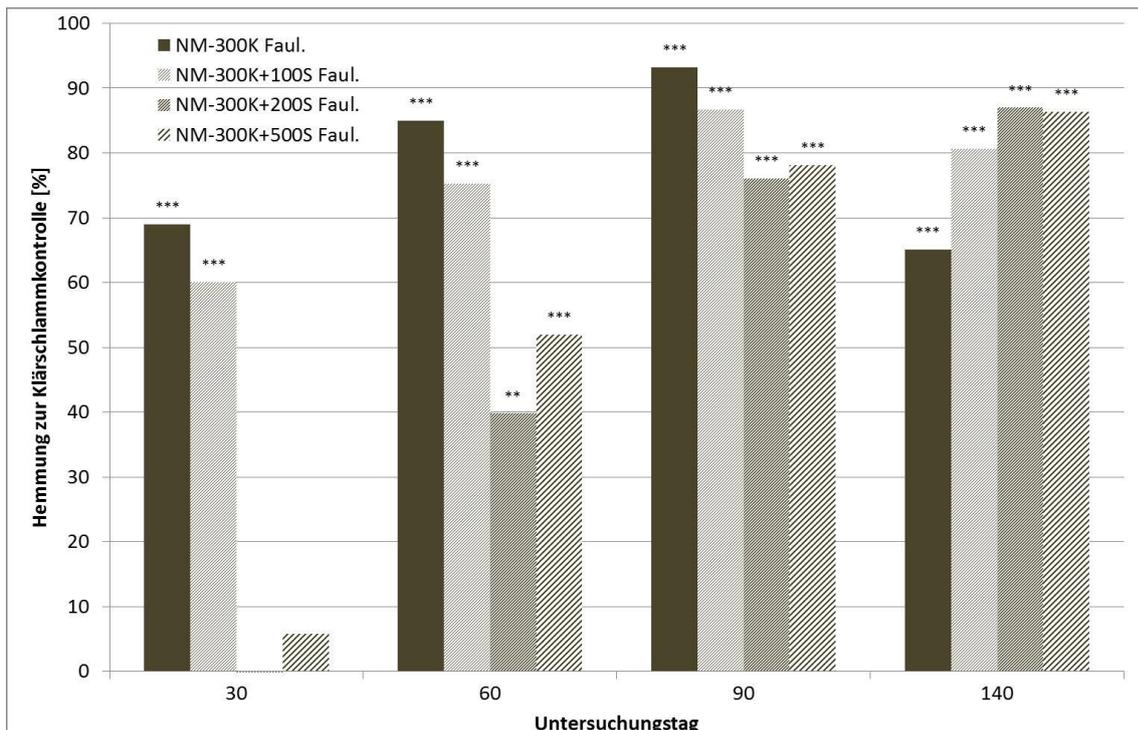
Anhang 22: Langzeitversuch 4 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit unterschiedlicher Sulfatzugaben nach Direktapplikation. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; *p<0.001))**



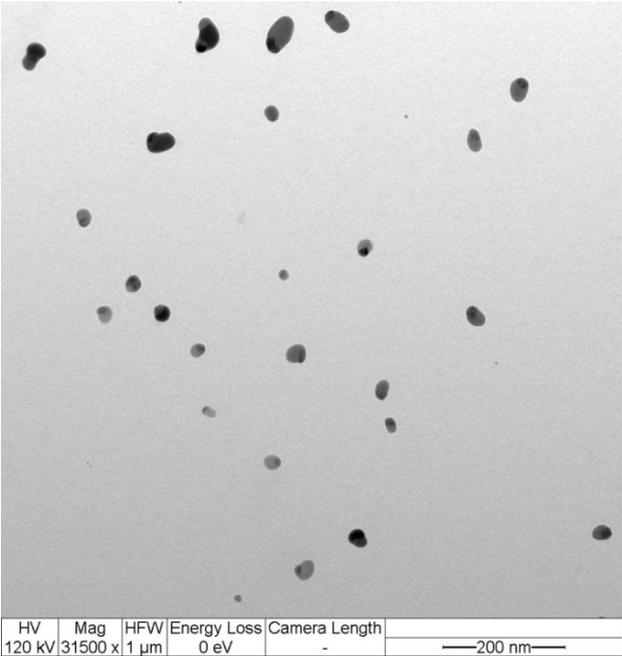
Anhang 23: Langzeitversuch 4 – Nitritproduktion in Abhängigkeit von dem Testgegenstand NM-300K und unterschiedlichen Sulfatzugaben nach Klärschlammfäulung. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; *p<0.001), Fehlerbalken = ±Standardabweichung)**



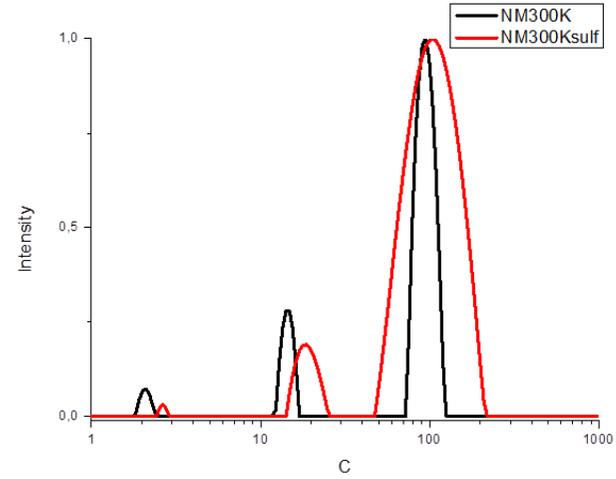
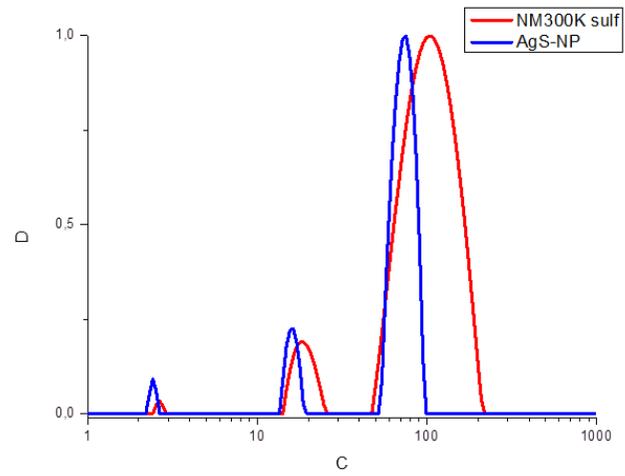
Anhang 24: Langzeitversuch 4 – Hemmung der Nitritproduktion durch NM-300K im Vergleich zur Klärschlammkontrolle in Abhängigkeit unterschiedlicher Sulfatzugaben nach Klärschlammfäulung. (Student's T-Test, einseitig kleiner, (*p<0.05; **p<0.01; *p<0.001))**



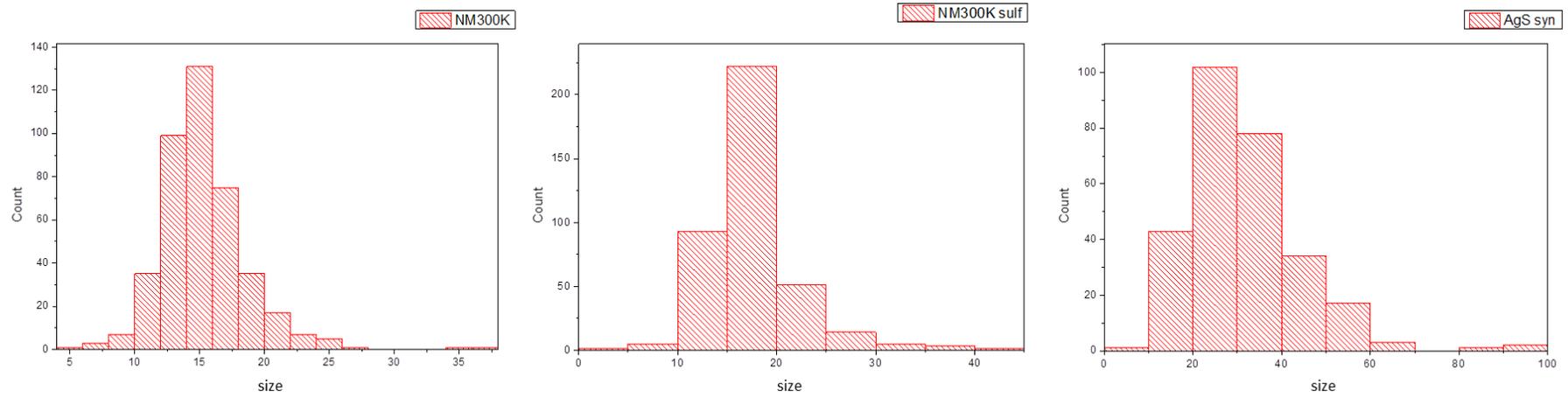
Anhang 25: TEM- Aufnahme des synthetisierten Ag₂S-Nanomaterials.



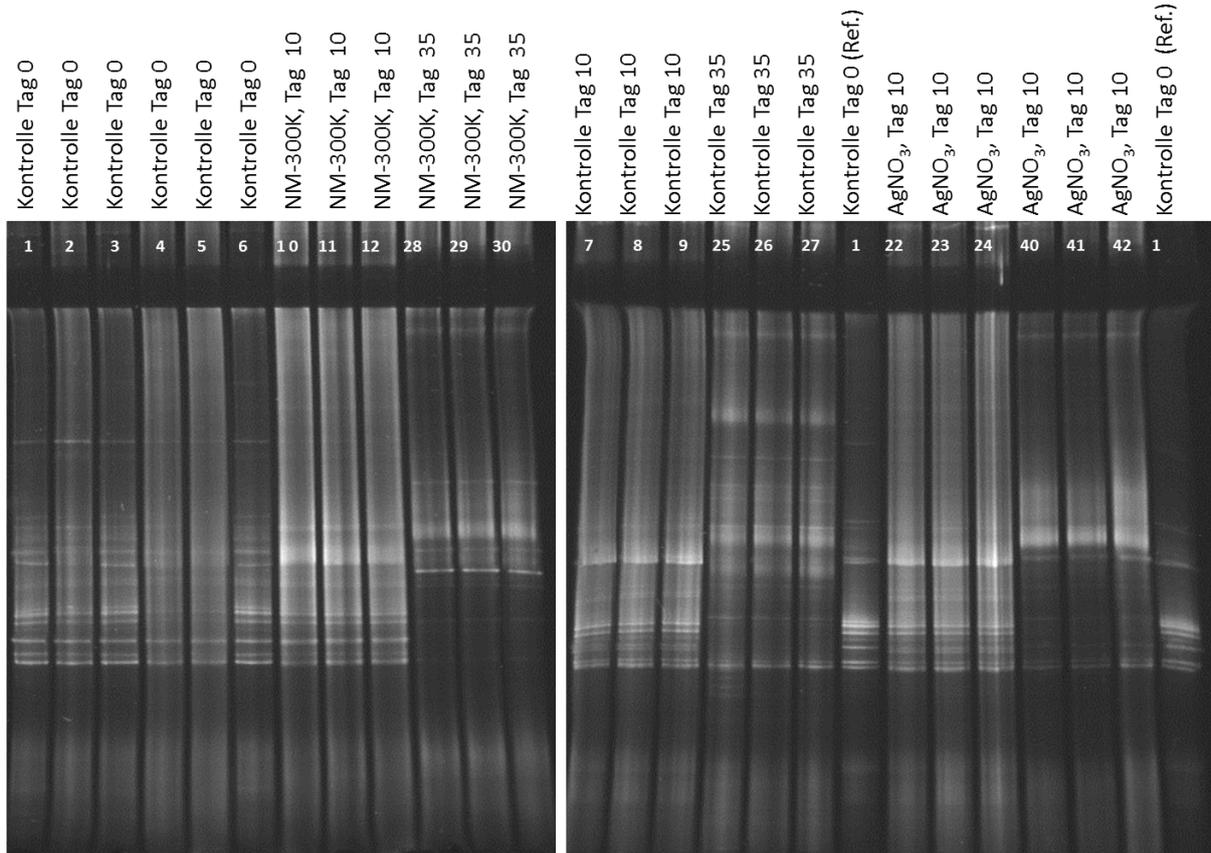
Anhang 26: Größenverteilung (PSD) der Nanomaterialien NM-300K, Ag₂S NM und NM-300K Ag₂S (sulfidiert) mit Dynamic Light Scattering (intensitätsgewichtet) bestimmt.



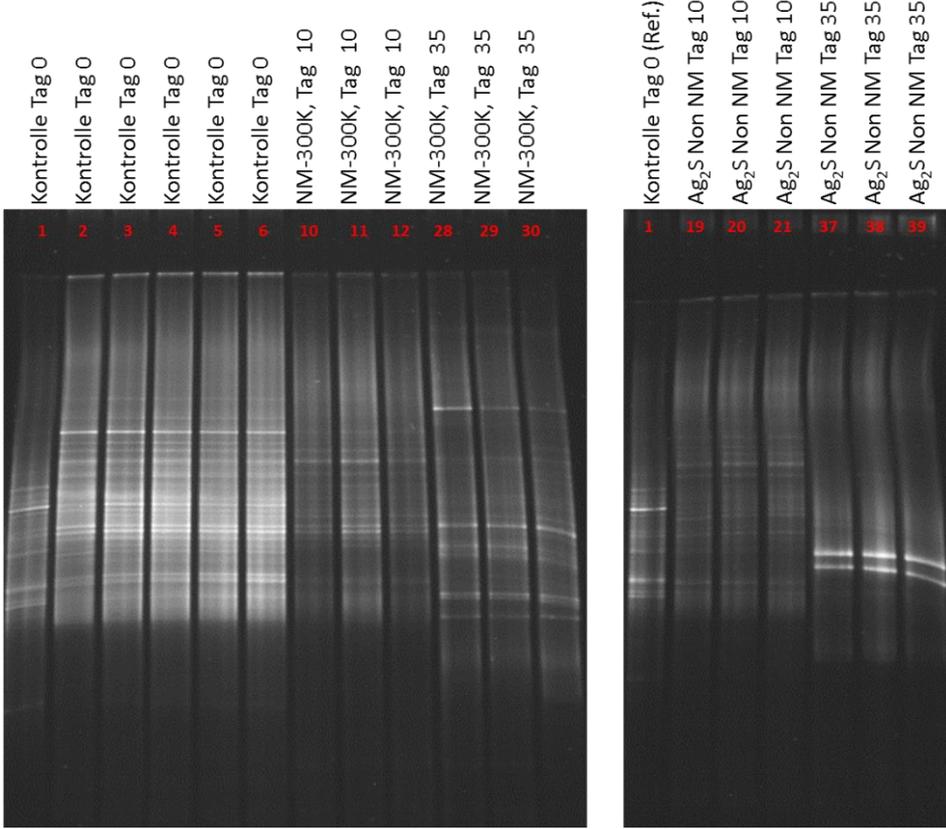
Anhang 27: Größenverteilung (PSD) der Nanomaterialien NM-300K, Ag₂S NM und NM-300K Ag₂S (sulfidiert) mit TEM (anzahlgewichtet) bestimmt.



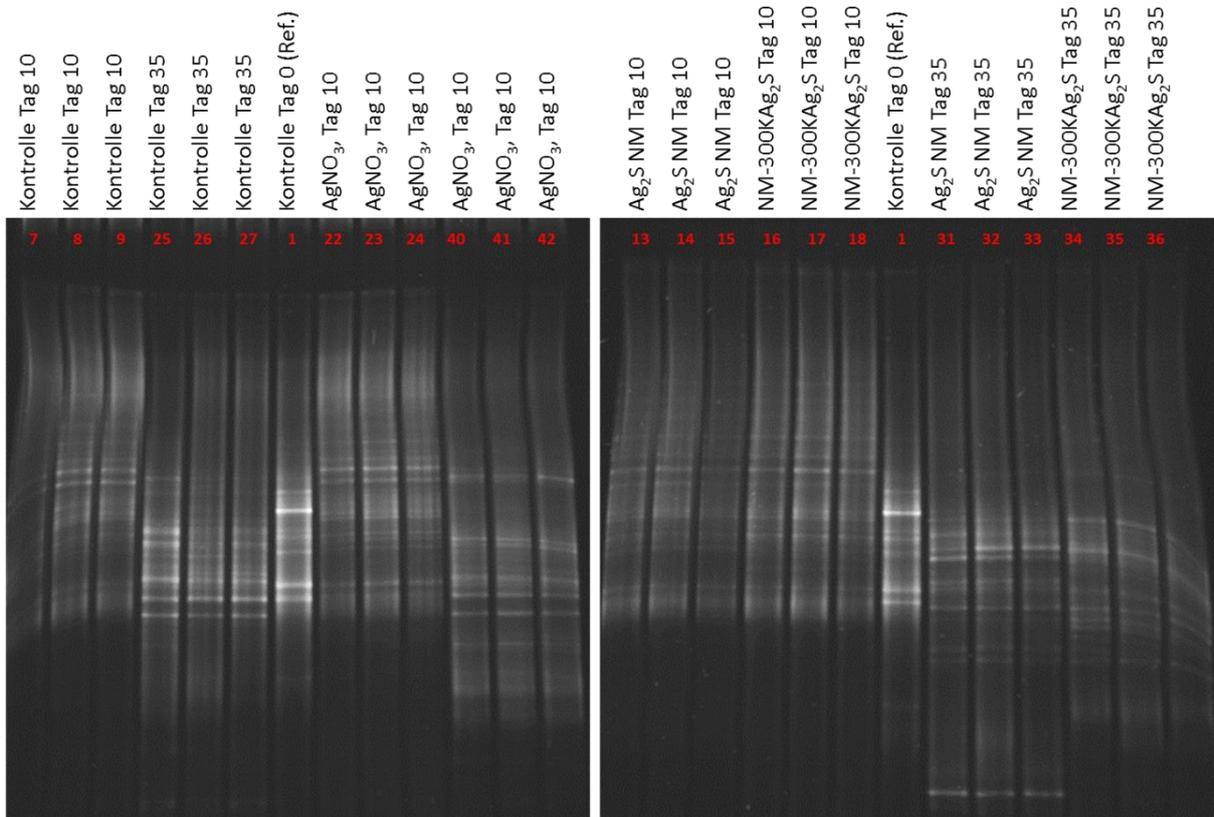
Anhang 28: Sulfatreduzierende Bakterien (SRB) – DNA im Klär- und Faulschlamm der unbeaufschlagten Kontrolle, NM-300K- und der AgNO₃-Behandlungen zu Testbeginn der Kläranlagensimulation (Tag 0), Testende der Kläranlagensimulation (Tag 10) und nach Ende der Klärschlammfäulung (Tag 35). Die Kontrolle Tag 0 wurde als interne Referenz (Ref.) zum Vergleich der Gele aufgetragen.



Anhang 29: Bakterien cDNA im Klär- und Faulschlamm der unbeaufsichtigten Kontrolle, NM-300K und der Ag₂S NonNM Behandlungen zu Testbeginn der Kläranlagensimulation (Tag 0), Testende der Kläranlagensimulation (Tag 10) und nach Ende der Klärschlammfäulung (Tag 35). Die Kontrolle Tag 0 wurde als interne Referenz (Ref.) zum Vergleich der Gele aufgetragen.



Anhang 30: Bakterien cDNA im Klär- und Faulschlamm der unbeaufschlagten Kontrolle, AgNO₃, Ag₂S NM und der NM-300K Ag₂S Behandlungen zu Testende der Kläranlagensimulation (Tag 10) und nach Ende der Klärschlammfäulung (Tag 35). Die Kontrolle Tag 0 wurde als interne Referenz (Ref.) zum Vergleich der Gele aufgetragen.



Anhang 31: pH-Werte der Böden der Lysimeterstudie unterteilt in Böden die im Freiland und die im Labor inkubiert wurden.

Monat	Tag	Freiland / Labor	Behandlung		
			Kontrolle	1,8	7,0
Vor der Applikation		Fr	5,9	5,9	6,0
Mai 14	0	L	5,5	5,4	5,4
Jun 14	30	L	5,7	5,6	5,5
Jul 14	60	L	5,6	5,5	5,4
Aug 14	90	L	5,5	5,4	5,3
Sep 14	129	L	5,3	5,4	5,2
Sep 14	129	Fr	6,0	5,8	5,7
Okt 14	150	L	5,4	5,2	5,2
Nov 14	180	L	5,2	5,3	5,2
Feb 15	283	Fr	6,0	6,1	6,0
Jun 15	396	Fr	5,3	5,4	5,4
Aug 15	450	Fr	5,5	5,5	5,5
Feb 16	630	Fr	5,0	5,0	4,9
Jul 16	810	Fr	5,0	5,1	4,9