

WIRKUNG VON NANOSILBER AUF FRÜHE LEBENSSTADIEN VON FISCHEN

FISH EARLY LIFE STAGE TOXICITY OF NANOSILVER

Hintergrund und Ziele

Im Auftrag des Umweltbundesamts wurde ein Fisch-Early-Life-Stage-Test mit Nanosilber durchgeführt. Ziel war neben der Erhebung bewertungsrelevanter Daten zur Wirkung auf die empfindlichsten Lebensstadien von Fischen die Anpassung des Testprotokolls der OECD 210 für die Prüfung von Nanomaterialien. Dabei sollte eine möglichst homogene und konstante Partikelkonzentration sichergestellt sein, auch wenn im Falle von Nanosilber von einer Wirkung durch gelöste Silberionen auszugehen ist.

Projektbeschreibung

Vorliegende Erfahrungen bei der Dosierung von Nanopartikeln zeigten, dass die Homogenität der Exposition im Durchfluss nicht gegeben ist. Wir entschieden uns daher für ein ausreichend großes statisches System (270 L-Aquarien) mit Wasserbewegung, die durch jeweils vier Strömungspumpen in den Aquarienecken bodennah erzeugt wurde. In je ein Becken pro Testkonzentration wurden vier Käfige aus Edelstahl gehängt, in denen je 20 befruchtete Zebraablängseier exponiert wurden. Ein Vorversuch über eine Woche zeigte, dass Gesamtsilberkonzentration und Partikelgrößenverteilung über sieben Tage in Beckenmitte und in den Einhängekäfigen hinreichend konstant waren. So wurden jeweils nach sieben Tagen die Käfige in gereinigte und neu mit Testdispersion gefüllte Aquarien überführt. NOEC und LOEC dieses Versuchs wurden in einem zweiten Test mit je zwei Becken pro Konzentration und sechs Einhängekäfigen pro Becken verifiziert. Die Testkonzentrationen wurden mit einem Fischembryotest ermittelt, der eine 48 h-NOEC bezüglich Mortalität von 200 µg/L und bezüglich der Herzschlagfrequenz von 100 µg/L zeigte. So wurden im ersten Test Nominalkonzentrationen an Gesamtsilber von 200, 100, 50, 25 und 12,5 µg/L eingesetzt und mit ICP-MS jeweils vor und nach dem Wechsel überprüft. Der Anteil gelösten Silbers wurde durch Ultrazentrifugation ermittelt.

Ergebnisse

Die Schlupfrate war nicht durch Nanosilber beeinträchtigt. Bei 200 µg/L starben alle Tiere innerhalb weniger Tage nach dem Schlupf. Da im ersten Test einzelne Becken durch eine Kontamination der Wasserleitungen mit erhöhtem Chlorgehalt inkonsistente Effekte zeigten, wurde der zweite Test mit 100, 50 und 12.5 µg/L durchgeführt. Die Exposition bewegte sich während des ersten Tests um 70 % der Nominalkonzentration, im zweiten Test, vermutlich wegen Pumpenermüdung, um 50 %. Der Anteil gelösten Silbers betrug etwa 3 %.

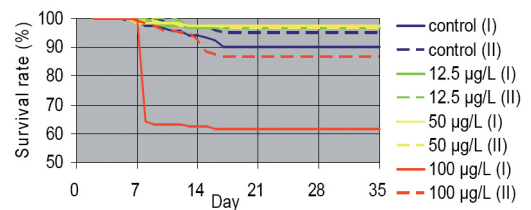


Figure 1: Post-hatch survival of zebrafish early life stages exposed to nanosilver in test 2. Lines = vessel means of 6 pseudo-replicates, I and II indicate replicates.

Die Überlebensraten (Figure 1) zeigten eine signifikante Wirkung bei nominal 100 µg/L (NOEC: 50 µg/L, gemessen 23 µg/L). Die Längenmessungen (Figure 2) ergaben in Test 1 eine Wirkung ab nominal 25 µg/L (gemessen: 18 µg/L) und in Test 2 ab nominal 50 µg/L (gemessen: 23 µg/L), in beiden Fällen eine NOEC von nominal 12.5 µg/L (gemessen: 6 - 9 µg/L).

Fazit

Die frühen Lebensstadien von Fischen erweisen sich gegenüber Nanosilber als vergleichsweise sehr empfindlich. Mit populationsrelevanten Wirkungen ist oberhalb von 10 µg Gesamtsilber/L zu rechnen. Das Testverfahren ist mit Nanopartikeln wie beschrieben durchführbar. Die Verwendung echter Replikate bei Verwendung kleinerer Becken sollte erprobt werden.

Auftraggeber / Sponsor

Umweltbundesamt (UBA), FKZ 3709 65 418



Background and aims

We carried out a zebrafish early life stage (ELS) test on behalf of the German Federal Environment Agency to determine the effects of silver nanomaterials. The objectives were to generate hazard assessment data for the most sensitive life stages of the fish, and to adapt the OECD TG 210 protocol to allow the testing of nanomaterials. We therefore tried to achieve a homogeneous particle concentration even though the effects of nanosilver are thought to be caused mainly by dissolved silver ions.

Approach

Experience has shown that flow-through systems often fail to achieve homogenous exposure to nanomaterials. We therefore used a large static system (270 L aquaria), with an agitated water movement generated by four flow pumps placed in the corners at the base of each vessel. In the first test, one vessel per treatment was equipped with four ELS cages (constructed from stainless steel) placed close to the water surface. Each was stocked with 20 fertilized zebrafish eggs at the beginning of the test. A one-week pre-test showed that the particle size distribution and total silver concentration was sufficiently constant across the four cages and the middle of the vessel. Every seven days, the cages were transferred to cleaned vessels containing freshly-prepared test dispersion. The NOEC and LOEC values were verified in a second test with two vessels and six cages per vessel. As a range finder for the test concentrations, we carried out a fish embryo test that generated 48 h NOEC

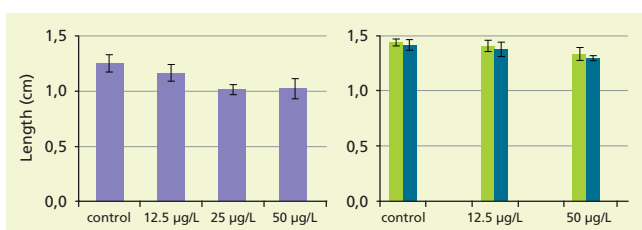


Figure 2: Growth of zebrafish early life stages depending on the nominal nanosilver concentration. Left: test 1, right: test 2. Bars represent means per replicates, error bars indicate standard deviations.

values of 200 µg/L for survival and 100 µg/L for heartbeat frequency. We therefore dosed the vessels with 200, 100, 50, 25 and 12.5 µg total silver per litre, which was verified by ICP-MS before and after each medium exchange. The proportion of dissolved silver was measured after ultracentrifugation.

Results

Hatching was not affected at any of the test concentrations, but all larvae died within few days after hatching when exposed to nanosilver at a concentration of 200 µg/L in the first test. Because some vessels in this test showed inconsistent results due to contamination of the tap water pipe with chlorine, the second test was performed with doses of 100, 50 and 12.5 µg/L. The mean total silver concentrations were approximately 70% of nominal values during the first test and approximately 50% during the second test. The proportion of dissolved silver was approximately 3%. Survival rates (Fig. 1) were significantly affected by nominal nanosilver concentrations of 100 µg/L (NOEC: 50 µg/L, mean measured 23 µg/L). Growth (Fig. 2) was inhibited from nominal 25 µg/L (mean measured: 18 µg/L) in test 1 and nominal 50 µg/L (mean measured: 23 µg/L) in test 2, both tests resulting in a nominal NOEC of 12.5 µg/L (mean measured: 6 - 9 µg/L).

Conclusion

The early life stages of fish are particularly sensitive to silver nanomaterials. We cannot exclude population-relevant effects at concentrations greater than 10 µg total silver per litre. The testing approach we developed is feasible. The use of true replicates with smaller vessels should be tested.

Contact / Ansprechpartner

Dr. Christoph Schäfers
Tel: +49 2972 302 - 270
christoph.schaefers@ime.fraunhofer.de

Figure 3: Static test system for ELS testing.