

**Der Einfluss von Nanopartikeln auf die akute
Toxizität des neonicotinoiden Insektizids Thiacloprid
auf Zuckmückenlarven (*Chironomus riparius*)**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Carla S. Lorenz

aus Böblingen

Tübingen

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

26. Juli 2017

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Heinz-R. Köhler

2. Berichterstatterin:

Prof. Dr. Carolin Huhn

Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Teil 1: Zusammenfassung	1
1.1. Promotionsthema.....	1
1.2. Einleitung	1
1.3. Material und Methoden	12
1.4. Ergebnisse und Diskussion.....	21
1.5. Schlusswort	33
1.6. Literatur.....	34
Teil 2: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripten	43
Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten	45
Kapitel 1: Nano-sized Al ₂ O ₃ Reduces Acute Toxic Effects of Thiacloprid on the Non-biting Midge <i>Chironomus riparius</i>	45
Kapitel 2: Nano-sized zeolites as modulators of thiacloprid toxicity on <i>Chironomus riparius</i>	71
Kapitel 3: Examination of Fluorescent Silica Nanoparticles and their Tracking within Larvae of <i>Chironomus riparius</i>	105
Publikationsliste	115
Danksagung	117

Teil 1: Zusammenfassung

1.1. Promotionsthema

Der Einfluss von Nanopartikeln auf die akute Toxizität des neonikotinoiden Insektizids Thiacloprid auf Zuckmückenlarven (*Chironomus riparius*)

1.2. Einleitung

1.2.1. Die Grundlagen

Als Nanopartikel bezeichnet man kleinste Partikel mit einer Größe zwischen 1 und 100 nm (ISO/TS 80004-1:2015). Sie können auf natürliche Weise, zum Beispiel durch Vulkanausbrüche (Oberdörster *et al.*, 2005; Hochella *et al.*, 2008), Erdbeben (Hochella *et al.*, 2008) oder Verwitterung (Hochella *et al.*, 2008; Hartland *et al.*, 2013) gebildet werden und sind ubiquitär in der Umwelt verbreitet (zum Beispiel Hochella *et al.*, 2008; Kahru und Dubourguier, 2010; Wagner *et al.*, 2014). Auf Grund ihrer geringen Größe können diese Partikel grundlegend andere Eigenschaften als größere Partikel identischer chemischer Komposition besitzen (zum Beispiel Nel *et al.*, 2006; Christian *et al.*, 2008; Hochella *et al.*, 2008; Auffan *et al.*, 2009; Klabunde und Richards, 2009; Scown *et al.*, 2010; Aiken *et al.*, 2011). Dies ist insbesondere darin begründet, dass das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen bei Nanopartikeln sehr groß ist, wodurch deren Reaktivität und Bindungsvermögen stark zunehmen kann (zum Beispiel Baun *et al.*, 2008a; Klabunde und Richards, 2009; Hartland *et al.*, 2013). Darüber hinaus können Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Größe sehr mobil sein (Hartland *et al.*, 2013) und physikalische Barrieren, wie die Blut-Hirn-Schranke, leichter überwinden (zum Beispiel Kreuter *et al.*, 2002; Scown *et al.*, 2010; Wohlfart *et al.*, 2012). Neben der Größe der Partikel können auch andere Faktoren, wie Form oder Oberflächenstruktur, Effekte auf die Nanopartikeleigenschaften haben (Nel *et al.*, 2006; Klabunde und Richards, 2009). Aus den vielen besonderen Eigenschaften, die Nanopartikel aufweisen, resultiert eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten sowie der Einsatz dieser Partikel in der Entwicklung neuer Technologien. Infolgedessen werden Nanopartikel heutzutage für bestimmte Einsatzgebiete, zum Beispiel als Katalysatoren oder Wirkstoffträger, gezielt synthetisiert. Die Herstellung von Nanopartikeln kann entweder durch „Top-down“- oder „Bottom-up“-Methoden erfolgen (Klabunde und Richards, 2001; Christian *et al.*, 2008; Klaine *et al.*, 2008). Bei ersteren werden größere Partikel zum Beispiel durch Mahlen in einer Kugelmühle zerkleinert. Durch diese Methoden ist es jedoch schwierig, sehr kleine Nanopartikel zu generieren. Zudem ist das Größenspektrum und die Form der resultierenden Partikel sehr variabel (Klabunde und Richards, 2001; Klaine *et al.*, 2008). Aus diesen Gründen werden in der Regel „Bottom-up“-Methoden angewandt, bei denen die Nanopartikel durch Aggregation von Molekülen entstehen und in Bezug auf Größe und Form homogener sind (Klabunde und Richards, 2001; Christian *et al.*, 2008). Darüber hinaus können Nanopartikel auf unterschiedlichste Weise modifiziert werden, um ihre Eigenschaften zu verändern. So lassen sich beispielsweise die Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel gezielt umgestalten, indem diese

beschichtet werden und dadurch eine oder mehrere Hüllen erhalten (Christian *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2014). Außerdem ist es möglich, in Nanopartikel funktionale Kerne einzuschleusen und ihnen somit beispielsweise magnetische Eigenschaften (zum Beispiel Cromer Berman *et al.*, 2011) oder Fluoreszenzeigenschaften (zum Beispiel He *et al.*, 2010) zu verleihen.

Heute finden synthetische Nanopartikel in vielen verschiedenen Anwendungsgebieten Einsatz. So werden sie beispielsweise in unterschiedlichsten Applikationsformen in der Elektronik verwendet (zum Beispiel Wijnhoven *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 2014), dienen aber auch in der Medizin als Wirkstoffträger (zum Beispiel Müller *et al.*, 2000; Slowing *et al.*, 2008; Albanese *et al.*, 2012; Wohlfart *et al.*, 2012). In der Wasser- und Luftaufbereitung fungieren sie unter anderem als Adsorptionsmittel (zum Beispiel Savage und Diallo, 2005; Walcarius und Mercier, 2010; Mueller *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2013) und können in Bekleidung als antimikrobieller (zum Beispiel Benn und Westerhoff, 2008; Rai *et al.*, 2009; Wijnhoven *et al.*, 2009) oder wasserabweisender (Zhang und Lamb, 2009) Schutz eingesetzt werden. Hinzu kommen deren Funktion als Katalysatoren (Klabunde und Richards, 2009) oder ihre Anwendung in der Kosmetik, zum Beispiel als physikalische Sonnenschutzmittel in Sonnencremes und -sprays (zum Beispiel Cross *et al.*, 2007; Klabunde und Richards, 2009; Nowack *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014). Die Einsatzgebiete für Nanopartikel sind vielseitig und ständig kommen neue hinzu. Durch den gestiegenen und stetig weiter zunehmenden Gebrauch von Nanopartikeln ist auch der Bedarf einer zuverlässigen Risikobewertung für diese in der Umwelt immer notwendiger geworden (Oberdörster *et al.*, 2005; Nel *et al.*, 2006; Klaine *et al.*, 2008; Savolainen *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2015). Für eine zuverlässige Risikobewertung müssen jedoch Daten hinsichtlich Exposition und die daraus resultierenden Effekte vorliegen (Klaine *et al.*, 2008; Mueller und Nowack, 2008; Gottschalk und Nowack, 2011). Wie im Folgenden dargelegt wird, ist es allerdings sehr diffizil, diese Daten für Nanopartikel mit bisherigen Methoden zu erheben, weswegen große Wissenslücken hinsichtlich ihres Risikopotenzials bestehen. Um dem entgegenzuwirken, ist es Gegenstand der vorliegenden Arbeit, die Effekte von Nanopartikeln, beziehungsweise deren Effekte in Kombination mit einer weiteren Substanz, auf einen Vertreter der Invertebraten zu untersuchen.

Bezüglich der Exposition von Biota in ihrer Umwelt ist durch die zahlreichen Einsatzgebiete von synthetischen Nanopartikeln davon auszugehen, dass deren Eintrag in die verschiedenen Umweltkompartimente zunehmend steigt (Nowack und Bucheli, 2007; Klaine *et al.*, 2008; Gottschalk und Nowack, 2011; Nowack *et al.*, 2012). Der Eintrag in aquatische Systeme erfolgt zum Teil absichtlich, indem zum Beispiel synthetische Fe⁰-Nanopartikel, die durch ihre reaktive Oberfläche Transformationsreaktionen von Umweltschadstoffen unterstützen oder diese direkt durch Adsorption aus dem Wasser entfernen, in der Grundwassersanierung verwendet werden (Li *et al.*, 2006; Nowack und Bucheli, 2007; Gottschalk und Nowack, 2011; Mueller *et al.*, 2012). Zu einem anderen Teil geschieht der Eintrag unbeabsichtigt, da Nanopartikel durch den Gebrauch von nanopartikelhaltigen Produkten freigesetzt werden können (Oberdörster *et al.*, 2005; Gottschalk und Nowack, 2011; Nowack *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014). Beispiele hierfür stellen die Benutzung von Pflegeprodukten wie

Sonnencremes dar, die TiO₂-Nanopartikel beinhalten, oder das Auswaschen beziehungsweise Abreiben von Silbernanopartikeln aus antibakteriellen Kleidungsstücken (Benn und Westerhoff, 2008; Gottschalk und Nowack, 2011). Von Nanopartikeln natürlichen Ursprungs ist bekannt, dass ihr Umweltverhalten von ihrer Mobilität, Stabilität und den Oberflächenreaktionen bestimmt wird (Christian *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2014; Schultz *et al.*, 2015). Diese Eigenschaften sind wiederum von den Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel abhängig, welche von biotischen und abiotischen Faktoren beeinflusst werden können (Nowack *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014). Prinzipiell ist davon auszugehen, dass das Umweltverhalten von synthetischen Nanopartikeln dem ihrer natürlichen Pendanten ähnlich ist, jedoch nur unter der Voraussetzung, dass die Oberfläche dieser synthetischen Nanopartikel nicht weiter chemisch modifiziert wurde (Wagner *et al.*, 2014). Dies trifft auf viele synthetische Nanopartikel hingegen nicht zu, da sie beispielsweise mit organischen Hüllen versehen werden, die eine homogene Partikelverteilung in der Formulierung gewährleisten sollen (Nowack *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014). Diese Oberflächenveränderungen führen potenziell dazu, dass andere Prozesse an der Nanopartikeloberfläche stattfinden können. Daher ist davon auszugehen, dass (unter Berücksichtigung der Stabilität der organischen Hülle) sich synthetische Nanopartikel in der Umwelt anders als ihre natürlichen Pendanten verhalten (Nowack und Bucheli, 2007; Wagner *et al.*, 2014). Daher ist es von hoher Relevanz, eine Risikoabschätzung für synthetische Nanopartikel durchzuführen, selbst wenn davon auszugehen ist, dass ihre Konzentrationen ein Vielfaches unter den Konzentrationen natürlicher Nanopartikel liegen (Delay und Frimmel, 2012; Wagner *et al.*, 2014). Hinzu kommt, dass völlig neue Nanopartikel ohne natürliche Gegenstücke synthetisiert werden können, deren Verbleib und Effekte in der Umwelt erst noch bestimmt werden müssen (Wagner *et al.*, 2014). Eine Risikobeurteilung gestaltet sich jedoch umso schwieriger, da trotz verstärkter Forschung in den letzten Jahren nur sehr wenig über die Eintragungsmengen und Umweltkonzentrationen von synthetischen Nanopartikeln, speziell die der unabsichtlich eingetragenen, bekannt ist (Gottschalk und Nowack, 2011). Die Ursachen hierfür liegen unter anderem darin, dass die Messmethoden zum Nachweis von Nanopartikeln bislang noch nicht ausgereift genug, beziehungsweise noch nicht ausreichend vereinheitlicht sind (zum Beispiel Mueller und Nowack, 2008; Scown *et al.*, 2010; Gottschalk und Nowack, 2011; Delay und Frimmel, 2012; Nowack *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014). Schwierigkeiten, die Umweltkonzentrationen synthetischer Nanopartikel zu bestimmen, bestehen unter anderem darin, dass sie in komplexen Matrices analytisch oft nicht von natürlichen Nanopartikeln unterschieden werden können oder dass die Probenaufbereitung die Nanopartikeleigenschaften (zum Beispiel ihr Aggregationsverhalten und folglich auch die Partikelgröße) zu stark beeinflusst (zum Beispiel Delay und Frimmel, 2012; Nowack *et al.*, 2012; Von der Kammer *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014). Hinzu kommt, dass sowohl natürliche als auch synthetische Nanopartikel in der Umwelt altern und sich somit verändern können, beispielsweise durch Aggregationen, Abrieb an der Nanopartikeloberfläche und durch photochemische Transformationen (zum Beispiel Aiken *et al.*, 2011; Delay und Frimmel, 2012; Lesniak *et al.*, 2012; Nowack *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014; Schultz *et al.*, 2015). Dies geht mit einem Wechsel ihrer ursprünglichen

Eigenschaften, wie etwa dem Aggregationsverhalten, einher, was sich wiederum in einer Änderung ihrer biologischen Effekte und ihrer Möglichkeiten, analytisch nachgewiesen werden zu können, äußern kann (Gottschalk und Nowack, 2011; Delay und Frimmel, 2012; Nowack *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014). Im Allgemeinen lassen sich viele Methoden bei der Analyse von Nanopartikeln aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften nicht anwenden (Nel *et al.*, 2006; Nowack *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2015; Hansen *et al.*, 2017). Hinzu kommt, dass die Vergleichbarkeit verschiedener Nanopartikel nur sehr gering ist, da Variationen in beispielsweise der Größe, Form und der Oberflächenbeschaffenheit stark unterschiedliche Nanopartikeleigenschaften zur Folge haben (Nel *et al.*, 2006; Klabunde und Richards, 2009; Von der Kammer *et al.*, 2012). Darüber hinaus können unterschiedliche Versuchsmethoden einen enormen Einfluss auf die Nanopartikeleigenschaften nehmen, da unterschiedliche pH-Werte oder Adsorption von organischen oder anorganischen Substanzen beispielsweise die Reaktivität oder Stabilität der Nanopartikel verändern können (zum Beispiel Baun *et al.*, 2008a; Auffan *et al.*, 2009; Nowack *et al.*, 2012; Von der Kammer *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2017). Dies führt dazu, dass sogar Studien mit identischen Nanopartikeln nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Diese Einschränkungen erschweren auch die Analyse biologischer Effekte von Nanopartikeln. So können sich beispielsweise Änderungen durch Alterungsprozesse stark auf die Ökotoxizität der Partikel auswirken (Nel *et al.*, 2006; Lesniak *et al.*, 2012; Nowack *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014; Schultz *et al.*, 2015; Hansen *et al.*, 2017), indem Nanopartikel zum Beispiel mit der Zeit zerfallen und ihre Bestandteile sowie gebundene Substanzen freisetzen (Auffan *et al.*, 2009; Nowack *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2017). So zeigt eine Studie von Kittler *et al.* (2010), dass sich Silbernanopartikel über die Zeit hinweg durch Freisetzung von Silberionen „auflösen“. Diese Ionen führen zu einer erhöhten Toxizität der gealterten Nanopartikel im Vergleich zu den ursprünglichen. Da in vielen Toxizitätsstudien aber die ursprünglichen Nanopartikel verwendet werden beziehungsweise wurden (Schultz *et al.*, 2015; Hansen *et al.*, 2017), ist über die (Öko-)Toxizität von gealterten Nanopartikeln heute vergleichsweise wenig bekannt (Schultz *et al.*, 2015). Zusätzlich besteht ein dringender Bedarf, die bereits bestehenden Testprotokolle so anzupassen, dass die Besonderheiten von Nanopartikeln, wie zum Beispiel ihr Verhalten in Suspensionen, in den Tests berücksichtigt werden (Dhawan und Sharma, 2010; Scown *et al.*, 2010; Nowack *et al.*, 2012; Hansen *et al.*, 2017). Darüber hinaus sollten (Fest-)Stoffe, für die eine Risikoanalyse bereits durchgeführt wurde, erneut getestet werden, wenn sie als Nanopartikel appliziert werden, da diese aufgrund ihrer geringen Größe komplett andere und oftmals toxischere Eigenschaften haben können als größere Partikel desselben Materials (Oberdörster *et al.*, 2005; Nel *et al.*, 2006; Klabunde und Richards, 2009; Aiken *et al.*, 2011; Delay und Frimmel, 2012; Hansen *et al.*, 2017). Prinzipiell ist davon auszugehen, dass Lebewesen an natürliche Nanopartikel zu einem gewissen Grad adaptiert sind, da diese seit jeher existieren (Kahru und Dubourguier, 2010). Dennoch können die Effekte von Nanopartikeln auf Biota sehr vielfältig sein und müssen speziell für synthetische Nanopartikel untersucht werden, da diese potenziell eine neue Gefahr für Organismen darstellen (Kahru und Dubourguier, 2010). So können Nanopartikel beispielsweise

Zellmembranen schädigen und in Zellen eindringen (Nel *et al.*, 2006; Nel *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011). Außerdem wird die Entstehung von schädlichen reaktiven Sauerstoffspezies durch die große reaktive Oberfläche der Nanopartikel begünstigt, was wiederum zu oxidativem Stress führt (zum Beispiel Nel *et al.*, 2006; Auffan *et al.*, 2009; Nel *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2017). Bei vielen Reaktionen zwischen Nanopartikeln und Zellen, Geweben oder Organen ist die Sorption von Stoffen an die Nanopartikel ein bedeutender Faktor. Durch diese Art der Interaktion binden Nanopartikel beispielsweise Proteine an sich, wodurch eine sogenannte Proteinkorona entsteht. Diese wiederum kann einen starken Einfluss auf die Aufnahmeprozesse in Zellen ausüben (zum Beispiel Nel *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011; Lesniak *et al.*, 2012). Hinzu kommt, dass Nanopartikel durch Sorption den Transport und die (Bio-)Verfügbarkeit verschiedener (Schad-)Stoffe modifizieren können. So ist für natürliche Nanopartikel bekannt, dass sie in der Umwelt eine tragende Rolle im Stofftransport und der Stoffverfügbarkeit verschiedener Substanzen spielen, wodurch sie auch Veränderungen in Ökosystemen abpuffern (Christian *et al.*, 2008; Hochella *et al.*, 2008; Klaine *et al.*, 2008; Hartland *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2014) oder die Bioverfügbarkeit von beispielsweise Metallen reduzieren (Hartland *et al.*, 2013). Dies kann sich unterschiedlich auf die Lebewesen eines Ökosystems auswirken. So führt eine reduzierte Bioverfügbarkeit von giftigen Metallen zu positiven Effekten, wohingegen eine Sorption von Mikronährstoffen negative Folgen mit sich ziehen würde (Hartland *et al.*, 2013). Nanopartikel können jedoch auch zu einer verstärkten Aufnahme von schädlichen Substanzen in den Organismus führen, wie die Studien von Sun *et al.* (2007) und Zhang *et al.* (2007) zeigen. Diese ergaben, dass Arsen oder Cadmium durch die Zugabe von TiO₂-Nanopartikeln verstärkt in Geweben von Karpfen (*Cyprinus carpio*) nachgewiesen werden konnten, was wiederum auf die Adsorption der beiden Stoffe an die TiO₂-Nanopartikel in Kombination mit der Aufnahme der TiO₂-Nanopartikel zurückgeführt wurde. Neben natürlich vorkommenden Substanzen wie den eben genannten, können Nanopartikel auch (Schad-)Stoffe anthropogenen Ursprungs, zum Beispiel Pestizide, binden (Baun *et al.*, 2008b; Xu *et al.*, 2012). Die ökotoxikologischen Effekte dieser Interaktionen sind jedoch bislang nur spärlich untersucht worden. Die wenigen zu dieser Thematik durchgeführten Studien haben gezeigt, dass beispielsweise an C₆₀-Nanopartikel gebundenes Phenanthren eine stärkere toxische Wirkung auf *Daphnia magna* besitzt als Phenanthren als Einzelsubstanz (Baun *et al.*, 2008b). Ein positiver Effekt auf Biota durch die Adsorption von Xenobiotika an Nanopartikeln wurde ebenfalls in der Studie von Baun *et al.* (2008b) nachgewiesen. Hier wurde gezeigt, dass die Toxizität des Pestizids Pentachlorphenol (PCP) auf *D. magna* durch Adsorption an C₆₀-Nanopartikelaggregaten reduziert wird, was vermutlich in einer verminderten Bioverfügbarkeit des PCP begründet ist. Andere Beispiele hierfür sind aus den Studien von Koelmans *et al.* (2006) oder Knauer *et al.* (2007) zu entnehmen, die zeigten, dass die Toxizität von organischen Schadstoffen durch Adsorption an Rußpartikel reduziert werden kann. Unter der Berücksichtigung der Tatsache, dass die Interaktionen sehr vielfältig sind und zudem in der Umwelt unzählige Stoffe parallel auftreten und interagieren können, kommt man schnell zu der Erkenntnis, dass

zu einer umfassenden Risikoabschätzung von Nanopartikeleffekten die Forschung auf diesem Gebiet intensiviert werden muss.

1.2.2. Der Hintergrund der Studie

Die vorliegende Arbeit soll zum Grundverständnis der biologischen Wirkungen von Nanopartikeln in der Umwelt beitragen. Hierfür wurden verschiedene Interaktionen zwischen Nanopartikeln und dem Insektizid Thiacloprid hinsichtlich dessen Toxizität auf Larven der Zuckmücke *Chironomus riparius* untersucht. Zu diesem Zweck wurden zum einen Nanopartikel verwendet, welche Thiacloprid nicht binden, da der Effekt eines solchen Zusammenspiels bislang noch nicht gezielt betrachtet wurde. Zum anderen wurden Nanopartikel getestet, die Thiacloprid sehr gut sorbieren (beziehungsweise in ihre Poren einlagern – der genaue Sorptionsmechanismus ist bislang nicht bekannt), um zu ermitteln, ob diese die Bioverfügbarkeit des Insektizids herabsetzen, oder ob sie als Vektor fungierend die Aufnahme von Thiacloprid verstärken. Zudem wurden Techniken zur Lokalisation von Nanopartikeln im Körper der Chironomidenlarven angewandt, um Informationen über den Verbleib der Nanopartikel im Organismus zu erhalten. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Partikel fast ausschließlich größer als 100 nm waren und somit nach strikter Definition (ISO/TS 80004-1:2015) keine Nanopartikel im eigentlichen Sinne darstellen. Da die Primärpartikel der verwendeten Materialien jedoch allesamt deutlich kleiner als 1 µm waren und es aus biologischer Sicht keine Grundlage dafür gibt, eine Grenze für die Bezeichnung „Nanopartikel“ bei exakt 100 nm zu ziehen (Christian *et al.*, 2008; Klaine *et al.*, 2008; Oberdörster, 2010), soll im weiteren Verlauf der Arbeit dennoch der Begriff „Nanopartikel“ verwendet werden.

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden synthetische Nanopartikel verwendet, um möglichst homogene Partikel zu erhalten. Die Nanopartikel bestanden entweder aus Aluminiumoxid (Al_2O_3), aus mikroporösen Alumosilicaten (aus der Stoffgruppe der Zeolithe) oder aus Siliciumdioxid (SiO_2). Diese Stoffe kommen auch in der Natur vor. So bildet Al_2O_3 zum Beispiel in kristalliner Form Korund und SiO_2 Quarz. Ebenfalls kommen Zeolithe in der Natur in verschiedensten Formen vor, wobei die natürlichen Äquivalente der hier verwendeten Y30- (Faujasit-Typ) und H-Beta(OH)-III-Zeolithe (Tschernichit-Typ) sehr rar sind.

Verschiedenste Partikel der oben genannten Stoffe finden in vielen Gebieten Anwendung. So werden Al_2O_3 -Nanopartikel beispielsweise in Keramiken und als Schleifmittel (Stanley *et al.*, 2010) verwendet, wohingegen verschiedenste SiO_2 -Nanopartikel in der Medizin als Wirkstoffträger (Slowing *et al.*, 2008) oder als wasserabweisende Beschichtung auf Bekleidung (Zhang und Lamb, 2009) eingesetzt werden. Zeolithe haben aufgrund ihres geordneten Aufbaus (bestehend aus Tetraedern aus AlO_4 und SiO_4) sehr regelmäßige Poren, weswegen sie beispielsweise als molekulare Siebe Anwendung finden und sehr gute adsorptive Eigenschaften haben. Anwendung finden Zeolithe unter anderem in der Wasseraufbereitung oder zur Geruchskontrolle (zum Beispiel Ötker und Akmehmet-Balcioğlu, 2005; Braschi *et al.*, 2010; Wang und Peng, 2010).

Das in der Studie verwendete Pestizid Thiacloprid zählt, wie die Stoffe Imidacloprid oder Clothianidin, zu den neonicotinoiden Insektiziden, kurz Neonicotinoide genannt. Neonicotinoide sind synthetische Substanzen, die, wie der Name sagt, auf der Struktur des natürlich vorkommenden Nikotins basieren (zum Beispiel Tomizawa und Casida, 2005; Jeschke *et al.*, 2013). Sie agieren als selektive Agonisten des post-synaptischen nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) von Insekten. Bei deren Rezeptorbindung kommt es zu einer Dauererregung der Nervenzellen, welche zum Tode führen kann (zum Beispiel Tomizawa und Casida, 2003, 2005; Elbert *et al.*, 2008; Aiken *et al.*, 2011; Goulson, 2013; Jeschke *et al.*, 2013; Morrissey *et al.*, 2015). Da sich die nAChR von Insekten und Säugetieren strukturell unterscheiden, ist die Toxizität auf Säugetiere im Vergleich zur Toxizität auf Insekten um ein Vielfaches geringer, weswegen sie als vergleichsweise ungefährlich für Menschen gelten (zum Beispiel Tomizawa und Casida, 2003, 2005; Elbert *et al.*, 2008; Jeschke *et al.*, 2013; Morrissey *et al.*, 2015). Neonicotinoide sind Kontaktgifte mit systemischer Wirkung und werden besonders gegen saugende Insekten wie Blattläuse oder Zikaden eingesetzt (Jeschke *et al.*, 2013). Aus ökotoxikologischer Sicht besteht ein großes Interesse an Neonicotinoiden, da diese auch Nichtzielorganismen wie Bienen und Hummeln, welche wichtige Bestäuber sind, schädigen können (zum Beispiel Blacquière *et al.*, 2012; Henry *et al.*, 2012; Whitehorn *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2014; Ellis *et al.*, 2017). So ist einigen Studien zu entnehmen, dass sich Neonicotinoide negativ auf das Wachstum der Kolonien und die Entstehung von Bienenköniginnen auswirken können (Whitehorn *et al.*, 2012; Ellis *et al.*, 2017). Ebenso ist bekannt, dass sich Neonicotinoide negativ auf die Orientierung von Bienen auswirken, die dadurch Nahrungsquellen oder ihren Stock nicht wiederfinden können (zum Beispiel Bortolotti *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008; Blacquière *et al.*, 2012; Henry *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2014). Diese Effekte wirken sich nicht nur negativ auf die Bienenpopulationen aus, sie haben in Folge dessen auch starke Effekte auf das gesamte Ökosystem. Da diese Effekte aber subletale Endpunkte darstellen, die in dieser Form nicht Bestandteil der vorgeschriebenen Toxizitätstests zur Einstufung der Bienengefährdung sind (Goulson, 2013), darf beispielsweise das Insektizid Calypso® als „nicht bienengefährlich“ beworben werden, wovon die Industrie Gebrauch macht. Calypso® wird seit dem Jahr 2000 von Bayer CropScience vertrieben und enthält das Neonicotinoid Thiacloprid als Wirkstoff (Elbert *et al.*, 2008), welches in der vorliegenden Arbeit als Testsubstanz (in Kombination mit Nanopartikeln) verwendet wurde. Durch den strukturellen Aufbau von Thiacloprid, genauer gesagt, durch das Vorhandensein eines Cyano-Substituenten, ist die akute Bienentoxizität deutlich geringer als für andere Neonicotinoide wie Imidacloprid, welche nitro-substituiert sind (Iwasa *et al.*, 2004). Dennoch nimmt die Anzahl an Studien zu, die zeigen, dass auch Thiacloprid negative Effekte auf Bienen und Hummeln, wie zum Beispiel eine Reduktion der Koloniegroße und eine Beeinträchtigung der Orientierung, ausübt (Fischer *et al.*, 2014; Ellis *et al.*, 2017). Den Haupteintrittspfad von Neonicotinoiden in aquatische Systeme stellt das Ausspülen von Feldern (run-off) nach Regenfällen dar (Chiovarou und Siewicki, 2008; Morrissey *et al.*, 2015), da Neonicotinoide gut wasserlöslich sind (Goulson, 2013; Jeschke *et al.*, 2013). So hat Thiacloprid einen log K_{ow} Wert von 1,26 (bei 20 °C), wodurch es hydrophil genug ist, um im Xylem

von Pflanzen transportiert zu werden und somit systemisch wirken kann. Derzeit liegen nur wenige Daten über die Umweltkonzentrationen von Thiacloprid vor, die zudem stark voneinander abweichen. So wurden in einer Studie von Süß *et al.* (2006) in den Jahren zwischen 2001 und 2003 Umweltkonzentrationen von bis zu 4,5 µg/L Thiacloprid in Entwässerungsgräben von Obstplantagen im Alten Land bei Hamburg nachgewiesen. Aus anderen Studien geht hervor, dass Höchstkonzentrationen von Thiacloprid in Oberflächengewässern zwischen 0,065 µg/L in der Schweiz und 1,37 µg/L in Australien nachgewiesen wurden (Moschet *et al.*, 2013; Sánchez-Bayo und Hyne, 2014; Morrissey *et al.*, 2015). Weitere Studien konnten wiederum trotz geringer Nachweisgrenzen kein Thiacloprid in der Umwelt nachweisen (zum Beispiel Hladik *et al.*, 2014). Daten über Thiaclopridkonzentrationen in Biota sind ebenfalls nur vereinzelt in der Literatur zu finden. Ein Beispiel hierfür ist die Studie von Inostroza *et al.* (2016), bei der in Geweben von *Dikerogammarus* spp. aus der Donau Thiaclopridkonzentrationen von 0,1-0,39 ng/g nachgewiesen werden konnten. Allerdings gilt Thiacloprid, basierend auf dem vergleichsweise geringen log K_{OW} Wert, generell als nicht-bioakkumulativ.

In der vorliegenden Arbeit wurden Studien mit der Zuckmückenart *Chironomus riparius* durchgeführt, um einerseits mögliche Effekte von Nanopartikeln auf diese Tierart zu dokumentieren, andererseits jedoch insbesondere zu untersuchen, ob und wie Nanopartikel die Toxizität von Thiacloprid modulieren. Des Weiteren wurde geprüft, ob und wo die Nanopartikel in den Organismen verbleiben. *Chironomus riparius* eignet sich für dieses Ziel ausgezeichnet, da bereits diverse Studien die Toxizität von Neonikotinoiden auf diese Art untersucht haben (zum Beispiel Schmuck, 2001; Stoughton *et al.*, 2008; Langer-Jaesrich *et al.*, 2010; Azevedo-Pereira *et al.*, 2011a; Azevedo-Pereira *et al.*, 2011b; Cavallaro *et al.*, 2016; Saraiva *et al.*, 2017). Hierbei wurde für *C. riparius* eine hohe Sensitivität gegenüber Thiacloprid und Neonikotinoide generell festgestellt (Schmuck, 2001; Beketov und Liess, 2008; Langer-Jaesrich *et al.*, 2010; Morrissey *et al.*, 2015). So liegt der LC₅₀ Wert von Thiacloprid für chronisch exponierte Chironomiden (17 Tage) bei 1,57 µg/L (Langer-Jaesrich *et al.*, 2010), während der mittlere LC₅₀ Wert von Neonikotinoiden bei *Daphnia magna* bei rund 44 mg/L liegt (Morrissey *et al.*, 2015). Hinzu kommt, dass Chironomiden aufgrund ihrer sedimentgebundenen und Detritus fressenden Larvenstadien (Armitage *et al.*, 1995) einen geeigneten Modellorganismus darstellen, um Nanopartikel auf ihre biologische Wirkung zu testen. Diese können mit der Zeit sedimentieren, was zu einer direkten Exposition benthischer Organismen führt (Nowack und Bucheli, 2007; Baun *et al.*, 2008a; Oberholster *et al.*, 2011; Nowack *et al.*, 2012). In anderen Studien wurden bereits die Effekte von verschiedenen Nanopartikeln auf Chironomiden untersucht (zum Beispiel Lee *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2011; Oberholster *et al.*, 2011; Nair *et al.*, 2013). Diese Studien zeigten, dass Nanopartikel Effekte auf das Überleben, das Gewicht und die Katalaseaktivität bei Chironomiden haben können sowie gentoxischen Stress verursachen können (Lee *et al.*, 2009; Oberholster *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist die Insektenfamilie Chironomidae für aquatische Systeme von hoher ökologischer Relevanz (Armitage *et al.*, 1995). Sie ist eine der am stärksten abundanten Insektenfamilien in Süßwasserökosystemen mit einer

weltweiten Verbreitung (Armitage *et al.*, 1995). Ihre aquatischen Larven können das Benthos mancher Süßwasserökosysteme dominieren, was wiederum Einfluss auf die Größe von beispielsweise Fischpopulationen haben kann, denen sie als Nahrung dienen (Armitage *et al.*, 1995). Auf Grund der ökologischen Relevanz dieser Art, in Kombination mit der relativ einfachen Hälterung unter Laborbedingungen, zählen Chironomiden zu den etablierten Testorganismen in der Ökotoxikologie (zum Beispiel OECD, 2004a, b, 2010, 2011).

1.2.3. Die Hypothesen

Die hier vorliegende Arbeit dient dazu, kapitelübergreifend drei Nebenhypothesen und eine Haupthypothese zu testen. Die Nebenhypothesen lauten:

- H1)** Die verwendeten Nanopartikel alleine haben einen akut toxischen Effekt auf die Larven der Zuckmücke *Chironomus riparius* (Teil 3, Kapitel 1 und 2).
- H2)** Es kommt zu einer zellulären Aufnahme der verwendeten Nanopartikel in Larven der Zuckmücke *Chironomus riparius* (Teil 3, Kapitel 1, 2 und 3).
- H3)** Das Neonicotinoid Thiacloprid hat als Einzelsubstanz akut toxische Effekte auf Larven der Zuckmücke *Chironomus riparius* (Teil 3, Kapitel 1 und 2).

Die Haupthypothese der Arbeit lautet:

- H4)** Bindende und nicht-bindende Nanopartikel modifizieren die akute Toxizität des neonicotinoiden Insektizids Thiacloprid auf Larven der Zuckmücke *Chironomus riparius* (Teil 3, Kapitel 1 und 2).

1.2.4. Der Aufbau der Studien

In Teil 3, Kapitel 1 der vorliegenden Arbeit wurden akute Toxizitätstests mit Thiacloprid und Al₂O₃-Nanopartikeln durchgeführt, die nachweislich kein Thiacloprid binden. Durch den gewählten Versuchsaufbau war es möglich, zu testen, wie sich nicht-bindende Nanopartikel in zwei verschiedenen Konzentrationen auf die Toxizität von vier verschiedenen Thiaclopridkonzentrationen auf *C. riparius* Larven auswirken und welche akute Toxizität die Nanopartikel alleine oder das Thiacloprid als singuläre Substanzen haben.

In Teil 3, Kapitel 2 wurden in weiteren akuten Toxizitätstests zwei verschiedene Zeolith-Nanopartikel (Y30 und H-Beta(OH)-III) getestet, welche Thiacloprid nachweislich sehr gut binden. In diesen akuten Toxizitätstests wurde eine konstante Thiaclopridkonzentration appliziert und diese in Kombination mit niedrigen, mittleren und hohen Nanopartikelkonzentrationen getestet. Die verschiedenen Konzentrationen an Zeolith-Nanopartikeln waren für beide Zeolithe gleich und beruhten auf den sorptiven Eigenschaften des Y30-Zeolithes. Sie wurden so gewählt, dass die niedrige Konzentration an Y30-Nanopartikeln 30 %, die mittlere 60 % und die hohe 97 % des Thiacloprids in den Mischversuchen band. Hierdurch konnten die Effekte mit zunehmender Bindung des Thiacloprids in die Nanopartikel

analysiert werden. Die Versuche mit H-Beta(OH)-III-Zeolithen wurden durchgeführt, da dessen Primärpartikel deutlich kleiner sind als die der Y30-Zeolithe. Hierdurch konnte der Effekt der Primärpartikelgröße untersucht werden. Zusätzlich wurden auch in diesen Toxizitätstests die akuten Effekte von Thiachlopid und den beiden Zeolith-Nanopartikeln ermittelt.

Beide akuten Toxizitätstests (Teil 3, Kapitel 1 und 2) wurden durch Begleitanalytik komplettiert. So wurden die Sorptionseigenschaften der Nanopartikel charakterisiert sowie Messungen der Thiachlopidkonzentrationen im Expositionsmedium und in den Larven durchgeführt. Zudem erfolgte eine Lokalisation der verwendeten Al₂O₃- und Zeolith-Nanopartikel mittels LA-ICP-MS Visualisierungstechniken in histologischen Dünnschnitten von *C. riparius* Larven. Die Aufnahme und Lokalisation von Nanopartikeln in *C. riparius* Larven wurde unter anderem auch in Teil 3, Kapitel 3 der vorliegenden Arbeit unter Anwendung einer anderen Messmethode, der Konfokalmikroskopie, untersucht.

Eine Übersicht über die Inhalte der Studien ist der nachfolgenden Tabelle 1 zu entnehmen. Alle durchgeführten Arbeiten dieser Dissertation fanden im Rahmen des EXPAND (= ecotoxicity of particle-associated compounds) Promotionsverbundes der Eberhard Karls Universität Tübingen statt – mit Unterstützung von Kooperationspartnern der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Durch die multidisziplinäre Zusammenarbeit von Wissenschaftlern aus der Chemie, den Geowissenschaften und der Biologie wurde eine umfassende Analyse der Interaktionen zwischen Nanopartikeln und Xenobiotika sowie deren Effekte auf Biota ermöglicht.

Tabelle 1: Übersicht über die Inhalte der durchgeführten Studien.

Teil 3, Kapitel:	Verwendete Nanopartikel	Wurde eine weitere Substanz getestet?	Wurden Mischungen getestet?	Wurde ein akuter Toxizitätstest durchgeführt ?	Wurde eine chemische Analytik durchgeführt?		Wurden Sorptionsexperimente mit den Nanopartikeln durchgeführt?		Wurden Methoden zur Detektion der Nanopartikel in den Larven angewandt?
					Wasser	Larven	Mit ursprünglichen Nanopartikeln	Mit ausgeschiedenen Nanopartikeln	
1	Al₂O₃ (2 Konzentrationen)	Ja , Thiacloprid (4 Konzentrationen)	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja (LA-ICP-MS)
2	Zeolithe: Y30 und H-Beta(OH)-III (3 Konzentrationen, für beide Zeolithe identisch)	Ja , Thiacloprid (1 Konzentration)	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja (LA-ICP-MS)
3	SiO₂ (assoziiert mit Rhodamin B)	Ja , Rhodamin B (1 Konzentration)	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja (Konfokal- mikroskopie)

1.3. Material und Methoden

1.3.1. Die Nanopartikel

Aluminiumoxid-Nanopartikel

Die Al₂O₃-Nanopartikel, die in Teil 3, Kapitel 1 der hier vorliegenden Arbeit Verwendung fanden, wurden von den Kooperationspartnern der AG Anwander (Eberhard Karls Universität Tübingen) basierend auf einer Methode von Roh *et al.* (2011) synthetisiert. Die resultierenden Al₂O₃-Nanopartikel hatten eine mittlere Größe von 410 nm. Sorptionsmessungen von den Kooperationspartnern der AG Haderlein (Eberhard Karls Universität Tübingen) ergaben einen sehr niedrigen K_d-Wert von 78 L/kg und somit *de facto* keine Bindung von Thiaclopid. Weitere Details sind aus Teil 3, Kapitel 1 zu entnehmen.

Zeolith-Nanopartikel

Die Y30-Nanopartikel, die in den Arbeiten zu Teil 3, Kapitel 2 des vorliegenden Werks verwendet wurden, stammen von Kooperationspartnern der AG Haderlein (Eberhard Karls Universität Tübingen), die erworbene Y30-Partikel (Alfa Aesar Thermo Fisher Scientific) in einer Kugelmühle zerkleinerten und über Sedimentation in Wasser fraktionierten. Dadurch standen für die akuten Toxizitätstests Y30-Nanopartikel mit Größen zwischen d₉₀ = 691 nm, d₅₀ = 441 nm und d₁₀ = 202 nm zur Verfügung. Der durch Sorptionsmessungen (durchgeführt von den Kooperationspartnern der AG Haderlein) ermittelte K_d-Wert, der Aufschluss über die Sorptionskapazität von Feststoffen gibt, betrug 82537 L/kg, was für eine starke Bindung des Thiacloprids an die Nanopartikel spricht (siehe Teil 3, Kapitel 2 für weitere Informationen). Der genaue Sorptionsmechanismus zwischen Thiaclopid und den Nanopartikeln ist bislang noch nicht mit Sicherheit bestimmt. Die AG Haderlein führt diesbezüglich derzeit Messungen durch. Nach momentanem Stand der Dinge ist davon auszugehen, dass das Thiaclopid sowohl an der Nanopartikeloberfläche adsorbiert sowie sich in die Poren der porösen Zeolithe setzt.

Das Center for Ordered Nanoporous Materials Synthesis der Pohang University of Science and Technology (POSTECH, Korea) synthetisierte für die vorliegende Arbeit Beta(OH)-III-Nanopartikel mit einer angegebenen Größe von 50 nm. Diese Beta(OH)-III-Nanopartikel wurden von den Kooperationspartnern der AG Anwander (Eberhard Karls Universität Tübingen) kalziniert (um organische Rückstände zu verbrennen), wodurch H-Beta(OH)-III-Nanopartikel entstanden, die in Arbeiten zu Kapitel 2 des dritten Teils der vorliegenden Arbeit Anwendung fanden. Für diese Partikel ergaben Größenmessungen (durchgeführt von den Kooperationspartnern der AG Anwander und AG Haderlein, beide Eberhard Karls Universität Tübingen), dass die circa 50 nm großen Primärpartikel zu Komplexen mit Größen zwischen d₉₀ = 20,9 µm, d₅₀ = 9,2 µm und d₁₀ = 4,1 µm aggregierten oder agglomerierten. Weitere Details sind aus Teil 3, Kapitel 2 zu entnehmen.

Fluoreszierende Siliciumdioxid-Nanopartikel

Die etwa 100 nm großen SiO₂-Nanopartikeln, die in den Arbeiten zu Kapitel 3 im dritten Teil der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden, wurden von den Kooperationspartnern der AG Anwender (Eberhard Karls Universität Tübingen) synthetisiert. Anschließend wurden diese Nanopartikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B (C₂₈H₃₁ClN₂O₃), welcher an die Aminogruppen der Porenkanäle der SiO₂-Nanopartikel bindet, versehen (siehe Teil 3, Kapitel 3 für weitere Informationen). Die Anregungswellenlänge der Fluoreszenz lag bei 350 nm und die Emissionswellenlänge bei 581 nm.

1.3.2. Das Neonikotinoid Thiacloprid

Als Testsubstanz der durchgeführten akuten Toxizitätstests (Teil 3, Kapitel 1 und 2) wurde das zu der Gruppe der Neonikotinoide zählende Thiacloprid (C₁₀H₉ClN₄S) ausgewählt. Getestet wurde der reine Wirkstoff (Sigma-Aldrich, Deutschland, Analytischer Standard, 99,9 % Reinheit). In den durchgeführten Versuchen dieser Dissertation, die eine Exposition gegenüber Thiacloprid beinhalteten, wurde jeweils eine Thiaclopridstammlösung von 5 mg/L Thiacloprid in VE-Wasser angesetzt. Diese wurde bei 7 °C über Nacht im Dunkeln gerührt und anschließend auf die Testkonzentrationen verdünnt (siehe Abschnitt 1.3.4., Tabelle 2 oder Teil 3, Kapitel 1 und 2).

1.3.3. Der Testorganismus *Chironomus riparius*

Der Testorganismus, der Verwendung in den Studien der vorliegenden Dissertation fand, ist die Chironomidenart *Chironomus riparius* (Meigen, 1804).

Systematik (Armitage *et al.*, 1995):

Classis: Insecta

Ordo: Diptera

Subordo: Nematocera

Superfamilia: Chironomoidea

Familia: Chironomidae

Subfamilia: Chironominae

Tribus: Chironomini

Genus: *Chironomus*

Species: *C. riparius*

Die aquatisch lebenden Larven dieser nichtstechenden Zuckmückenart durchwandern vier verschiedene Entwicklungsstadien (Abbildung 1), wobei Larven des ersten Stadiums (L1) pelagisch und die darauffolgenden Stadien (L2-L4) benthisch in eigens gebauten Röhren im Sediment leben.

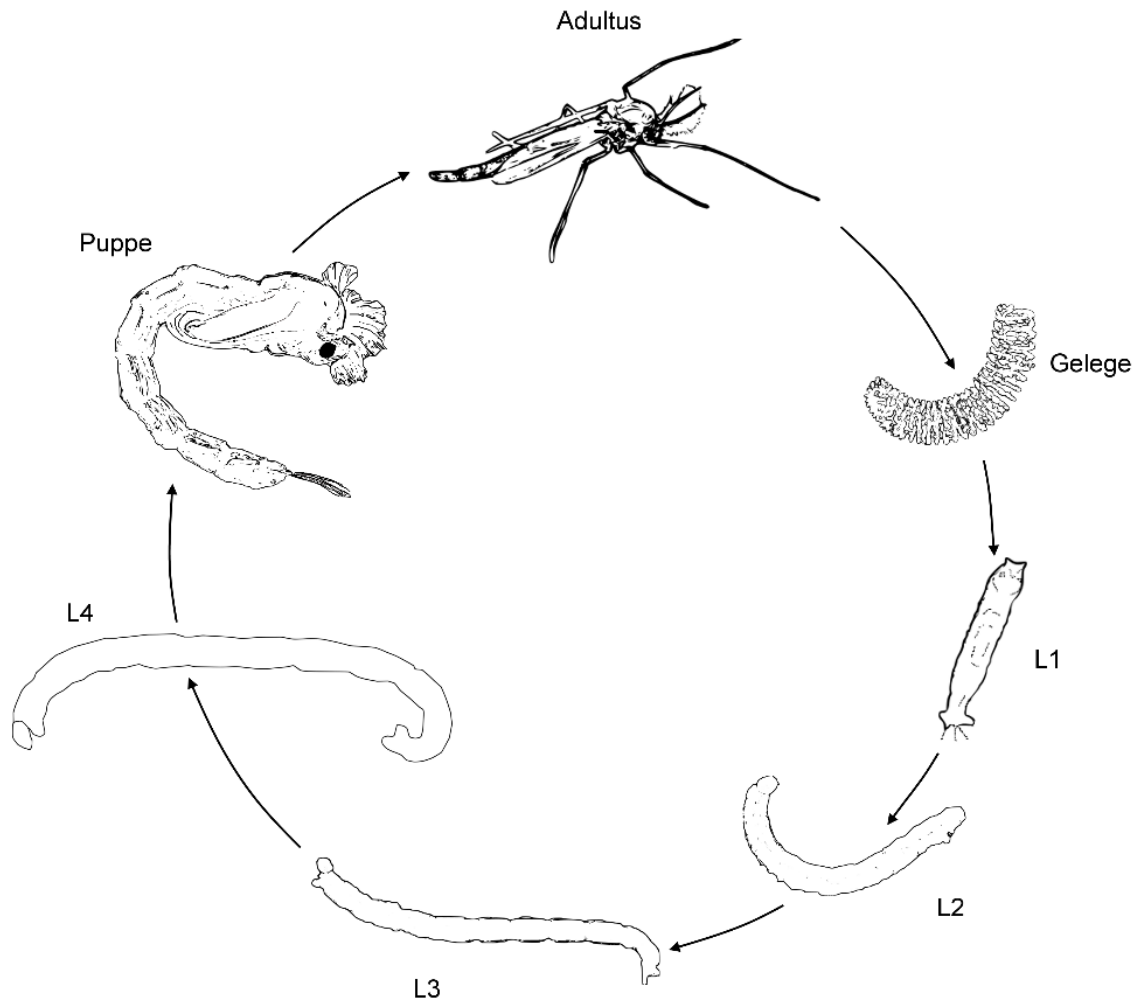


Abbildung 1: Generationszyklus von *C. riparius*.

Dieser wird innerhalb von circa 28 Tagen durchlaufen und besteht aus einem Eigelege, vier Larvenstadien (L1-L4) und einem Puppenstadium, aus dem das adulte Tier hervorgeht.

Während ihrer Larvenstadien ernähren sich die Tiere von Detritus (Armitage *et al.*, 1995), bis ihre Verpuppung (ebenfalls im Sediment) eintritt. Dieses Puppenstadium dauert bis zur Emergenz der adulten Tiere an, welche an der Wasseroberfläche stattfindet. Die Fortpflanzung der Tiere erfolgt getrenntgeschlechtlich, wobei sich die beiden Geschlechter durch einen Sexualdimorphismus leicht unterscheiden lassen. So besitzen die Männchen größere, federartige Antennen, während die der Weibchen kürzer und ungefedert sind. Nach der Paarung legt das Weibchen ein befruchtetes Eigelege ab, das aus mehreren hundert Eiern bestehen kann, die sich in einer geleeartigen Matrix befinden. Dies geschieht an der Grenzfläche von Wasser und Luft, vorzugsweise an festen Objekten wie Wasserpflanzen oder Steinen (Armitage *et al.*, 1995). Nach einigen Tagen schlüpfen aus den abgelegten Eiern die pelagischen L1 Larven. Der gesamte Generationszyklus von *C. riparius* beläuft sich auf nur rund 28 Tage, was einen Grund für ihren häufigen Gebrauch als Modellorganismus darstellt. Darüber hinaus ist diese Tierart einfach unter Laborbedingungen zu halten und gut in Toxizitätstests zu integrieren (Taenzler *et al.*, 2007).

Die *C. riparius* Larven, mit denen die hier beschriebenen Versuche durchgeführt wurden, stammten aus einer im Jahr 2013 etablierten Tierzucht an der Eberhard Karls Universität Tübingen, die aus einem Zuchtstamm der Goethe Universität Frankfurt (Frankfurt am Main, Deutschland) hervorging. Die Zucht wurde in einer Klimakammer eingerichtet (Temperatur: 21 °C ± 0,5 °C, Hell-Dunkel-Rhythmus: 16/8 h), in der die Larven in Plastikbecken (Maße: 30 x 55 x 12 cm) gehältert wurden, in denen sich eine 2-3 cm hohe Schicht Quarzsand und gefiltertes Leitungswasser (durch Eisen- und Aktivkohlefilter gefiltert; Wasserfüllstand: 1-2 cm unterhalb des Beckenrandes) befand. Das Wasser der Becken wurde durch an Druckluft angeschlossene Ausströmsteine mit Sauerstoff versorgt und sachte durchmischt. Alle zwei Tage wurden die Larven mit feingemahlenem TetraMin® Flockenfutter (Tetra, Deutschland) gefüttert und einmal pro Woche wurden 50 % des Wassers durch frisch gefiltertes Leitungswasser und vollentsalztes Wasser (VE-Wasser) im Verhältnis 1:1 ersetzt. Über die Plastikbecken wurde ein Käfig (55 x 65 x 120 cm) aus feinmaschiger Gaze (Maschenweite: 0,5 mm²) gespannt, der den adulten Tieren erlaubte, zu schwärmen und sich fortzupflanzen.

1.3.4. Der akute Toxizitätstest

Zur Beantwortung der Fragestellung, wie sich bindende und nicht-bindende Nanopartikel auf die Toxizität von Thiacloprid auswirken (Teil 3, Kapitel 1 und 2), wurden akute Toxizitätstests durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden im Voraus die zu testenden Lösungen/Dispersionen (Tabelle 2) in gefiltertem Leitungswasser angesetzt.

Tabelle 2: Testkonzentrationen von Thiacloprid und den Nanopartikeln für die akuten Toxizitätstests (Teil 3, Kapitel 1 und 2) und die Sorption von Thiacloprid an die Nanopartikel.

	Versuchsgruppe	Thiacloprid [µg/L]	Nanopartikel [mg/L]	Sorption von Thiacloprid [%]
Teil 3, Kapitel 1	Kontrolle	0	0	-
	Thiacloprid (einzeln)	0,5	0	-
		1,0		
		2,0		
		5,0		
	Al ₂ O ₃ -Nanopartikel (einzeln)	0	300	-
			1000	
	Mischung A	0,5	300	0
		1,0		
		2,0		
		5,0		
	Mischung B	0,5	1000	0
1,0				
2,0				
5,0				
Teil 3, Kapitel 2	Kontrolle	0	0	-
	Thiacloprid (einzeln)	1,0	0	-
	Y30-Nanopartikel (einzeln)	0	5,2	-
			18,2	
			391,7	
	H-Beta(OH)-III- Nanopartikel (einzeln)	0	5,2 (± 5 %)	-
			18,2 (± 5 %)	
			391,7 (± 5 %)	
Mischung mit Y30-Nanopartikeln	1,0	5,2	30	
		18,2	60	
		391,7	97	
Mischung mit H-Beta(OH)-III- Nanopartikeln	1,0	5,2 (± 5 %)	unbekannt	
		18,2 (± 5 %)		
		391,7 (± 5 %)		

Zum Ansetzen der Versuchslösungen/-dispersionen wurden die jeweiligen Stoffmengen an Al_2O_3 - und H-Beta(OH)-III-Nanopartikeln abgewogen, während die benötigten Konzentrationen an Y30-Nanopartikeln und Thiacloprid aus Stammlösungen verdünnt wurden. Um Agglomerationen an Nanopartikeln einzuschränken und um eine homogene Nanopartikelverteilung zu gewährleisten, wurde jede Dispersion vor dem Gebrauch 15 min lang mit Ultraschall behandelt. Darüber hinaus wurden die Mischungen für 1 h inkubiert, sodass Thiacloprid in Präsenz von bindenden Nanopartikeln von diesen gebunden werden konnte.

Die Exposition der *C. riparius* Larven gegenüber den diversen Ansätzen erfolgte in den anschließenden akuten Toxizitätstests. Diese wurden in runden Glasgefäßen (Durchmesser: 7 cm, Höhe: 6,5 cm) in einer Klimakammer (Temperatur: $21 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$, Hell-Dunkel-Rhythmus: 16/8 h) durchgeführt. Die Versuchsgefäße wurden mit den jeweiligen Versuchslösungen über Nacht abgesättigt, bevor 30 g feinputikulärer, reiner Quarzsand (Partikelgröße: 0,1-0,3 mm) als Sediment eingefüllt wurde. Auf künstliche Sedimente, wie sie beispielsweise in den OECD Richtlinien für Toxizitätstests mit Chironomiden (Richtlinien 218, 219 und 233 (OECD, 2004a, b, 2010)) empfohlen werden, wurde verzichtet, um mögliche Interaktionen zwischen den Testsubstanzen und dem Sediment auszuschließen. Bei Quarzsand hingegen ist davon auszugehen, dass es zu keinen Interaktionen mit Thiacloprid kommt, da Quarz das Insektizid unter den gegebenen Versuchsbedingungen (pH-Wert: $7,8 \pm 0,2$) nicht bindet. Außerdem wurde der Quarzsand vor Gebrauch für mehrere Stunden bei $> 200 \text{ °C}$ gebrannt, um organische Rückstände und Mikroorganismen zu minimieren. Im Anschluss an das Einbringen der Sedimente wurden 100 mL Testlösung/-dispersion in die Versuchsgefäße gegeben. Um thermischen Stress zu vermeiden, wurden die Versuchslösungen zwecks Temperaturlausgleich für 2 h in der Klimakammer positioniert, bevor die Temperatur gemessen und die Chironomidenlarven eingesetzt wurden. Pro Versuchsglas wurden fünf *C. riparius* Larven des vierten Larvenstadiums mit einer gekürzten Glaspipette eingesetzt und die Gefäße im Anschluss mit Parafilm® (Carl Roth GmbH, Deutschland) verschlossen. Alle Versuchsgläser wurden randomisiert auf einen Tisch in der Klimakammer platziert (Abbildung 2).



Abbildung 2: Versuchsaufbau für den akuten Toxizitätstest mit *C. riparius* Larven.

In jedem Testgefäß befinden sich 100 mL Testlösung, 30 g feinputikulärer Quarzsand und fünf exponierte Larven.

Die Exposition der Tiere fand über eine Dauer von insgesamt 96 h statt. Während dieser Zeit erfolgte keine Fütterung, um mögliche Interaktionen zwischen den Testsubstanzen und der Nahrung zu vermeiden. Während der Exposition wurde nach 24, 48, 72 und 96 h die Mortalitätsrate der Larven ermittelt. Tiere galten als tot, wenn sie sich innerhalb von 30 s nach Stimulation (sanfter Wasserstrahl aus der Pipette) nicht bewegten oder unauffindbar waren. Um eine Kontamination des Testmediums zu vermeiden, wurden tote Tiere aus den Versuchsgläsern entfernt. Neben der Mortalitätsrate wurden auch Verhaltensstörungen der Tiere als subletaler Endpunkt erfasst. Als solches zählte die Unfähigkeit der Tiere, sich in den Sand einzugraben oder das Auftreten unkontrollierter Zuckungen. Der Test wurde als valide gewertet, wenn die Mortalitätsrate der Kontrolltiere unter 10 % lag, was den natürlichen Verhältnissen entspricht.

1.3.5. Die Begleitanalytik

Für die Interpretation der Ergebnisse der akuten Toxizitätstests wurden weitere Analysen durch Kooperationspartner der Eberhard Karls Universität Tübingen und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt.

Probenentnahme für die Begleitanalytik

Zur Ermittlung der Thiaclopridkonzentrationen im Medium und in den Organismen sowie zur Ermittlung der Sorptionseigenschaften der von Chironomidenlarven ausgeschiedenen Al_2O_3 -Partikeln sowie zur Lokalisation der Nanopartikel in den Chironomidenlarven, wurden Proben aus dem akuten Toxizitätstest entnommen und den Kooperationspartnern für die Analysen zur Verfügung gestellt.

Für die chemische Analytik wurden Proben des Mediums zu Beginn und zu Ende des Versuches entnommen und unmittelbar nach Entnahme tiefgefroren ($-18\text{ }^\circ\text{C}$). Zur Ermittlung der internen Thiaclopridkonzentration wurden Tiere mit gefüllten Därmen (siehe Teil 3, Kapitel 2) und/oder Tiere mit entleerten Därmen (siehe Teil 3, Kapitel 1 und 2) analysiert. Erstere wurden direkt nach Beendigung des akuten Toxizitätstestes in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Für den zweiten Fall wurden die Tiere im Anschluss an den akuten Toxizitätstest in gefiltertes Leitungswasser überführt, wo sie für 24 h verblieben, um ihre Därme zu entleeren. Anschließend wurden auch diese Tiere schockgefroren und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Um die Sorptionseigenschaften ausgeschiedener Al_2O_3 -Nanopartikel zu messen (siehe Teil 3, Kapitel 1), wurde das gefilterte Leitungswasser, in dem die Larven aus der höchsten Al_2O_3 -Nanopartikelkonzentration (gegenüber Al_2O_3 -Nanopartikeln alleine exponiert) ihre Därme entleert hatten, in 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Deutschland) überführt und zentrifugiert (10 min bei 14000 rpm). Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Pellets, in denen sich unter anderem die ausgeschiedenen Al_2O_3 -Nanopartikel befanden, vereint und für Sorptionsmessungen bereitgestellt.

Um eine Lokalisation von Al_2O_3 - und Zeolith-Nanopartikeln in *C. riparius* Larven mittels LA-ICP-MS Visualisierungstechniken realisieren zu können, mussten die Versuchstiere nach erfolgter Exposition

zunächst fixiert werden. Hierfür wurden die Larven nach der Exposition dekapitiert und in 2%igen Glutardialdehyd (Sigma-Aldrich, Deutschland), gepuffert in 0,005 M Cacodylatpuffer (Natriumcacodylat trihydrat, Sigma-Aldrich, Germany, pH 7,4), bei 4 °C für mindestens eine Woche fixiert. Anschließend wurden die Tiere in 5%iger Trichloressigsäure (TCA, 99 % p.a., Carl Roth GmbH, Deutschland) in Formol (37%ige Formaldehydlösung in Methanol stabilisiert, Carl Roth GmbH, Deutschland) entkalkt, in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und routinemäßig in Kunststoff (Technovit 7100®, Heraeus Kulzer GmbH, Deutschland) eingebettet. Anschließend wurden 7 µm dicke Dünnschnitte an einem Rotationsmikrotom (Leica RM2265, Leica Biosystems, Deutschland) angefertigt.

Chemische Analytik

Kooperationspartner der AG Huhn (Eberhard Karls Universität Tübingen) führten die Bestimmungen des Thiaclopridgehaltes in Proben des Testmediums sowie in *C. riparius* Larven (mit und ohne Darminhalt) durch. Für die Aufbereitung der Tierproben wurde eine modifizierte QuEChERS Extraktion angewandt, die ursprünglich in der Lebensmittelchemie Anwendung findet, jedoch für die Analytik in Umweltproben und Biota modifiziert wurde (Anastassiades *et al.*, 2003; Berlioz-Barbier *et al.*, 2014; Inostroza *et al.*, 2016). Anschließend wurden die Thiaclopridkonzentrationen in den Proben mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) ermittelt. Weitere Details sind aus Teil 3, Kapitel 1 und 2 zu entnehmen.

Sorptionsmessungen

Die Sorptionsmessungen (durchgeführt von den Kooperationspartnern der AG Haderlein (Eberhard Karls Universität Tübingen)) wurden für alle Nanopartikel im Grunde gleich durchgeführt, indem eine definierte Menge Nanopartikel (Teil 3, Kapitel 1, Al₂O₃-Nanopartikel: 0,3 g/L in Reinstwasser; Teil 3, Kapitel 2, Y30-Nanopartikel: 0,1 und 0,25 g/L in 1 mM KCl) mit einer definierten Menge Thiacloprid (Teil 3, Kapitel 1: 0,3 und 5,0 µg/L in Reinstwasser ; Teil 3, Kapitel 2: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30 mg/L in 1 mM KCl) inkubiert wurde. Diese Mischung wurde für mehrere Stunden (Teil 3, Kapitel 1: 15 h 20 min; Teil 3, Kapitel 2: 12 h) geschüttelt, um eine Sorption zu gewährleisten. Hierbei wurde für die Ermittlung der Sorptionsisotherme über einen Zeitraum von 48 h immer wieder Proben entnommen, deren Thiaclopridkonzentration im Überstand mittels LC-MS gemessen wurde. Über die Differenz zwischen der initialen Thiaclopridkonzentration und der gemessenen Thiaclopridkonzentration nach Inkubation war es möglich, die sorptiven Eigenschaften der Partikel zu bestimmen (siehe Teil 3, Kapitel 1 und 2 für weitere Informationen).

LA-ICP-MS Visualisierungstechnik

LA-ICP-MS steht für „Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry“, ein Analyseverfahren, in dem Feststoffproben durch einen Laser abgetragen werden und in einem anschließenden Massenspektrometer bezüglich ihrer chemischen Beschaffenheit analysiert werden können. Diese Methode erlaubt somit eine Lokalisation chemischer Elemente in festen Proben, indem

die Profile der abgelösten Stoffe bildlich visualisiert werden. Durch diese Methode konnten die Kooperationspartner der AG Karst (Westfälische Wilhelms-Universität Münster) Al₂O₃- und Zeolith-Nanopartikel in Dünnschnitten von *C. riparius* Larven lokalisieren, indem aus dem Verteilungsprofil von Aluminium im histologischen Schnitt ein Bild generiert wurde (siehe auch Teil 3, Kapitel 1 und 2).

1.3.6. Der Nachweis fluoreszierender SiO₂-Nanopartikel in Chironomidenlarven

Um zu testen, ob die Assoziation zwischen den SiO₂-Nanopartikeln und dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B stabil ist, beziehungsweise um die fluoreszierenden SiO₂-Nanopartikel in *C. riparius* Larven lokalisieren zu können (Teil 3, Kapitel 3), wurden circa 10 Tage alte Larven in belüftete Glasgefäße (Durchmesser: 7 cm, Höhe: 6,5 cm) überführt. In diesen befanden sich darüber hinaus 30 g feiner Quarzsand (Partikelgröße: 0,1-0,3 mm) und, je nach Versuchsgruppe, 100 mL einer SiO₂-Nanopartikeldispersion (50 mg/L), einer Rhodamin-B-Lösung (500 µg/L) oder gefiltertes Leitungswasser. Die Rhodamin-B-Lösung stellte hierbei eine Kontrolle dar, um zu testen, ob sich der Fluoreszenzfarbstoff von den SiO₂-Nanopartikeln ablöst. Das Leitungswasser diente als Negativkontrolle, um eine eventuelle Autofluoreszenz der Larven zu detektieren, welche andernfalls zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen könnte. Nach Beginn der Exposition wurden die Larven, die gegenüber den SiO₂-Nanopartikeln exponiert waren, täglich mit einer Mischung aus TetraMin®-Flockenfutter (Tetra, Deutschland) und fluoreszierenden SiO₂-Nanopartikeln (Verhältnis 4:1) gefüttert, während die Tiere aus den anderen Versuchsgruppen mit TetraMin® ohne Zusätze gefüttert wurden. Die Exposition erstreckte sich über 96 h und erfolgte in einer Klimakammer (Temperatur: 21 °C ± 0,5 °C, Hell-Dunkel-Rhythmus: 16/8 h).

Für die Lokalisation der SiO₂-Nanopartikel wurden die 14 Tage alten Larven auf Objektträgern platziert und durch eine Einbettung in flüssiger und leicht abgekühlter Agarose (1 g Agarose auf 100 mL VE-Wasser) bewegungsunfähig gemacht. Anschließend wurden die Tiere mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCS SP8, Leica Microsystems GmbH, Germany) untersucht. Durch diese Methode ist es möglich, optisch verschiedene Ebenen eines geeigneten Präparates darzustellen, beziehungsweise die Fluoreszenz in einer bestimmten Ebene anzuregen. Hierdurch ist eine dreidimensionale Darstellung des zu untersuchenden Objektes möglich (Murphy, 2001). Um die Floreszenz anzuregen, wurden die Larven mit Licht der Wellenlänge 405 nm bestrahlt und die emittierten Wellenlängen zwischen 550 und 620 nm detektiert. Insgesamt wurden pro Versuchsgruppe drei Tiere analysiert (n = 3), deren Messungen, abgesehen von der Vergrößerung, allesamt unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden.

1.4. Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden beiden Abschnitten werden zuerst die Ergebnisse der einzelnen Studien aus Teil 3 dieser Arbeit zusammengefasst, bevor sie anschließend zur Überprüfung der zuvor formulierten Hypothesen (siehe Abschnitt 1.2.3.) und zur Eingliederung in die vorhandene Literatur herangezogen werden.

1.4.1. Zusammenfassungen der zur Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripte

Kapitel 1 (siehe Teil 3): Lorenz, C.S., Wicht, A.-J., Guluzada, L., Luo, L., Jäger, L., Crone, B., Karst, U., Triebkorn, R., Liang, Y., Anwander, R., Haderlein, S.B., Huhn, C., Köhler, H.-R.: Nano-sized Al₂O₃ reduces acute toxic effects of thiacloprid on the non-biting midge *Chironomus riparius*. PLOS ONE. 2017; 12(5): e0176356.

In Rahmen dieser Studie wurde untersucht, wie sich Al₂O₃-Nanopartikel, welche Thiacloprid nicht binden, auf die Toxizität des neonikotinoiden Insektizids auswirken. Dies wurde in akuten Toxizitätstests ermittelt, in denen darüber hinaus auch die einzelne Toxizität der Al₂O₃-Nanopartikel und des Thiacloprids untersucht wurden. Hierzu wurden *C. riparius* Larven gegenüber Thiacloprid (0,5, 1,0, 2,0 und 5,0 µg/L) und Al₂O₃-Nanopartikeln (300 und 1000 mg/L) einzeln, als auch in allen Kombinationen (*full factorial design*) und einer Kontrolle (gefiltertes Leitungswasser) exponiert (siehe Abschnitt 1.3.4., Tabelle 2). Darüber hinaus wurden chemische Analysen durchgeführt, um die Thiaclopridkonzentrationen im Medium und in den Larven (mit entleerten Därmen) bestimmen zu können. Zusätzlich wurden die Al₂O₃-Nanopartikel durch LA-ICP-MS Analysen und Visualisierungstechniken in den Chironomidenlarven lokalisiert. Eine Übersicht der durchgeführten Arbeiten dieser Studie ist aus Abschnitt 1.2.4., Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Sorptionsmessungen mit sowohl den ursprünglichen als auch den nach Darmpassage ausgeschiedenen Al₂O₃-Nanopartikeln bestätigten die Annahme, dass kein Thiacloprid an die Nanopartikel gebunden wurde. In den akuten Toxizitätstests wurde zudem gezeigt, dass die Al₂O₃-Nanopartikel alleine keine Effekte verursachten. Thiacloprid als singuläre Substanz hingegen führte bei Tieren, die gegenüber Konzentrationen von $\geq 1,0$ µg/L Thiacloprid exponiert wurden, zu zunehmenden Mortalitätsraten und zunehmenden Verhaltensauffälligkeiten. So zeigten beinahe alle Tiere aus den Expositionen gegenüber 2,0 und 5,0 µg/L nach 24 h Verhaltensauffälligkeiten. Nach 72 h wiesen auch alle Larven, die gegenüber 1,0 µg/L Thiacloprid exponiert wurden, Störungen in ihrem Verhalten auf. Die Mortalität der Larven trat bei allen Thiaclopridkonzentrationen $\geq 1,0$ µg/L zwischen 72 h und 96 h auf und unterschied sich nach viertägiger Exposition nicht signifikant voneinander. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Thiacloprid zu einer Dauererregung der Nervenzellen führt und auch frühere Studien mit *C. riparius* Larven und Neonikotinoiden ähnliche Effekte beschrieben (zum Beispiel Langer-Jaesrich *et al.*, 2010; Azevedo-Pereira *et al.*, 2011a; Azevedo-Pereira *et al.*, 2011b). Hingegen wurde in den Mischversuchen ein Effekt

von Nanopartikeln nachgewiesen, der bislang noch nicht in der Fachliteratur beschrieben wurde. Obwohl die Sorptionsmessungen von ursprünglichen und ausgeschiedenen Al_2O_3 -Nanopartikeln sowie die chemische Analytik des Mediums bestätigten, dass kein Thiacloprid durch die Partikel gebunden wurde, konnte eine signifikante Reduktion der Mortalität nach 96 stündiger Exposition in den Mischversuchen mit 1,0 und 2,0 $\mu\text{g/L}$ Thiacloprid und 1000 mg/L Al_2O_3 -Nanopartikeln, beziehungsweise 2,0 $\mu\text{g/L}$ Thiacloprid und 300 mg/L Al_2O_3 -Nanopartikel, nachgewiesen werden. Somit zeigte sich, dass die Al_2O_3 -Nanopartikel – zumindest kurzfristig – einen protektiven Effekt besitzen. Des Weiteren lassen die Daten erkennen, dass dieser Effekt positiv mit der Nanopartikelkonzentration korreliert. Dies wird zudem von einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Mortalitätsraten von Larven aus den beiden Mischungen mit 1,0 $\mu\text{g/L}$ Thiacloprid untermauert. Dennoch blieb eine signifikante Reduktion der Mortalität bei der niedrigsten (0,5 $\mu\text{g/L}$) und höchsten Thiaclopridkonzentration (5,0 $\mu\text{g/L}$) in beiden Mischungen aus. Dies liegt jedoch sehr wahrscheinlich daran, dass eine Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/L}$ Thiacloprid nicht ausreichte, um unter akuter Exposition die Mortalitätsrate zu erhöhen, während der protektive Effekt der Al_2O_3 -Nanopartikel die starke Toxizität des Insektizids bei einer Konzentration von 5,0 $\mu\text{g/L}$ Thiacloprid nicht mehr signifikant reduzieren konnte. Hinzu kommt, dass davon ausgegangen werden kann, dass die Al_2O_3 -Nanopartikel die Mortalität der Tiere wohl nur verzögerten, aber nicht verhinderten. Dies lässt sich aus den beobachteten Verhaltensauffälligkeiten der Tiere schließen. Sie stellen einen sensibleren Endpunkt als Mortalität dar und unterschieden sich nicht zwischen Tieren aus den Mischversuchen und den Tieren, die gegenüber Thiacloprid als Einzelsubstanz exponiert wurden. Generell wurde ein protektiver Effekt von nicht-bindenden Nanopartikeln, wie er in dieser Studie beobachtet wurde, bislang noch nicht in der Literatur beschrieben und stellt somit ein Novum dar. Folglich ist nicht viel über die zugrundeliegenden Mechanismen bekannt. Da jedoch mit bloßem Auge zu erkennen war – und durch die LA-ICP-MS Analysen bestätigt wurde –, dass Al_2O_3 -Nanopartikel in großer Anzahl von den Chironomidenlarven gefressen wurden und sich in Darmlumen ansammelten (wobei es zu keiner zellulären Aufnahme kam), liegt die Vermutung nahe, dass die Al_2O_3 -Nanopartikel eine Art protektive Barriere im Lumen des Darmes bilden. Diese Barriere könnte die Aufnahme von Thiacloprid über die peritrophische Membran und/oder das Darmepithel reduzieren und somit die akute Toxizität des Insektizids vermindern. In diesem Szenario kommt hinzu, dass die Al_2O_3 -Nanopartikel vermutlich auch die generelle Stoffaufnahme reduzieren würden, was eine eingeschränkte Nährstoffassimilation zur Folge haben könnte, welche sich dann wiederum negativ auf die *C. riparius* Larven auswirken kann. Allerdings ergab die chemische Analyse der Tiere, dass die internen Thiaclopridkonzentrationen zwischen den Larven der verschiedenen Treatments nicht signifikant voneinander abwichen, was gegen eine reduzierte Thiaclopridaufnahme spricht. Errechnete Regressionskurven, die auf Basis geringster Abweichungsquadrate der Messwerte ermittelt wurden, geben jedoch einen Hinweis darauf, dass die Thiaclopridaufnahme in den Mischungen tatsächlich niedriger sein könnte als in Tieren, die gegenüber Thiacloprid als Einzelsubstanz exponiert waren. Aufgrund der fehlenden Signifikanz zwischen den

internen Thiaclopridkonzentrationen der Larven aus den einzelnen Treatments ist diese Aussage jedoch ohne statistische Unterstützung. Eine weitere Erklärung für den nachgewiesenen Effekt wäre, dass die Al₂O₃-Nanopartikel die physikochemischen Gegebenheiten des Darmtraktes beeinflussen, was Einfluss auf die Toxizität und/oder Aufnahme von Thiacloprid haben könnte. Somit kann über den Mechanismus und dessen weitere Folgen bislang nur spekuliert werden und weitere Forschung hierzu ist dringend notwendig.

Kapitel 2 (siehe Teil 3): Lorenz, C.S., Wicht, A.-J., Guluzada, L., Crone, B., Lee, H.J., Karst, U., Triebkorn, R., Haderlein, S.B., Huhn, C., Köhler, H.-R.: Nano-sized zeolites as modulators of thiacloprid toxicity on *Chironomus riparius*. PeerJ. 2017; 5: e3525.

In diesem Kapitel wurde anhand eines akuten Toxizitätstests untersucht, wie sich die Sorption von Thiacloprid an Zeolith-Nanopartikel auf die Toxizität des Insektizids auswirkt. Eine Übersicht über die durchgeführten Arbeiten dieser Studie ist aus Abschnitt 1.2.4., Tabelle 1 zu entnehmen. Darüber hinaus wurde in dieser Studie getestet, ob die primäre Partikelgröße der Zeolithe einen Effekt auf die akute Toxizität hat. Folglich wurden zwei verschiedene Zeolith-Nanopartikel, Y30 und H-Beta(OH)-III, getestet. Hierbei wurden die jeweiligen Effekte von Thiacloprid und den beiden Zeolith-Nanopartikeln sowie die Toxizität von Mischungen aus Thiacloprid und den Zeolith-Nanopartikeln untersucht. Die Konzentrationen von Thiacloprid lagen konstant bei 1,0 µg/L, wohingegen die Nanopartikelkonzentrationen variierten, um verschiedene Sorptionsraten von Thiacloprid in den Mischversuchen zu erlangen. Die verwendeten Nanopartikelkonzentrationen basierten auf den sorptiven Eigenschaften der Y30-Nanopartikel und wurden so gewählt, dass Y30 in der niedrigsten Konzentration (5,19 mg/L) 30 %, in der mittleren Konzentration (18,17 mg/L) 60 % und der höchsten Konzentration (391,74 mg/L) 97 % des zugegebenen Thiacloprids band. Die H-Beta(OH)-III-Nanopartikel wurden in denselben Konzentrationen (± 5 %) getestet (siehe Abschnitt 1.3.4., Tabelle 2), ohne dass zuvor Sorptionsmessungen durchgeführt wurden.

Nach 96 stündiger Exposition zeigte sich, dass keiner der beiden Zeolith-Nanopartikel alleine Effekte verursachte. Ein Einfluss der Partikelgröße konnte in diesem Zusammenhang somit nicht nachgewiesen werden, wobei zu erwähnen ist, dass die 50 nm großen Primärpartikel der H-Beta(OH)-III-Nanopartikel mehrere Mikrometer große Agglomerate oder Aggregate bildeten. Folglich wurden in dieser Studie sowohl für Y30- als auch für H-Beta(OH)-III-Zeolithe recht große Partikelgrößen getestet, die bei Zeolithen generell als eher nicht-toxisch gelten (Lehman und Larsen, 2014). Bezüglich der Toxizität von Thiacloprid als Einzelsubstanz konnte in dieser Studie, wie schon in Teil 3, Kapitel 1 der hier vorliegenden Arbeit, erneut demonstriert werden, dass dieses Insektizid im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikant erhöhten Mortalität und einer Beeinträchtigung des Verhaltens der Tiere führt. In den Versuchen zur Ermittlung der Mischtoxizität wurde gezeigt, dass Y30-Nanopartikel mit zunehmenden Konzentrationen und folglich mit zunehmender Sorption von Thiacloprid zu einer Reduktion negativer

Effekte auf *C. riparius* Larven führten. So wiesen Tiere, die gegenüber der höchsten Konzentration an Y30-Nanopartikeln exponiert wurden, eine ähnliche Mortalitätsrate wie die Kontrolltiere auf. Auch das Auftreten von Verhaltensauffälligkeiten wurde mit zunehmender Y30-Nanopartikelkonzentration zeitlich verzögert oder blieb bei der höchsten Konzentration an Y30-Nanopartikeln vollständig aus. Die Exposition gegenüber H-Beta(OH)-III-Nanopartikeln führte sogar in allen Mischversuchen zu einer kompletten Aufhebung der durch Thiacloprid verursachten toxischen Effekte. Die Ergebnisse der akuten Toxizitätstests stimmen somit gut mit der chemischen Analytik des Mediums überein. Mittels dieser konnte eine Zunahme der Sorption von Thiacloprid mit zunehmender Konzentration an Y30-Nanopartikeln im errechneten Maße (circa 30, 60 und 97 % Sorption von Thiacloprid) nachgewiesen werden, wohingegen Thiacloprid in keiner H-Beta(OH)-III-Mischung analytisch detektiert werden konnte. Dies spricht für eine sehr hohe Sorptionsrate von bis zu (nahezu) 100 % von Thiacloprid an H-Beta(OH)-III-Nanopartikel. Darüber hinaus zeigten die LA-ICP-MS Analysen, dass beide Zeolith-Nanopartikel in den Därmen der Tiere akkumulierten, es jedoch zu keiner zellulären Aufnahme kam. Folglich konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass beide Zeolithe in den hier getesteten Größen nicht als Vehikel für Thiacloprid fungieren, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit die Bioverfügbarkeit des Insektizids durch Sorption reduzieren und somit dessen Toxizität verringern. Allerdings war die Mortalitätsrate von Tieren aus den Mischversuchen mit Y30-Nanopartikeln höher als die von Tieren, die gegenüber vergleichbaren Thiaclopridkonzentrationen als Einzelsubstanz (Teil 3, Kapitel 1) exponiert wurden. Dies lässt vermuten, dass sich gebundenes Thiacloprid von den Nanopartikeln lösen könnte und dem Organismus wieder zur Verfügung stand. Es ist davon auszugehen, dass dies im geringen Maße stattfand, da höheren Mortalitäten nur bei den Tieren auftraten, die gegenüber Mischungen mit niedrigen Sorptionsraten exponiert wurden. Hier führte das während der Darmpassage desorbierte Thiacloprid wohl zu einer Verstärkung der Effekte. Bei Tieren, die gegenüber Mischungen mit hohen Sorptionsraten exponiert wurden, konnten keine Effekte nachgewiesen werden.

Kapitel 3 (siehe Teil 3): Lorenz, C.S.: Examination of Fluorescent Silica Nanoparticles and their Tracking within Larvae of *Chironomus riparius*. Unpublished manuscript. 2017.

Ziel dieser Studie war es, zu testen, ob synthetische SiO₂-Nanopartikel, die durch eine Assoziation mit Rhodamin B fluoreszieren, geeignet sind, um mittels Konfokalmikroskopie in Organismen detektiert zu werden, oder ob sie aufgrund einer Ablösung des Rhodamin B als untauglich betrachtet werden müssen. Um diese Frage anzugehen, wurden *C. riparius* Larven gegenüber den SiO₂-Nanopartikeln, Rhodamin B als Einzelsubstanz oder gegenüber einer Kontrolle (gefiltertes Leitungswasser) exponiert (siehe Abschnitt 1.3.6.), und die für die jeweiligen Larven erstellten Fluoreszenzbilder miteinander verglichen (siehe 1.2.4., Tabelle 1 für eine Übersicht der angewandten Methoden dieser Studie). Für den Fall, dass sich die fluoreszierenden SiO₂-Nanopartikel als geeignete Objekte erweisen würden, könnte

außerdem ermittelt werden, ob es zu einer zellulären Aufnahme der SiO₂-Nanopartikel kam, beziehungsweise wo die Partikel in den *C. riparius* Larven verblieben.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Cuticula der Larven aus der Kontrollgruppe eine Autofluoreszenz aufwies, welche besonders an der stark cuticularisierten Kopfkapsel der Tiere zu erkennen ist. Dies stimmt mit diversen Beobachtungen anderer Autoren überein, welche Autofluoreszenz bei vielen Arthropoden nachweisen konnten (zum Beispiel Thimm und Tebbe, 2003; Klaus und Schawaroch, 2006; Koga *et al.*, 2009). Tiere, die gegenüber Rhodamin B als Einzelsubstanz exponiert wurden, zeigten, bedingt durch die gute Mobilität des Farbstoffes in biologischen Geweben, starke Fluoreszenz im gesamten Körper. Diese Fluoreszenzverteilung wurde bei *C. riparius* Larven, die gegenüber SiO₂-Nanopartikeln exponiert waren, nicht vorgefunden. Diese zeigten hingegen, abgesehen von der Autofluoreszenz, starke Fluoreszenz im Lumen ihres Verdauungsapparates. Daraus lässt sich schließen, dass sich der Farbstoff Rhodamin B nicht von den SiO₂-Nanopartikeln abgelöst hatte. Dadurch eignen sich die SiO₂-Nanopartikel gut, um in *C. riparius* Larven mittels Konfokalmikroskopie nachgewiesen zu werden. Die Konfokalmessungen deuten auf eine ausschließliche Akkumulation der fluoreszierenden SiO₂-Nanopartikeln im Lumen des Darmtraktes der Tiere hin. Hinweise auf eine zelluläre Aufnahme der SiO₂-Nanopartikel liegen nicht vor. Da aber durch die beschränkte Auflösung des Konfokalmikroskopes nur eine Ansammlung von Nanopartikeln dargestellt werden kann, kann eine zelluläre Aufnahme von einzelnen SiO₂-Nanopartikeln nicht mit völliger Gewissheit ausgeschlossen werden.

1.4.2. Überprüfung der Hypothesen

Die hier vorliegende Arbeit soll zum generellen Verständnis der Rolle von Nanopartikeln in der Umwelt und deren Interaktionen mit Xenobiotika beitragen. Im Rahmen derer wurden zu Beginn der Arbeit in Abschnitt 1.2.3. vier Hypothesen (H1-H3: Nebenhypothesen, H4: Haupthypothese) aufgestellt, die im Folgenden umfassend geprüft werden.

Hypothese 1: *Die verwendeten Nanopartikel alleine haben einen akut toxischen Effekt auf die Larven der Zuckmücke Chironomus riparius*

Bezüglich der ersten Hypothese zeigen die Ergebnisse der Arbeit (Teil 3, Kapitel 1 und 2), dass bei dem verwendeten Versuchsaufbau und den verwendeten, teils hohen und nicht umweltrelevanten, Konzentrationen sowohl Al₂O₃- als auch beide Zeolith-Nanopartikel keine negativen Effekte auf die Mortalität und das Verhalten der L4 Larven von *C. riparius* hatten. Somit wird diese Hypothese verworfen. In einer Studie von Stanley *et al.* (2010) wird ebenfalls berichtet, dass Al₂O₃-Nanopartikel keine Effekte auf drei aquatische Invertebraten (*Tubifex tubifex*, *Lumbriculus variegatus* und *Corbicula fluminea*) hatten. Hingegen wurde in selbiger Studie gezeigt, dass Al₂O₃-Nanopartikel geringfügig toxisch auf *Hyalella azteca* wirkten. In der Literatur sind weitere Beispiele für toxische Effekte von Al₂O₃-Nanopartikeln zu finden. So beeinflusste beispielsweise eine Exposition von *Chironomus tentans*

(Larvenstadium: L2-L3) gegenüber α -Al₂O₃- und γ -Al₂O₃-Nanopartikel subletale Endpunkte und die Überlebensrate der Tiere negativ (Oberholster *et al.*, 2011). In einer anderen Studie zeigten Li *et al.* (2011) eine Verschlechterung der Wachstumsrate und des Energiehaushaltes von *Ceriodaphnia dubia* durch γ -Al₂O₃-Nanopartikel. Von Zhu *et al.* (2009) wurde gezeigt, dass Al₂O₃-Nanopartikel in Konzentrationen ähnlich denen, die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden, die Immobilisierungsrate und die Mortalität von *Daphnia magna* nach 48 stündiger Exposition negativ beeinflussten. Allerdings stellte sich auch in dieser Studie heraus, dass Al₂O₃-Nanopartikel, im Vergleich zu anderen Nanopartikeln (zum Beispiel ZnO-Nanopartikel oder C₆₀-Nanopartikel), nicht oder nur sehr gering toxisch wirken. Anders als über die Effekte von Al₂O₃-Nanopartikeln, ist über die toxischen Effekte von Zeolith-Nanopartikeln aus der Literatur wenig bekannt, da hierüber kaum Studien durchgeführt wurden (Lehman und Larsen, 2014). Größere Zeolith-Partikel gelten allerdings im Allgemeinen als nicht-toxisch (Lehman und Larsen, 2014). Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit gestützt, in der zumindest im Falle von H-Beta(OH)-III-Nanopartikeln recht große Aggregate oder Agglomerate getestet wurden. An dieser Stelle muss jedoch erneut betont werden, dass Vergleiche zwischen verschiedenen Nanopartikelstudien mit Vorsicht vorgenommen werden müssen. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich erläutert (siehe Abschnitt 1.2.1.), können Nanopartikel trotz gleicher chemischer Komposition sehr unterschiedliche Eigenschaften haben, die darüber hinaus durch das Testverfahren beeinflusst werden können. All diese Veränderungen können sich wiederum auf die Toxizität der Nanopartikel auswirken. So waren beispielsweise die Al₂O₃-Nanopartikel aus den Studien von Zhu *et al.* (2009), Oberholster *et al.* (2011) und Li *et al.* (2011) mit im Schnitt 80 nm, 100 nm und 200 nm deutlich kleiner als die Al₂O₃-Nanopartikel, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (410 nm). Des Weiteren unterschieden sich auch die Expositionsbedingungen und die Testorganismen der genannten Studien zu den Methoden der hier vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus untersuchten Stanley *et al.* (2010) Unterschiede zwischen nano- und mikropartikulärem Al₂O₃ auf *H. azteca* und fanden heraus, dass größere Al₂O₃-Partikel im Vergleich zu kleineren Partikeln eine geringere Toxizität aufweisen. Die Annahme, dass toxische Effekte in der vorliegenden Arbeit möglicherweise aufgrund der vergleichsweise großen Partikelgröße ausblieben, wird durch die Ergebnisse aus der Studie von Stanley *et al.* (2010) untermauert. Abschließend ist zu erwähnen, dass akute Toxizitätstests alleine nicht ausreichen, um die Toxizität eines Stoffes ausführlich zu ermitteln. Daher sollten in Zukunft chronische Toxizitätstests mit den verwendeten Nanopartikeln durchgeführt werden, um deren Effekte besser erfassen und verstehen zu können.

Hypothese 2: *Es kommt zu einer zellulären Aufnahme der verwendeten Nanopartikel in Larven der Zuckmücke Chironomus riparius*

Um die Effekte von Nanopartikeln auf Biota besser zu verstehen, kann es hilfreich sein, den Verbleib der Nanopartikel in den Versuchsorganismen zu detektieren. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt (Teil 3, Kapitel 1, 2 und 3) und ist Gegenstand der zweiten Hypothese, anhand derer

verifiziert werden sollte, ob es zu einer zellulären Aufnahme aller verwendeten Nanopartikel kam. Als Analysemethoden hierfür wurden LA-ICP-MS Analysen (für Al₂O₃-, Y30- und H-Beta(OH)-III-Nanopartikel, Teil 3 Kapitel 1 und 2) und Konfokalmikroskopie (für SiO₂-Nanopartikel, Teil 3, Kapitel 3) angewendet. Die Studien lieferten für keinen der verwendeten Nanopartikel ein Indiz zur zellulären Aufnahme, weswegen diese Hypothese ebenfalls verworfen wird. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass beide Methoden eine zu geringe Auflösung besitzen, um einzelne Nanopartikel in Zellen zu detektieren (zum Beispiel Schultz *et al.*, 2015). Somit kann lediglich mit Sicherheit festgestellt werden, dass die Nanopartikel nicht in größeren Mengen in Zellen eindringen. Eine Aufnahme einzelner Partikel kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Messungen mittels LA-ICP-MS und Konfokalmikroskopie zeigten jedoch unzweifelhaft, dass die verschiedenen Nanopartikel von den *C. riparius* Larven gefressen wurden. Da sich die Larven von Detritus ernähren (Armitage *et al.*, 1995) und es während der 96-stündigen Exposition zu einer Sedimentation der Nanopartikel kam, lag dies nahe. Die gefressenen Nanopartikel sammelten sich darüber hinaus im Darmlumen der Tiere an, wie es bereits in anderen Studien für unterschiedliche Nanopartikel und Organismen beobachtet werden konnte (zum Beispiel Baun *et al.*, 2008b; Petersen *et al.*, 2009; Mohan *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). So konnten beispielsweise Zhu *et al.* (2009) in einer Studie zeigen, dass verschiedene Nanopartikel (darunter auch Al₂O₃-Nanopartikel) im Darmlumen von *Daphnia magna* akkumulierten. Über die Effekte dieser Nanopartikelaggregationen ist bislang allerdings wenig bekannt. Aus einigen Studien geht lediglich hervor, dass die exponierten Tiere Schwierigkeiten bei der Ausscheidung der Nanopartikel zeigten (zum Beispiel Petersen *et al.*, 2009; Mohan *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). Zhu *et al.* (2010) berichten darüber hinaus, dass die Ansammlung von TiO₂-Nanopartikeln im Darmlumen von *D. magna* in Kombination mit Problemen bei deren Ausscheidung zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme führen kann – was wiederum das Wachstum, die Vermehrung und die Überlebensrate der Tiere negativ beeinflussen könnte. Zudem ist es denkbar, dass die aggregierten Nanopartikel im Verdauungsapparat die Assimilation von (Nähr-)Stoffen über das Darmepithel vermindern, was beispielsweise zu Mangelerscheinungen führen könnte. Unter anderem deshalb ist es möglich, dass die beobachteten Ansammlungen der Nanopartikel im Darmlumen von *C. riparius* Larven langfristig doch zu negativen Effekten führen könnten. Solche Effekte hätten aber unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht ermittelt werden können, da die Tiere während ihrer akuten Exposition aus oben genannten Gründen nicht gefüttert wurden. Daher sollten, wie zuvor bereits erwähnt, chronische Toxizitätstests durchgeführt werden, bei denen ebenfalls der Verbleib der Nanopartikel untersucht wird.

Hypothese 3: Das Neonikotinoid Thiacloprid hat als Einzelsubstanz akut toxische Effekte auf Larven der Zuckmücke *Chironomus riparius*

Prinzipiell stellen Neonikotinoide sehr potente Insektizide dar, die bereits in geringen Konzentrationen toxisch auf Insekten wirken. So ist beispielsweise dem Review von Morrissey *et al.* (2015) zu entnehmen, dass akute und chronische Effekte bei verschiedenen aquatischen Invertebraten, speziell innerhalb der Arthropoden, bereits bei Konzentrationen von unter 1,0 µg/L, beziehungsweise ab

0,1 µg/L auftreten können. Hierbei (sowie in anderen Studien) zeigte sich, dass Chironomiden mit einem LC₅₀ Wert von beispielsweise 1,57 µg/L bei chronischer Exposition (17 Tage) (Langer-Jaesrich *et al.*, 2010) sehr sensitive Organismen sind (Morrissey *et al.*, 2015), was unter anderem ein Grund für ihre Verwendung in der hier vorliegenden Arbeit war. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine hohe Sensitivität von *C. riparius* gegenüber Thiacloprid festgestellt. Zwar zeigten Tiere, die gegenüber 0,5 µg/L Thiacloprid exponiert wurden, weder Veränderungen in ihrem Verhalten noch in ihrer Mortalitätsrate, jedoch konnten Veränderungen dieser Parameter bei allen anderen Thiaclopridkonzentrationen beobachtet werden (Teil 3, Kapitel 1 und 2). Somit zeigen die Ergebnisse, dass *C. riparius* Larven bereits bei kurzzeitiger Exposition und bei niedrigen Thiaclopridkonzentrationen ($\geq 1,0$ µg/L) negativ durch Thiacloprid beeinflusst werden können, weswegen die dritte Hypothese als zutreffend angenommen wird. Die vergleichsweise hohe Toxizität von Thiacloprid in dieser Studie lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass sich die Expositionsbedingungen zu anderen Studien unterscheiden und in den hier durchgeführten Versuchen beispielsweise keine Fütterung der Larven stattfand. Daher ist es möglich, dass der durch Nahrungsmangel verursachte Stress die Effekte von Thiacloprid verstärkte. Interessant an den Ergebnissen der hier durchgeführten Studien ist außerdem, dass die internen Thiaclopridkonzentrationen immer und in allen Tieren circa 50 ng/g (Feuchtgewicht) Thiacloprid betrug. Somit konnten keine Unterschiede durch die verschiedenen Thiaclopridkonzentrationen im Testmedium festgestellt werden. Ähnliche interne Konzentrationen wurden von Kiljanek *et al.* (2016) in toten Bienen nachgewiesen, die im Mittel 73,1 ng/g und im Median 42,1 mg/g Thiacloprid betrug. Jedoch liegen die meisten Werte, die für interne Thiaclopridkonzentration in der Literatur zu finden sind, weit unter den eben genannten. Beispielsweise wurde in einer anderen, groß angelegten Studie von Kiljanek *et al.* (2017), bei der freilebende Bienen aus ganz Polen untersucht wurden, im Mittel 3,3 ng/g und im Median 2,2 ng/g Thiacloprid in lebenden Individuen nachgewiesen. Somit gehörte Thiacloprid dennoch zu einem der drei häufigsten Insektizide, die in diesen Tieren nachgewiesen wurden. Beim Vergleich der verschiedenen Studien aus der Literatur ist jedoch zu berücksichtigen, dass die hohen Insektizidkonzentrationen in toten Bienen womöglich eine der Ursachen für deren Ableben war und dass niedrigere interne Konzentrationen, welche in lebenden Tieren aus dem Freiland gemessen wurden, durch verschiedene Faktoren bedingt sein können. So wurden diese Bienen wahrscheinlich gegenüber subletalen Thiaclopridkonzentrationen exponiert und erfuhren, anders als die Chironomiden in dieser Arbeit, nur während der Spritzung höhere Insektizidbelastungen (Stoßbelastungen). Zudem gilt Thiacloprid als nicht bioakkumulativ, was ebenfalls gegen hohe interne Konzentrationen von lebendigen Tieren aus Umweltproben spricht. Dennoch, wie in der Einleitung bereits erläutert, ist eine chronische Exposition gegenüber subletalen Konzentrationen ebenfalls von großer Relevanz für Populationen, was die vielen Studien über Bienen belegen (zum Beispiel Blacquièrre *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2014; Ellis *et al.*, 2017). Hinzu kommt, dass verschiedene Insektizide, darunter auch diverse Neonikotinoide, simultan in der Umwelt vorkommen. Dies kann die Effekte auf Biota stark beeinflussen, da

beispielsweise bei einer Kombination von Neonikotinoiden, bedingt durch die gleiche Wirkweise dieser Substanzen, von einer additiven Wirkweise ausgegangen werden kann (Morrissey *et al.*, 2015). Zwar war es nicht Ziel der vorliegenden Arbeit, eine umfassende Analyse der Toxizität von Thiacloprid durchzuführen, aber die Ergebnisse dieser Studie zeigen dennoch, dass akute Effekte durch zusätzliche Stressoren wie Nahrungsentzug bereits bei geringen und als umweltrelevant zu betrachtenden Thiaclopridkonzentrationen auftreten können. Daher wäre es wünschenswert und für eine umfassende Risikobewertung unabdingbar, wenn die Effekte von Thiacloprid in Kombination mit anderen Stressoren in weiteren Studien untersucht werden würden. Hierdurch könnten Umweltbedingungen im Labor besser simuliert werden, um somit die Effekte von Thiacloprid im Freiland besser abwägen zu können.

Nach dem Überprüfen der drei Nebenhypothesen (H1-H3), die sich auf die Effekte der einzelnen Stoffe bezogen, soll nun erläutert werden, ob sich die Haupthypothese (H4), welche sich auf die Effekte der Mischungen bezieht, bestätigt oder zu verwerfen ist.

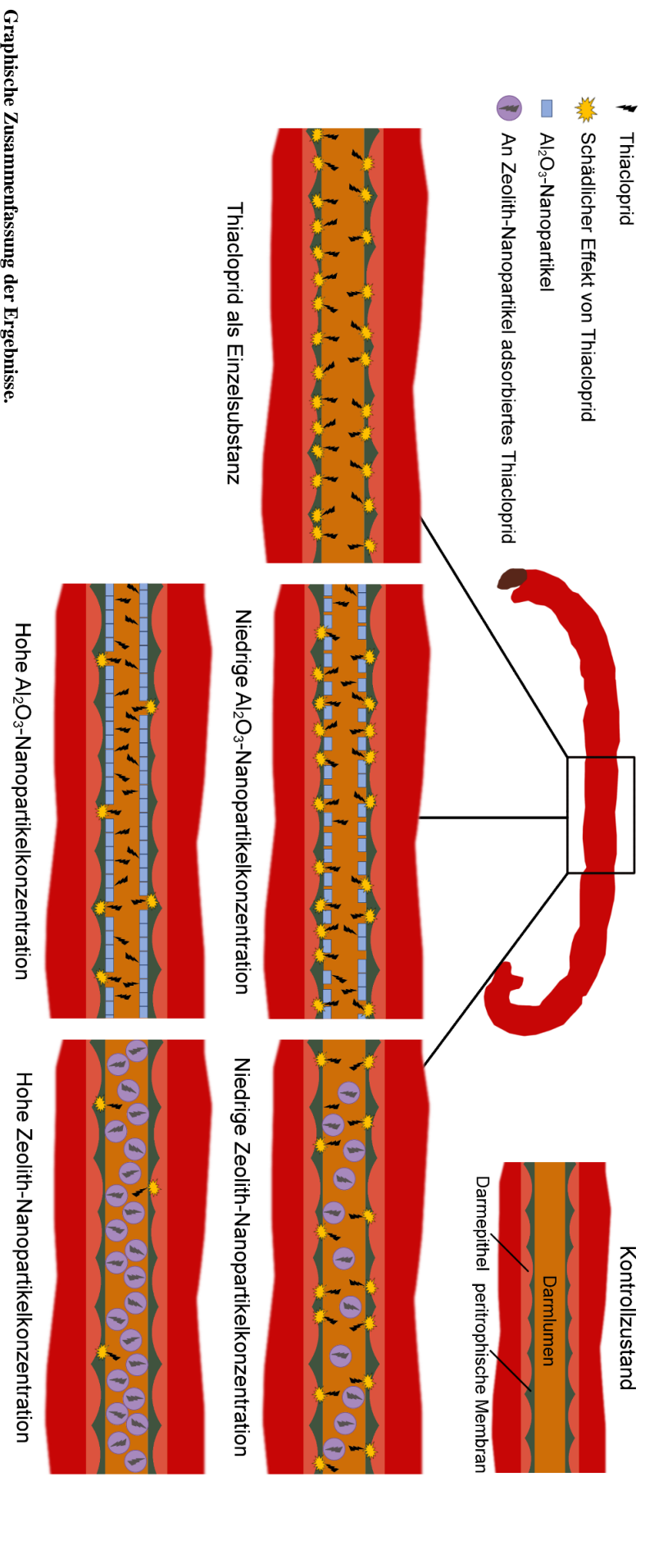
Hypothese 4: *Bindende und nicht-bindende Nanopartikel modifizieren die akute Toxizität des neonikotinoiden Insektizids Thiacloprid auf Larven der Zuckmücke Chironomus riparius*

Die Ergebnisse der akuten Toxizitätstests mit Thiacloprid, Al₂O₃-Nanopartikeln und Zeolith-Nanopartikeln ergaben allesamt eine Reduktion der toxischen Effekte von Thiacloprid in den Mischversuchen, weshalb die Haupthypothese anzunehmen ist (Teil 3, Kapitel 1 und 2). Die beobachtete Reduktion war darüber hinaus positiv mit den Nanopartikelkonzentrationen korreliert. Allerdings deuten die Ergebnisse der Versuche mit Al₂O₃-Nanopartikel darauf hin, dass die letalen Folgen von Thiacloprid durch Al₂O₃-Nanopartikel lediglich verzögert und nicht verhindert wurden, da die exponierten Larven starke Verhaltensänderungen aufwiesen. Hingegen zeigten die Larven, die gegenüber Mischungen mit Zeolith-Nanopartikeln exponiert waren, im Einklang mit den abnehmenden Mortalitätsraten auch weniger Verhaltensauffälligkeiten. Daher ist davon auszugehen, dass die toxischen Effekte von Thiacloprid nicht nur verzögert, sondern durch die Zeolith-Nanopartikel (abhängig von der Konzentration) sogar aufgehoben wurden. Hinzu kommt, dass sich die Mechanismen hinter den protektiven Effekten der verschiedenen Nanopartikel aufgrund ihrer sorptiven Eigenschaften vermutlich unterscheiden (ein Überblick über die möglichen Mechanismen ist aus der graphischen Zusammenfassung der Ergebnisse auf Seite 32 zu entnehmen). Im Falle der Al₂O₃-Nanopartikel kann ausgeschlossen werden, dass die Nanopartikel durch Sorption des Insektizids dessen Bioverfügbarkeit herabgesetzt haben, da sowohl die Sorptionsmessungen von ursprünglichen und ausgeschiedenen Al₂O₃-Nanopartikeln als auch die chemische Analytik des Testmediums keine Rückschlüsse auf eine mögliche Sorption zulassen. Stattdessen wird vermutet, dass die Ansammlung der Al₂O₃-Nanopartikel im Lumen des Intestinaltraktes der *C. riparius* Larven die Aufnahme von Thiacloprid über die peritrophische Membran und das Darmepithel einschränkten, indem sie wie eine Art „Schutzwall“ fungierten. Diese Barriere könnte durch höhere Nanopartikelkonzentrationen dicker und/oder dichter

werden, was erklären würde, warum der protektive Effekt mit steigender Konzentration an Al_2O_3 -Nanopartikeln zunimmt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Al_2O_3 -Nanopartikel die physikochemischen Bedingungen im Intestinaltrakt (wie zum Beispiel den pH-Wert) verändern, was möglicherweise ebenfalls die Aufnahme beziehungsweise die Toxizität von Thiacloprid beeinflusst. Allerdings wird die Annahme einer reduzierten Thiaclopridaufnahme statistisch nicht unterstützt, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den internen Thiaclopridkonzentrationen von Tieren aus den einzelnen Versuchsgruppen vorliegen. Berechnet man auf der Basis der Datenpunkte jedoch eine Regressionskurve, zeigt sich, dass die Kurven für Larven aus den Mischungen unterhalb derjenigen liegen, die für Larven, die gegenüber Thiacloprid als Einzelsubstanz exponiert waren, berechnet wurde. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass es unter Umständen (zum Beispiel indem man die Stichprobenzahl der Proben der chemischen Analytik erhöht) tatsächlich zu einer reduzierten Aufnahme des Insektizids durch die Al_2O_3 -Nanopartikel kommen könnte. Letztlich kann auf der Basis der vorliegenden Arbeiten über den Mechanismus, der dazu führt, dass nicht-bindende Al_2O_3 -Nanopartikel in Mischungen mit Thiacloprid die Thiacloprid-bedingten Mortalitätsraten von *C. riparius* Larven senken, nur spekuliert werden. Gezielte Versuche, die Effekte von Nanopartikeln in Kombination mit nicht-bindenden Chemikalien zu untersuchen, waren bislang nicht Gegenstand der Forschung, weshalb aus der Literatur kaum vergleichbare Studien zu finden sind. Lediglich eine Studie von Baun *et al.* (2008b) kommt dem hier durchgeführten Versuch mit Al_2O_3 -Nanopartikeln nahe. In dieser Studie wurden die Effekte von unterschiedlichen Xenobiotika in Kombination mit C_{60} -Nanopartikeln auf Algen und *D. magna* untersucht. Hierbei zeigten Sorptionsmessungen, dass die Pflanzenschutzmittel Atrazin und Methyl-Parathion von den C_{60} -Nanopartikeln nicht gebunden wurden. In den anschließenden Mischtoxizitätstests wurde von den Autoren dann gezeigt, dass die C_{60} -Nanopartikel keinerlei Einfluss auf die Toxizität der beiden Pflanzenschutzmittel auf Algen hatten. Bei dem Mischversuch aus C_{60} -Nanopartikeln und Methyl-Parathion (eine Mischung aus C_{60} -Nanopartikeln und Atrazin wurde nicht getestet) zeigte sich ebenfalls kein Effekt der C_{60} -Nanopartikel auf die Immobilisationsrate von *D. magna*, obwohl ebenfalls eine Ansammlung der C_{60} -Nanopartikel im Lumen des Intestinaltraktes der Tiere vorzufinden war. Insofern unterscheiden sich die Ergebnisse von Baun *et al.* (2008b) von den hier vorliegenden Resultaten. Jedoch ist zu erwähnen, dass die Testkonzentration der C_{60} -Nanopartikel-Suspension mit 5-8 mg/L bei Baun *et al.* (2008b) um ein Vielfaches niedriger ist als die Al_2O_3 -Nanopartikel-Konzentrationen der vorliegenden Arbeit. Da aber gezeigt werden konnte, dass der positive Effekt mit zunehmender Al_2O_3 -Nanopartikel-Konzentration zunimmt, liegt nahe, dass die Konzentrationen der C_{60} -Nanopartikel in der Studie von Baun *et al.* (2008b) vermutlich zu niedrig waren, um ähnliche Effekte wie diejenigen in der vorliegenden Arbeit zu verursachen.

Der protektive Effekt, der von Zeolith-Nanopartikeln ausgeht, lässt sich – anders als bei den Al_2O_3 -Nanopartikeln – auf deren sorptive Eigenschaften zurückführen. Die Ergebnisse der Sorptionsmessungen und der chemischen Analytik des Mediums bestätigen, dass Thiacloprid von den Zeolith-Nanopartikeln gebunden wurde. Zudem zeigt die chemische Analytik, dass die Sorptionsrate an

den H-Beta(OH)-III-Nanopartikeln deutlich höher als für Y30-Nanopartikel war. Dies könnte gegebenenfalls auf die größere Oberfläche der kleineren Primärpartikeln von H-Beta(OH)-III zurückgeführt werden. Das setzt jedoch voraus, dass die gebildeten Ansammlungen der Primärpartikel Agglomerationen darstellen, da bei einem solchen Zusammenschluss, im Gegensatz zur Aggregation, die Oberfläche ähnlich groß wie die der einzelnen Partikel sein kann (Savolainen *et al.*, 2010). Es ist davon auszugehen, dass durch die Sorption des Thiacloprids an die Zeolith-Nanopartikel die Bioverfügbarkeit des Insektizids reduziert wurde. Somit kann man auch anhand der Thiaclopridkonzentrationen in der Wasserphase gut Rückschlüsse auf die Effekte in den *C. riparius* Larven ziehen. Im Falle der vorliegenden Arbeit muss jedoch erwähnt werden, dass die Mortalitätsraten der Tiere, die gegenüber Mischungen mit niedrigen und mittleren Konzentrationen an Y30-Nanopartikeln exponiert waren, höher waren als die Mortalitätsraten der Tiere aus den Expositionen, die gegenüber Thiacloprid als Einzelsubstanz (Teil 3, Kapitel 1) in vergleichbaren Konzentrationen (bezogen auf die freie, nicht gebundene Thiaclopridkonzentration im Medium) exponiert wurden. Das deutet darauf hin, dass einige Thiacloprid-Moleküle zu einem geringen Anteil von den ingestierten Zeolith-Nanopartikeln desorbierten und somit für die Tiere verfügbar waren. Hinzu kommt, dass in den akuten Toxizitätstests mit Zeolith-Nanopartikeln ähnliche Nanopartikelkonzentrationen wie für Al₂O₃-Nanopartikel getestet wurden und es ebenfalls zu einer Akkumulation der Zeolith-Nanopartikel im Darmlumen der Larven kam. Daher ist es möglich, dass der unbekannte Mechanismus, welcher für die protektive Wirkung der Al₂O₃-Nanopartikel verantwortlich ist, auch in der Studie mit den Zeolith-Nanopartikeln zu tragen kam und auf unbekannte Weise die Ergebnisse des akuten Toxizitätstests beeinflusst haben könnte. Insgesamt lassen sich jedoch die Ergebnisse aus den akuten Toxizitätstests mit Zeolith-Nanopartikeln gut in die Literatur eingliedern. Beispiele für eine reduzierte Toxizität aufgrund verminderter Bioverfügbarkeit von Stoffen wurden bereits in der Einleitung dieser Arbeit gegeben und stammen unter anderem von Baun *et al.* (2008b), Knauer *et al.* (2007) oder Koelmans *et al.* (2006). Für Zeolithe konnte ein solcher Effekt auf Biota von James und Sampath (1999) nachgewiesen werden. Diese zeigten, dass Cadmiumkonzentrationen in Wasser und Fischen (*Oreochromis mossambicus*) durch Zeolithe verringert wurden, wodurch auch die durch Cadmium verursachten toxischen Effekte auf die Fische reduziert wurden. Dies wirkte sich wiederum positiv auf das Wachstum der Tiere aus. Jedoch ist die Größe der in dieser Studie verwendeten Zeolithe nicht bekannt, weswegen keine direkten Vergleiche zwischen der vorliegenden Arbeit und der Literatur gezogen werden können.



Dargestellt ist eine schematische Darstellung einer *Chironomus riparius* Larve des vierten Larvenstadiums sowie eine schematische Darstellung ihres Intestinaltraktes. Die Abbildung gibt einen Überblick über die Interaktionen zwischen Thiachloprid mit nicht-sorbierenden (Al_2O_3) und sorbierenden (Zeolithe) Nanopartikeln. Der **linke Ausschnitt** zeigt die Wirkung von Thiachloprid als Einzelsubstanz, welches starke schadhafte Effekte in den Tieren hervorruft. Die **Ausschnitte in der Mitte** zeigen die Interaktion zwischen Thiachloprid und zwei verschiedenen Konzentrationen an Al_2O_3 -Nanopartikeln. Zwar wird Thiachloprid von den Al_2O_3 -Nanopartikeln nicht gebunden, dennoch kommt es zu einer Abnahme toxischer Effekte mit zunehmender Al_2O_3 -Nanopartikelkonzentration. Möglicherweise bilden die Al_2O_3 -Nanopartikel eine Barriere im Darmlumen der Larven, die die Thiachlopridaufnahme über die peritrophische Membran und/oder das Darmepithel einschränkt. Mit zunehmender Al_2O_3 -Nanopartikelkonzentration könnte diese Barriere dicker und/oder dichter werden und den protektiven Effekt verstärken. Der genaue Mechanismus hinter den nachgewiesenen Effekt ist jedoch noch nicht bekannt. So wäre auch denkbar, dass die Al_2O_3 -Nanopartikel die physikochemischen Begebenheiten im Darmlumen der Tiere beeinflussen, was sich auf die Toxizität des Thiachloprids auswirken könnte. In den **Ausschnitten rechts** ist die Sorption von Thiachloprid an Zeolith-Nanopartikel zu sehen. Mit zunehmender Zeolith-Nanopartikelkonzentration bindet mehr Thiachloprid an den Zeolith-Nanopartikeln, wodurch mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die Bioverfügbarkeit und somit die toxischen Effekte des Insektizids reduziert werden.

1.5. Schlusswort

Die neuen Erkenntnisse, die durch die hier durchgeführten Studien erlangt wurden, tragen auf der einen Seite sicherlich dazu bei, die Effekte von Nanopartikeln auf die Umwelt besser zu verstehen. Auf der anderen Seite wird deutlich, dass noch große Wissenslücken in der Forschung zur Toxikologie von Nanopartikeln existieren. So bleibt zu prüfen, ob die Resultate aus der Al₂O₃-Nanopartikelstudie durch Experimente mit anderen Nanopartikeln, Chemikalien oder Testspezies bestätigt werden können. Denn es wirft sich die Frage auf, inwiefern das bislang unbekannte Pränomen der protektiven Wirkung nicht-bindender Nanopartikel die Resultate vorheriger Studien bereits beeinflusst hat. Daher ist es für das Verständnis der Wirkungen von Nanopartikeln zwingend notwendig, den bislang unbekanntem Mechanismus genauer zu untersuchen. Des Weiteren sollte getestet werden, ob es tatsächlich zu einer Desorption des gebundenen Thiocloprids von den Zeolith-Nanopartikeln unter den physikochemischen Begebenheiten im Verdauungstrakt der Larven kommt. Darüber hinaus besteht der dringende Bedarf, chronische Expositionen durchzuführen, um eventuelle Langzeiteffekte von Nanopartikeln, die einen Stoff binden beziehungsweise nicht binden, auffinden zu können. Eine besonders hohe Relevanz erhält diese Fragestellung durch die Tatsache, dass eine mögliche protektive Barriere aus Nanopartikeln im Intestinaltrakt von Tieren nicht nur zu einer reduzierten Toxinaufnahme führen kann, sondern möglicherweise auch die Aufnahme von Nährstoffen behindert oder sogar – abhängig von den Konzentrationen – vollständig verhindern kann. Dies würde unter chronischen Bedingungen schnell zu drastischen Effekten führen.

Es zeigt sich somit, dass die Forschung in diesem Fachgebiet zu intensivieren ist. Das mag aufgrund der diffizilen Handhabung von Nanopartikel in Experimenten sicherlich nicht einfach sein, bietet aber den Raum für interessante und wichtige Entdeckungen.

1.6. Literatur

- Aiken, G.R., Hsu-Kim, H., Ryan, J.N.: Influence of dissolved organic matter on the environmental fate of metals, nanoparticles, and colloids. *Environmental Science and Technology*. 2011; 45(8): 3196.
- Albanese, A., Tang, P.S., Chan, W.C.: The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*. 2012; 14: 1-16.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D., Schenck, F.J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*. 2003; 86(2): 412-431.
- Armitage, P.D., Cranston, P.S., Pinder, L.C.V. *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. London: Chapman & Hall; 1995.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M.R.: Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*. 2009; 4(10): 634-641.
- Azevedo-Pereira, H., Lemos, M., Soares, A.M.: Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: linking acetylcholinesterase activity to behaviour. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2011a; 74(5): 1210-1215.
- Azevedo-Pereira, H.M., Lemos, M.F., Soares, A.M.: Behaviour and growth of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) under imidacloprid pulse and constant exposure scenarios. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2011b; 219(1-4): 215-224.
- Baun, A., Hartmann, N.B., Grieger, K., Kusk, K.O.: Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*. 2008a; 17(5): 387-395.
- Baun, A., Sørensen, S.N., Rasmussen, R., Hartmann, N.B., Koch, C.B.: Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C₆₀. *Aquatic Toxicology*. 2008b; 86(3): 379-387.
- Beketov, M.A., Liess, M.: Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008; 27(2): 461-470.
- Benn, T.M., Westerhoff, P.: Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental science & technology*. 2008; 42(11): 4133-4139.
- Berlitz-Barbier, A., Buleté, A., Faburé, J., Garric, J., Cren-Olivé, C., Vulliet, E.: Multi-residue analysis of emerging pollutants in benthic invertebrates by modified micro-quick-easy-cheap-efficient-rugged-safe extraction and nanoliquid chromatography–nanospray–tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1367: 16-32.
- Blacquièrre, T., Smagghe, G., Van Gestel, C.A., Mommaerts, V.: Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*. 2012; 21(4): 973-992.

- Bortolotti, L., Montanari, R., Marcelino, J., Medrzycki, P., Maini, S., Porrini, C.: Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*. 2003; 56: 63-68.
- Braschi, I., Blasioli, S., Gigli, L., Gessa, C.E., Alberti, A., Martucci, A.: Removal of sulfonamide antibiotics from water: Evidence of adsorption into an organophilic zeolite Y by its structural modifications. *Journal of hazardous materials*. 2010; 178(1): 218-225.
- Cavallaro, M.C., Morrissey, C.A., Headley, J.V., Peru, K.M., Liber, K.: Comparative chronic toxicity of imidacloprid, clothianidin, and thiamethoxam to *Chironomus dilutus* and estimation of toxic equivalency factors. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2016.
- Chiovarou, E.D., Siewicki, T.C.: Comparison of storm intensity and application timing on modeled transport and fate of six contaminants. *Science of the total environment*. 2008; 389(1): 87-100.
- Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M., Hofmann, T.: Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*. 2008; 17(5): 326-343.
- Cromer Berman, S.M., Walczak, P., Bulte, J.W.: Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2011; 3(4): 343-355.
- Cross, S.E., Innes, B., Roberts, M.S., Tsuzuki, T., Robertson, T.A., McCormick, P.: Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin pharmacology and physiology*. 2007; 20(3): 148-154.
- Delay, M., Frimmel, F.H.: Nanoparticles in aquatic systems. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012; 402(2): 583-592.
- Dhawan, A., Sharma, V.: Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010; 398(2): 589-605.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., Nauen, R.: Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest management science*. 2008; 64(11): 1099-1105.
- Ellis, C., Park, K.J., Whitehorn, P., David, A., Goulson, D.: The neonicotinoid insecticide thiacloprid impacts upon bumblebee colony development under field conditions. *Environmental Science & Technology*. 2017.
- Fischer, J., Müller, T., Spatz, A.-K., Greggers, U., Gruenewald, B., Menzel, R.: Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLOS ONE*. 2014; 9(3): e91364.
- Gottschalk, F., Nowack, B.: The release of engineered nanomaterials to the environment. *Journal of Environmental Monitoring*. 2011; 13(5): 1145-1155.
- Goulson, D.: Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*. 2013; 50(4): 977-987.
- Hansen, S.F., Sørensen, S.N., Skjolding, L.M., Hartmann, N.B., Baun, A.: Revising REACH guidance on information requirements and chemical safety assessment for engineered nanomaterials for aquatic ecotoxicity endpoints: recommendations from the EnvNano project. *Environmental Sciences Europe*. 2017; 29(1): 14.

- Hartland, A., Lead, J.R., Slaveykova, V., O'Carroll, D., Valsami-Jones, E.: The environmental significance of natural nanoparticles. *Nature education knowledge*. 2013; 4(8): 7.
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., Yin, C.: Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010; 31(13): 3657-3666.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A.: A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*. 2012; 336(6079): 348-350.
- Hladik, M.L., Kolpin, D.W., Kuivila, K.M.: Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. *Environmental Pollution*. 2014; 193: 189-196.
- Hochella, M.F., Lower, S.K., Maurice, P.A., Penn, R.L., Sahai, N., Sparks, D.L., Twining, B.S.: Nanominerals, mineral nanoparticles, and earth systems. *Science*. 2008; 319(5870): 1631-1635.
- Inostroza, P.A., Wicht, A.-J., Huber, T., Nagy, C., Brack, W., Krauss, M.: Body burden of pesticides and wastewater-derived pollutants on freshwater invertebrates: Method development and application in the Danube River. *Environmental pollution*. 2016; 214: 77-85.
- ISO/TS80004-1:2015 Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1: Core terms. Organization for Standardization (ISO).
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M.: Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*. 2004; 23(5): 371-378.
- James, R., Sampath, K.: Effect of zeolite on the reduction of cadmium toxicity in water and a freshwater fish, *Oreochromis mossambicus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 1999; 62(2): 222-229.
- Jeschke, P., Nauen, R., Beck, M.E.: Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013; 52(36): 9464-9485.
- Kahru, A., Dubourguier, H.-C.: From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*. 2010; 269(2): 105-119.
- Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Gawęł, M., Semeniuk, S., Borzęcka, M., Posyniak, A., Pohorecka, K.: Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees—Preliminary exposure assessment. *Chemosphere*. 2017; 175: 36-44.
- Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Gawęł, M., Borzęcka, M., Posyniak, A.: Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry - Honeybee poisoning incidents. *Journal of Chromatography A*. 2016; 1435: 100-114.
- Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Koller, M., Epple, M.: Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of materials*. 2010; 22(16): 4548-4554.

- Klabunde, K.J., Richards, R.M. Nanoscale materials in chemistry. First Edition. ed: Wiley Online Library; 2001.
- Klabunde, K.J., Richards, R.M. Nanoscale materials in chemistry. Second Edition. ed: Wiley Online Library; 2009.
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R.: Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008; 27(9): 1825-1851.
- Klaus, A.V., Schawaroch, V.: Novel methodology utilizing confocal laser scanning microscopy for systematic analysis in arthropods (Insecta). *Integrative and Comparative Biology*. 2006; 46(2): 207-214.
- Knauer, K., Sobek, A., Bucheli, T.D.: Reduced toxicity of diuron to the freshwater green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in the presence of black carbon. *Aquatic toxicology*. 2007; 83(2): 143-148.
- Koelmans, A.A., Jonker, M.T., Cornelissen, G., Bucheli, T.D., Van Noort, P.C., Gustafsson, Ö.: Black carbon: the reverse of its dark side. *Chemosphere*. 2006; 63(3): 365-377.
- Koga, R., Tsuchida, T., Fukatsu, T.: Quenching autofluorescence of insect tissues for in situ detection of endosymbionts. *Applied Entomology and Zoology*. 2009; 44(2): 281-291.
- Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Range, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., Alyautdin, R.: Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *Journal of drug targeting*. 2002; 10(4): 317-325.
- Langer-Jaesrich, M., Köhler, H.-R., Gerhardt, A.: Assessing toxicity of the insecticide thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) using multiple end points. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2010; 58(4): 963-972.
- Lee, S.-W., Kim, S.-M., Choi, J.: Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2009; 28(1): 86-91.
- Lehman, S.E., Larsen, S.C.: Zeolite and mesoporous silica nanomaterials: greener syntheses, environmental applications and biological toxicity. *Environmental Science: Nano*. 2014; 1(3): 200-213.
- Lesniak, A., Fenaroli, F., Monopoli, M.P., Åberg, C., Dawson, K.A., Salvati, A.: Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS nano*. 2012; 6(7): 5845-5857.
- Li, M., Czymmek, K.J., Huang, C.: Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO₂ and Al₂O₃ nanoparticles: a dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution. *Journal of hazardous materials*. 2011; 187(1): 502-508.

- Li, X.-q., Elliott, D.W., Zhang, W.-x.: Zero-valent iron nanoparticles for abatement of environmental pollutants: materials and engineering aspects. *Critical reviews in solid state and materials sciences*. 2006; 31(4): 111-122.
- Mohan, N., Chen, C.-S., Hsieh, H.-H., Wu, Y.-C., Chang, H.-C.: In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*. *Nano letters*. 2010; 10(9): 3692-3699.
- Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K.: Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment International*. 2015; 74: 291-303.
- Moschet, C., Piazzoli, A., Singer, H., Hollender, J.: Alleviating the reference standard dilemma using a systematic exact mass suspect screening approach with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2013; 85(21): 10312-10320.
- Mueller, N.C., Braun, J., Bruns, J., Černík, M., Rissing, P., Rickerby, D., Nowack, B.: Application of nanoscale zero valent iron (NZVI) for groundwater remediation in Europe. *Environmental Science and Pollution Research*. 2012; 19(2): 550-558.
- Mueller, N.C., Nowack, B.: Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental science & technology*. 2008; 42(12): 4447-4453.
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2000; 50(1): 161-177.
- Murphy, D.B. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*: John Wiley & Sons; 2001.
- Nair, P.M.G., Park, S.Y., Choi, J.: Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in *Chironomus riparius*. *Chemosphere*. 2013; 92(5): 592-599.
- Nair, P.M.G., Park, S.Y., Lee, S.-W., Choi, J.: Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*. 2011; 101(1): 31-37.
- Nel, A., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M.: Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*. 2009; 8(7): 543-557.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N.: Toxic potential of materials at the nanolevel. *science*. 2006; 311(5761): 622-627.
- Nowack, B., Bucheli, T.D.: Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental pollution*. 2007; 150(1): 5-22.
- Nowack, B., Ranville, J.F., Diamond, S., Gallego-Urrea, J.A., Metcalfe, C., Rose, J., Horne, N., Koelmans, A.A., Klaine, S.J.: Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2012; 31(1): 50-59.

- Oberdörster, G.: Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine*. 2010; 267(1): 89-105.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J.: Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*. 2005: 823-839.
- Oberholster, P., Musee, N., Botha, A.-M., Chelule, P., Focke, W., Ashton, P.: Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2011; 74(3): 416-423.
- OECD 2004a. Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris.
- OECD 2004b. Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris.
- OECD 2010. Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris.
- OECD 2011. Test No. 235: *Chironomus sp.*, Acute Immobilisation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris.
- Ötker, H.M., Akmehmet-Balcıoğlu, I.: Adsorption and degradation of enrofloxacin, a veterinary antibiotic on natural zeolite. *Journal of Hazardous Materials*. 2005; 122(3): 251-258.
- Petersen, E.J., Akkanen, J., Kukkonen, J.V., Weber Jr, W.J.: Biological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental science & technology*. 2009; 43(8): 2969-2975.
- Petersen, E.J., Diamond, S.A., Kennedy, A.J., Goss, G.G., Ho, K., Lead, J., Hanna, S.K., Hartmann, N.B., Hund-Rinke, K., Mader, B.: Adapting OECD aquatic toxicity tests for use with manufactured nanomaterials: key issues and consensus recommendations. *Environ Sci Technol*. 2015; 49(16): 9532-9547.
- Qu, X., Alvarez, P.J., Li, Q.: Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water research*. 2013; 47(12): 3931-3946.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A.: Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*. 2009; 27(1): 76-83.
- Roh, H.-S., Choi, G.K., An, J.-S., Cho, C.M., Kim, D.H., Park, I.J., Noh, T.H., Kim, D.-W., Hong, K.S.: Size-controlled synthesis of monodispersed mesoporous α -Alumina spheres by a template-free forced hydrolysis method. *Dalton Transactions*. 2011; 40(26): 6901-6905.
- Sánchez-Bayo, F., Hyne, R.V.: Detection and analysis of neonicotinoids in river waters - development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere*. 2014; 99: 143-151.
- Saraiva, A.S., Sarmiento, R.A., Rodrigues, A.C., Campos, D., Fedorova, G., Žlábek, V., Gravato, C., Pestana, J.L., Soares, A.M.: Assessment of thiamethoxam toxicity to *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017; 137: 240-246.

- Savage, N., Diallo, M.S.: Nanomaterials and water purification: opportunities and challenges. *Journal of Nanoparticle research*. 2005; 7(4): 331-342.
- Savolainen, K., Alenius, H., Norppa, H., Pylkkänen, L., Tuomi, T., Kasper, G.: Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies - a review. *Toxicology*. 2010; 269(2): 92-104.
- Schmuck, R.: Ecotoxicological profile of the insecticide thiacloprid. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*. 2001; 54: 161-184.
- Schultz, C., Powell, K., Crossley, A., Jurkschat, K., Kille, P., Morgan, A.J., Read, D., Tyne, W., Lahive, E., Svendsen, C., Spurgeon, D.: Analytical approaches to support current understanding of exposure, uptake and distributions of engineered nanoparticles by aquatic and terrestrial organisms. *Ecotoxicology*. 2015; 24(2): 239-261.
- Scown, T., Van Aerle, R., Tyler, C.: Review: do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? *Critical reviews in toxicology*. 2010; 40(7): 653-670.
- Slowing, I.I., Vivero-Escoto, J.L., Wu, C.-W., Lin, V.S.-Y.: Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced drug delivery reviews*. 2008; 60(11): 1278-1288.
- Stanley, J.K., Coleman, J.G., Weiss, C.A., Steevens, J.A.: Sediment toxicity and bioaccumulation of nano and micron-sized aluminum oxide. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010; 29(2): 422-429.
- Stoughton, S.J., Liber, K., Culp, J., Cessna, A.: Acute and chronic toxicity of imidacloprid to the aquatic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* under constant and pulse-exposure conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008; 54(4): 662-673.
- Sun, H., Zhang, X., Niu, Q., Chen, Y., Crittenden, J.C.: Enhanced accumulation of arsenate in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2007; 178(1): 245-254.
- Süß, A., Bischoff, G., Mueller, A.C., Buhr, L.: Chemisch-biologisches Monitoring zu Pflanzenschutzmittel-belastungen und Lebensgemeinschaften in Gräben des Alter Landes. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*. 2006; 58(2): 28-42.
- Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V., Weltje, L.: Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. *Ecotoxicology*. 2007; 16(1): 221-230.
- Thimm, T., Tebbe, C.C.: Protocol for rapid fluorescence in situ hybridization of bacteria in cryosections of microarthropods. *Applied and environmental microbiology*. 2003; 69(5): 2875-2878.
- Tomizawa, M., Casida, J.E.: Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*. 2003; 48(1): 339-364.
- Tomizawa, M., Casida, J.E.: Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2005; 45: 247-268.

- Von der Kammer, F., Ferguson, P.L., Holden, P.A., Masion, A., Rogers, K.R., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Unrine, J.M.: Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): general considerations and conceptual case studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2012; 31(1): 32-49.
- Wagner, S., Gondikas, A., Neubauer, E., Hofmann, T., von der Kammer, F.: Spot the difference: engineered and natural nanoparticles in the environment—release, behavior, and fate. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014; 53(46): 12398-12419.
- Walcarius, A., Mercier, L.: Mesoporous organosilica adsorbents: nanoengineered materials for removal of organic and inorganic pollutants. *Journal of Materials Chemistry*. 2010; 20(22): 4478-4511.
- Wang, S., Peng, Y.: Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*. 2010; 156(1): 11-24.
- Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D.: Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*. 2012; 336(6079): 351-352.
- Wijnhoven, S.W., Peijnenburg, W.J., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Van De Meent, D.: Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*. 2009; 3(2): 109-138.
- Wohlfart, S., Gelperina, S., Kreuter, J.: Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2012; 161(2): 264-273.
- Xu, P., Zeng, G.M., Huang, D.L., Feng, C.L., Hu, S., Zhao, M.H., Lai, C., Wei, Z., Huang, C., Xie, G.X.: Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review. *Science of the Total Environment*. 2012; 424: 1-10.
- Yang, E., Chuang, Y., Chen, Y., Chang, L.: Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology*. 2008; 101(6): 1743-1748.
- Zhang, H., Lamb, R.: Superhydrophobic treatment for textiles via engineering nanotextured silica/polysiloxane hybrid material onto fibres. *Surface Engineering*. 2009; 25(1): 21-24.
- Zhang, X., Sun, H., Zhang, Z., Niu, Q., Chen, Y., Crittenden, J.C.: Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere*. 2007; 67(1): 160-166.
- Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C., Zhao, Y.: Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small*. 2011; 7(10): 1322-1337.
- Zhu, X., Chang, Y., Chen, Y.: Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 2010; 78(3): 209-215.
- Zhu, X., Zhu, L., Chen, Y., Tian, S.: Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *Journal of nanoparticle research*. 2009; 11(1): 67-75.

Teil 2: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripten

Kapitel 1 (siehe Teil 3): Lorenz, C.S., Wicht, A.-J., Guluzada, L., Luo, L., Jäger, L., Crone, B., Karst, U., Tribskorn, R., Liang, Y., Anwander, R., Haderlein, S.B., Huhn, C., Köhler, H.-R.: Nano-sized Al₂O₃ reduces acute toxic effects of thiacloprid on the non-biting midge *Chironomus riparius*. PLOS ONE. 2017; 12(5): e0176356.

In Eigenarbeit wurde der akute Toxizitätstest geplant, statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Darüber hinaus wurden in kompletter Eigenarbeit die Proben für die chemische Analytik, Sorptionsmessungen des Kotes und LA-ICP-MS Analysen entnommen und gegebenenfalls weiter aufbereitet (das Zentrifugieren und Vereinigen der Kotproben, sowie das Aufbereiten der Larven für die LA-ICP-MS Analysen mittels histologischer Methoden und das Anfertigen der Dünnschnitte). Zu einem Großteil (> 90 %) wurde der akute Toxizitätstest in Eigenarbeit durchgeführt, während < 10 % der Daten gemeinschaftlich mit Leonie Jäger im Rahmen ihrer Bachelorarbeit erhoben wurden. Das Manuskript wurde in Eigenarbeit erstellt, wobei der Material und Methodenteil der Nanopartikelsynthese, der chemischen Analytik, den Sorptionsmessungen und der LA-ICP-MS Analyse durch die Koautoren komplementiert wurde, die zudem auch bei der Diskussion der Ergebnisse mitwirkten. Im Anschluss fand die Einreichung, sowie die Fertigstellung des Manuskriptes für eine Publikation in der internationalen Online-Fachzeitschrift PLOS ONE in kompletter Eigenarbeit statt. Die Betreuung dieser Arbeiten sowie die Korrektur des Manuskripts erfolgte durch Heinz Köhler und Carolin Huhn.

Kapitel 2 (siehe Teil 3): Lorenz, C.S., Wicht, A.-J., Guluzada, L., Crone, B., Lee, H.J., Karst, U., Tribskorn, R., Haderlein, S.B., Huhn, C., Köhler, H.-R.: Nano-sized zeolites as modulators of thiacloprid toxicity on *Chironomus riparius*. PeerJ. 2017; 5: e3525.

In Eigenarbeit wurden die akuten Toxizitätstests geplant, durchgeführt und statistisch ausgewertet. Darüber hinaus wurden die Proben für die chemische Analytik entnommen. Die Larven für die LA-ICP-MS Analysen wurden in Eigenarbeit fixiert, eingebettet und am Rotationsmikrotom geschnitten. Das Manuskript wurde in Eigenarbeit angefertigt. Hiervon ausgenommen sind die Material- und Methodenbeschreibungen der verwendeten Zeolithe, der Sorptionsmessungen, der chemischen Analytik und der LA-ICP-MS Analysen, die durch Kooperationspartner erfolgten. Des Weiteren fand die Interpretation der Ergebnisse in Zusammenarbeit mit den Koautoren statt. Die Einreichung des Manuskriptes und dessen Fertigstellung für die Publikation in der internationalen Online-Fachzeitschrift PeerJ erfolgte in Eigenarbeit. Die fachliche Betreuung wurde von Heinz Köhler und Carolin Huhn übernommen. Die Korrektur des Manuskriptes erfolgte durch Heinz Köhler.

Kapitel 3 (siehe Teil 3): Lorenz, C.S.: Examination of Fluorescent Silica Nanoparticles and their Tracking within Larvae of *Chironomus riparius*. Unpublished manuscript. 2017.

100 % Eigenanteil bei der Planung und Durchführung der Exposition der *C. riparius* Larven. Die Analyse mittels Konfokalmikroskopie wurde mit Unterstützung von Nina Glöckner in Eigenarbeit durchgeführt, ebenso wie die Erstellung der 3D-Graphiken und der weiteren Bildbearbeitung. Das Verfassen des Manuskriptes geschah in Eigenleistung, ausgenommen der Beschreibung der Nanopartikelsynthese, die durch Leilei Luo erfolgte. Die Betreuung der Arbeiten und die Korrektur des Manuskripts erfolgte durch Heinz Köhler.

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten

Kapitel 1: Nano-sized Al₂O₃ Reduces Acute Toxic Effects of Thiacloprid on the Non-biting Midge *Chironomus riparius*

Carla S. Lorenz¹, Anna-J. Wicht², Leyla Guluzada³, Leilei Luo⁴, Leonie Jäger¹, Barbara Crone⁵, Uwe Karst⁵, Rita Triebkorn^{1,6}, Yucang Liang⁴, Reiner Anwander⁴, Stefan B. Haderlein³, Carolin Huhn², Heinz-R. Köhler¹

¹Institute of Evolution and Ecology, Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Tübingen, Germany

²Institute of Physical and Theoretical Chemistry, University of Tübingen, Tübingen, Germany

³Center for Applied Geosciences, Environmental Mineralogy and Chemistry, University of Tübingen, Tübingen, Germany

⁴Institute of Inorganic Chemistry, University of Tübingen, Tübingen, Germany

⁵Institute of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Münster, Münster, Germany

⁶Steinbeis Transfer-Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Rottenburg, Germany

* lorenz.carla@web.de

Abstract

This study focuses on interactions between nanoparticles and a pesticide. The aim was to investigate how nano-sized aluminum oxide (410 nm) can alter the toxic effects of thiacloprid, even if no sorption between particles and the insecticide takes place. Thus, our study investigated a rather unexplored interaction. We conducted our research with larvae of *Chironomus riparius* and used thiacloprid as test substance as its toxicity to *C. riparius* is well described. The used nano-Al₂O₃ particles were chosen due to their suitable properties. For testing the acute effects of the interaction, we exposed larvae to thiacloprid (0.5, 1.0, 2.0, and 5.0 µg/L) and nano-Al₂O₃ (300 and 1000 mg/L), either solely or in binary mixtures. While thiacloprid resulted in elevated mortality, nano-Al₂O₃ solely did not exert any effects. Moreover, we observed an aggregation of nano-Al₂O₃ within the lumen of the intestinal tract of the larvae. Further results showed a significantly reduced mortality of fourth instar larvae when they were exposed to mixtures of nanoparticles and the pesticide, compared to thiacloprid alone. With increasing nano-Al₂O₃ concentration, this effect became gradually stronger. Additionally, chemical analyses of internal thiacloprid concentrations implicate reduced uptake of thiacloprid in animals exposed to mixtures. However, as larvae exposed to thiacloprid concentrations > 0.5 µg/L showed severe convulsions, independent of the presence or concentration of nano-Al₂O₃, we assume that nano-Al₂O₃ leads to a delay of mortality and does not entirely prevent it. As sorption measurements on pristine or defecated nano-Al₂O₃ did not reveal any sorptive interaction with thiacloprid, we can exclude sorption-based reduction of thiacloprid bioavailability as a mechanism behind our results. Even though we used test substances which might not co-occur in the environment in the tested concentrations, our study gives evidence for an interaction besides adsorption, which is important to generally understand how nanoparticles might affect biota.

1. Introduction

From an environmental point of view nanoparticles (i.e. particles with a size of 1 - 100 nm) are no particular novelty raised in the centuries of industrialization, as they are formed naturally, e.g. by volcanic activities or forest fires [1-4]. However, nowadays, nanoparticles are specifically synthesized to find their application in electronics, medicine, human care products, and many other sectors [2, 5]. Although engineered nanoparticles (ENPs) are frequently used, and their release, e.g. via wastewater, is very likely, little is known about their fate and effects in the environment [1, 6-8]. Due to these reasons, ENPs have the potential to pose a novel threat to the environment and, consequently, come to focus in ecotoxicology [2, 7, 9]. Many factors, like their abundance in nature, transport within biota and their environment, and their possible persistence, all confounded by their unique properties, e.g. a large reactive surface area per volume, need to be considered to estimate potential hazards of nanoparticles [2, 5, 8, 10]. Consequently, the risk assessment of such particles is highly complex. Moreover, nanoparticles can interact with various substances like pollutants or nutrients, a phenomenon, which is also relevant for risk assessment [10-12]. For example, the adsorption of pollutants by nanoparticles can lead, amongst others, to reduced bioavailability of the contaminant and, consequently, reduced toxicity [2, 11]. Particularly this kind of interaction, adsorption, is in the focus of most studies, but very little attention has been paid to effects based on the presence of chemicals and non-adsorbing nanoparticles. Therefore, potential effects of this kind of interaction are more or less unknown yet. To fill this gap, we aimed at investigating whether nano-sized Al_2O_3 particles interfere with the toxicity of the neonicotinoid insecticide thiacloprid, even though no sorptive interaction between both substances was measured. A co-occurrence of both substances in the environment is theoretically possible, even though no data are yet available. We have chosen these substances, because the effects of thiacloprid have already been described for our study organism [13], the non-biting midge *Chironomus riparius*, which facilitates the interpretation of our results. Nano- Al_2O_3 particles were used, as they did not show any adsorption of thiacloprid in sorption experiments. Moreover, as nano- Al_2O_3 particles will settle to the substratum, the sediment-dwelling and detritus feeding larvae of *C. riparius* [14] will be directly exposed to these particles, as has been predicted for benthic organisms in general [7].

To investigate the effects of a non-sorptive interaction, we conducted acute toxicity tests with fourth instar larvae of *C. riparius*, where we assessed the effects of both test substances – solely and in combination – on the mortality rate and the larvae's behavior. Furthermore, these tests were accompanied by chemical analyses of internal thiacloprid concentrations.

In summary, our main questions addressed in this study were the following:

- (1) Do thiacloprid and nano- Al_2O_3 interact with one another?
- (2) Does nano- Al_2O_3 alter thiacloprid uptake and toxicity in a non-target insect?

2. Material and Methods

2.1. Ethics statement

The used model organism of this study (*Chironomus riparius*) is a nonregulated species and no ethical approval was required for conducting the experiments.

2.2. Cultivation of *Chironomus riparius*

Chironomus riparius belongs to the family Chironomidae (order Diptera), which is one of the most abundant insect families in freshwater ecosystems and thus represents an important part of food webs [14]. Moreover, it is a well-established model organism in ecotoxicology [13, 15, 16]. The cultivation was maintained in our laboratory at the University of Tübingen. A stock culture was established with individuals obtained from Goethe University Frankfurt (Germany). The animals were kept in plastic basins (30 x 55 x 12 cm), containing a bottom layer of fine quartz sand (thickness: 3 cm, particle size: 0.1-0.3 mm), covered by filtered and dechlorinated tap water (filtered by iron and active carbon filters) with continuous, gentle aeration. Larvae were fed with ground TetraMin® fish flakes (Tetra, Germany) every second day, and 50 % of the water volume was changed once per week. All basins were covered by breeding cages (55 x 65 x 120 cm; mesh material with a mesh size of 0.5 mm²) to allow adult midges to swarm and mate. The whole set-up of five breeding cages was located in a climate chamber with a temperature of 21.0 °C ± 0.5 °C and a light-dark cycle of 16:8 h.

2.3. Nano-Al₂O₃ synthesis

The synthesis of the alumina particles was performed according to a slightly modified literature procedure [17]. Aluminum sulfate hexadecahydrate (2.00 g), aluminum nitrate nonahydrate (4.43 g), and urea (9.00 g) were dissolved in 2.0 L of deionized water. The solution was stirred and heated to 98 °C, and subsequently kept at this temperature for 1.5 h. The formed hydrous alumina particles were separated by centrifugation, washed three times with deionized water, and dried at 80 °C overnight. The alumina particles (S1 Fig) had a mean size of 410 nm (Transmission electron microscopy, JEOL JEM 2010 microscope operated at 160 kV) with a surface area of 9.0 m²/g and a zeta potential (deionized water) of +20.4 mV (Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd, UK). Considering the size of these hydrous alumina particles, they, strictly speaking, do not belong to nanoparticles per definition, but are still within the nanoscale range.

2.4. Preparation of test solutions

Nano-Al₂O₃ and thiacloprid were tested as single substances or mixtures in different concentrations. Since we aimed at investigating aspects of compound interactions as a matter of principle and did not focus on environmentally relevant concentrations, we used rather high concentrations of thiacloprid and nano-Al₂O₃ particles to generate possible effects even under acute exposure conditions. All treatments are listed in Table 1.

Table 1: Tested substances and combinations.

Treatment	Concentration of test substances		
	Nano-Al ₂ O ₃ [mg/L]	Thiacloprid [μ g/L] nominal	Thiacloprid [μ g/L] measured
Control	0	0	0
Nano-Al₂O₃ solely, 2 concentrations	300, 1000	0	Not measured
Thiacloprid solely, 4 concentrations	0	0.5, 1.0, 2.0, 5.0	0.4, 0.7, 1.6, 4.0
Mixtures, Type A, 4 concentrations	300	0.5, 1.0, 2.0, 5.0	0.4, 0.8, 1.3, 3.5
Mixtures, Type B, 4 concentrations	1000	0.5, 1.0, 2.0, 5.0	0.2, 0.8, 1.6, 3.7

All test concentrations were prepared with filtered and dechlorinated tap water directly before use. For the preparation of those test solutions that contained thiacloprid, a stock solution of 5 mg/L thiacloprid (analytical standard, Sigma-Aldrich, Germany) was prepared with filtered and dechlorinated tap water, and stirred overnight in the dark at 7 °C. For tests with nano-Al₂O₃ as single substance and for the mixture experiments, the nano-Al₂O₃ particles were added to the test solutions and ultrasonicated for 15 min at room temperature.

2.5. Acute toxicity test

Prior to all experiments, all test vessels (glass, diameter: 7 cm, height: 6.5 cm) were saturated with the corresponding test solutions overnight. Subsequently, all test vessels were emptied and refilled with 30 g fine quartz sand (particle size: 0.1-0.3 mm) and 100 mL of the corresponding test solution, or filtered and dechlorinated tap water as control. Twelve replicates for each of the fifteen treatments were tested, resulting in the exposure of 60 larvae per treatment. To ascertain the test solutions and the stock culture to have the same temperature (~ 21 °C), the test vessels were acclimatized for two hours in a climate chamber. Additionally, the temperatures of the test solutions were measured to guarantee that test animals did not suffer from thermal stress. At the start of the experiments, five fourth instar larvae of *C. riparius* were inserted into each test vessel using a blunt glass pipette. Test vessels were placed on a

table in a random arrangement and were covered with perforated Parafilm® (Carl Roth GmbH, Germany) to reduce evaporation.

Larvae were exposed for 96 h, and no food was added to prevent possible interactions with the test compounds and to decrease the animals' oxygen consumption. In general, test vessels were not aerated during exposure, as we used aerated water to prepare the test concentrations and, furthermore, chironomids can easily tolerate even low oxygen levels [14]. During exposure, mortality and behavior of the larvae (i.e. convulsions correlated with disability to bury themselves into the sediment) were checked and noted every 24 h, and dead animals were removed immediately to avoid contamination of the medium. Larvae were regarded as dead when they were immobile, even after 30 s of mechanical stimulation or whenever they were untraceable. Results were counted as valid when the mean mortality rate in the control was below 10 %, which represents the natural mortality rate.

2.6. Depletion of nano-Al₂O₃

Nanoparticles can change their properties by ageing and biomodification [2, 9, 18]. Consequently, defecated nano-Al₂O₃ was sampled to test whether sorption properties of defecated particles differ from pristine ones. Moreover, we aimed at quantifying the uptake of thiacloprid by the larvae. Therefore, after the exposure experiments, larvae were transferred to a single glass Petri dish per treatment (filled with 100 mL filtered and dechlorinated tap water) where they were left to empty their guts for 24 h. No food was added and the dishes were partially wrapped in aluminum foil to reduce light-induced stress [19]. Afterwards, larvae were frozen in liquid nitrogen for chemical analyses. The fecal pellets of animals exposed to 1000 mg/L nano-Al₂O₃ as single substance, were sampled with a pipette and transferred into 1.5 mL Eppendorf tubes (Eppendorf, Germany). After collection, fecal samples were centrifuged (14000 rpm, 10 min) and pellets were pooled for sorption experiments.

2.7. Sorption measurements

Nano-Al₂O₃ was used as a potential sorbent in two forms: pristine and defecated (i.e. present in fecal pellets). Both were suspended in 0.75 ml Millipore water and thiacloprid was added to reach concentrations of 0.3 µg/L or 5.0 µg/L in the supernatant. These concentrations cover the concentration range of the exposure experiments and allow identifying a potential concentration dependence of the thiacloprid sorption coefficient (K_d -value). Samples were then shaken on an overhead shaker for 15 h and 20 min. After equilibration, thiacloprid concentrations in the aqueous phase were measured in triplicates using a LC-MS method. The liquid chromatography was performed using an Agilent 1260 infinity device including solvent degasser, binary pump, auto-sampler, and column compartment. Thiacloprid was eluted with an isocratic mixture of 50 % water and 50 % acetonitrile (both acidified with 0.1 % formic acid) at 0.6 mL/min for 4 min and detected by tandem mass spectrometry using an Agilent 6490 triple quadrupole mass spectrometer with positive electrospray ionization (ESI+). By this method, the detection limit for thiacloprid was 0.05 µg/L for the experiment with 0.3 µg/L thiacloprid,

and, 0.5 µg/L for the experiment with 5.0 µg/L thiacloprid. LC-MS methodological variability was 5-10 %.

2.8. Chemical analyses

To check whether real thiacloprid concentrations in the experiments corresponded to nominal ones, chemical analyses of the test media were conducted. For each concentration tested, one replicate was analyzed. Water samples were taken from the exposure experiments directly before larvae were introduced, and, additionally, at the end of the exposure. The samples were stored in 2 mL Eppendorf tubes (Eppendorf, Germany) at -18 °C. Prior to analysis, samples were centrifuged at 3000 rpm for 3 min, and 1.0 mL supernatant was filtered with a PTFE syringe filter (pore size 0.45 µm, Chromafil® Macherey-Nagel, Germany). Moreover, also the internal thiacloprid concentrations of *C. riparius* larvae were measured. Therefore, larvae originating from all treatments, after intestinal voiding, were used. To quantify thiacloprid, a liquid-liquid extraction method was developed based on QuEChERS extraction procedure that is originally used in food analysis and which was recently adjusted to analyze environmental samples and biota [20-22]. For sample extraction and cleanup, 10-30 mg frozen larvae, respectively 10-20 larvae parted in 2-3 replicates, were homogenized in liquid nitrogen and extracted with water and acetonitrile. After a cleanup step containing PSA samples were reconstituted with methanol and filtered with a PTFE syringe filter. Quantification was based on deuterated internal standard thiacloprid-D4 (Sigma-Aldrich, USA). Further details can be found in the supporting information S1 Text.

Both the medium and *C. riparius* larvae, were analyzed by LC-MS using a QTOF-LCMS. For LC-MS analysis, a 1260 Infinity LC system coupled to a 6550 iFunnel QTOF LC/MS system (Agilent Technologies, Germany) was used. Details on the LC-MS method are also given in the supporting information S1 Text. For water-samples the limit of detection was 0.2 µg/L. Thiacloprid concentrations in larvae were calculated based on peak area of the deuterated internal standard and the detection limit was 1.0 µg/L.

2.9. LA-ICP-MS imaging

LA-ICP-MS imaging techniques were used to verify ingestion of nano-Al₂O₃ particles by the exposed larvae. This technique was used to display the distribution pattern of aluminum within thin sections of *C. riparius* larvae that have been exposed to 1000 mg/L nano-Al₂O₃ solely, and from the control treatment. Therefore, after termination of the acute toxicity test, surviving larvae of these treatments were decapitated to facilitate the fixation in 2 % glutardialdehyde (Sigma-Aldrich, Germany) buffered in 0.005 M cacodylate buffer (sodium cacodylate trihydrate, pH 7.4, Sigma-Aldrich, Germany). Samples were stored at least for one week at 4 °C before further processing took place. After fixation, samples were de-calcified in 5 % TCA (trichloroacetic acid, ≥ 99% p.a., Carl Roth GmbH) in formol (37 % p.a., stabilized with methanol, Carl Roth GmbH, Germany), dehydrated with ethanol and routinely processed for Technovit® embedding (Technovit® 7100, Heraeus Kulzer GmbH, Germany). Finally, these samples

were sectioned in 7 μm thin sections using a rotary microtome (Leica RM2265, Leica Biosystems, Germany) for LA ICP MS imaging. The LA-ICP-MS analysis was performed with a commercially available laser ablation system (LSX-213, CETAC Technologies, USA) using a Nd:YAG laser with a wavelength of 213 nm. The system was coupled to a quadrupole-based ICP-mass spectrometer (iCAP Q, Thermo Fisher Scientific, Germany). The LA parameters relating to spot size, scanning speed, laser energy, and carrier gas flow were optimized based on the best signal-to-noise ratio in combination with highest spatial resolution. The selected samples were completely ablated using a line by line scan (0 μm space) with a laser energy density of 6 J/cm^2 , 20 Hz laser shot frequency, 5 μm spot diameter and 20 $\mu\text{m}/\text{s}$ scan speed. The dry aerosol was transported to the ICP-MS system with a carrier gas mixture of helium (0.9 L/min) passing the ablation chamber and argon (0.4 L/min) added downstream the ablation chamber. To compensate drift effects and monitor plasma stability, a gallium (ICP standard, SCP Science, Canada) solution as an internal standard (10 ng/L) was introduced continuously by a PFA (perfluoroalkoxy alkane) nebulizer and a cyclonic spray chamber. For maximum sensitivity and to minimize possible interferences, the measurement was performed in the kinetic energy discrimination mode (KED) with helium as cell gas. The isotopes ^{27}Al , ^{65}Ga were monitored with dwell times of 0.1 s and 0.05 s, respectively. Gallium ICP-standard (1000 mg/mL) was obtained from SCP Science (Courtaboeuf, France). Nitric acid (67-69 %, Optimat) was purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). The recorded ablation profiles were converted into 2D distribution images and evaluated with the software ImageJ.

2.10. Data analysis

Statistical analyses were applied on datasets recorded for all individuals within one treatment ($n = 60$). To compare the treatments with each other, likelihood ratio tests and, if necessary, Fishers exact test were conducted ($\alpha = 0.05$) with SAS JMP version 12 (SAS Institute, Germany). To correct for multiple testing, the α -level was adjusted by sequentially Bonferroni correction [23]. Table Curve 2D (Systat Software GmbH, Germany) was used for calculating regression curves and SigmaPlot 13 (Systat Software GmbH, Germany) was used to plot graphs.

2.11. Data availability statement

All relevant data are summarized within the paper. Raw data of the experiments are available as Supporting Information S1 Table.

3. Results

3.1. Sorption measurements

For pristine as well as defecated nano- Al_2O_3 , $103 \pm 5 \%$ and $105 \pm 5 \%$ of the applied 0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ thiacloprid were measured to be present in the aqueous phase after equilibration, whereas the recovery rates for 5.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ thiacloprid were $99 \pm 0.6 \%$ and $98 \pm 1 \%$. Thus, no significant sorption of thiacloprid was found in both types of nano- Al_2O_3 .

3.2. Chemical analyzes

Chemical analyses of water samples from the start and the end of the exposure experiments showed that actual values in solution were, on average, 26.86 ± 9.94 % lower than nominal concentrations (Table 1). However, there were only minor deviations among the three treatments including thiacloprid (thiacloprid solely, mixture type A, mixture type B).

The internal thiacloprid concentrations of chironomids vs. the concentrations in the supernatant are displayed in Fig 1. For all treatments, it was shown that the internal thiacloprid concentrations in the chironomids followed a saturation curve.

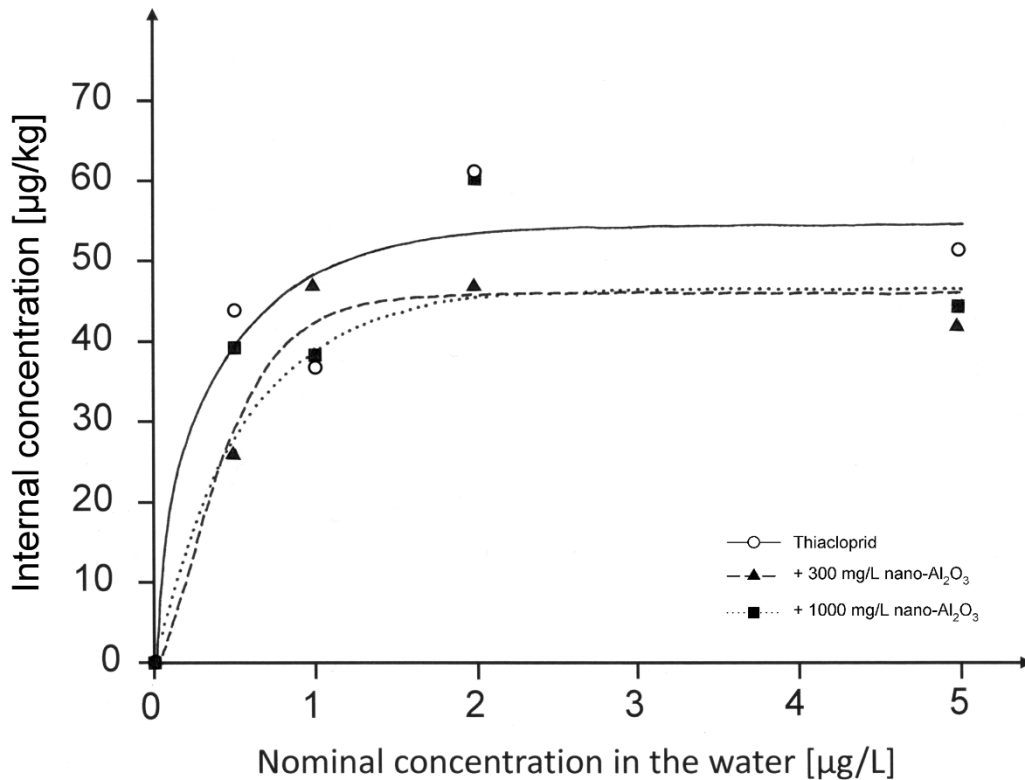


Fig. 1. Internal thiacloprid concentrations in *C. riparius* larvae [µg/kg] vs nominal concentration in water [µg/L].

Larvae were exposed for 96 h before they were transferred to filtered and dechlorinated tap water for 24 h to empty their guts (n = 1-3). r^2 of the respective regression curves were 0.91 for Thiacloprid, 0.97 for animals exposed to the mixture including 300 mg/L nano-Al₂O₃ and 0.82 for animals exposed to a mixture with 1000 mg/L nano-Al₂O₃. Nominal values are shown in this graph, whereas measured concentrations can be obtained from Table 1.

Despite general similarity obtained for these regression curves, the exposure to thiacloprid as a single substance showed a (non-significant) tendency to result in a slightly higher saturation level than those exposures that comprised nano-Al₂O₃.

3.3. Acute toxicity test

The mean mortality rate in the control was 6.5 ± 5.5 % after 96 h of exposure thus meeting the criterion of validity (≤ 10 % mortality). Concerning the effect of nano- Al_2O_3 as single substance, no differences were found between the control and both nano- Al_2O_3 concentrations (Likelihood Ratio Test, $\chi^2 = 4.182$, $df = 2$, $p = 0.1235$) after 96 h. In contrast, thiacloprid exerted elevated mortality in a concentration-dependent manner. However, nano- Al_2O_3 reduced thiacloprid-induced mortality in the mixture experiments, presumably also in a concentration-dependent manner, since the mean mortality rates of larvae were the lowest when exposed to mixture type A, followed by type B (see Table 1) and thiacloprid solely (Fig 2). However, significant differences were only found at intermediate thiacloprid concentrations.

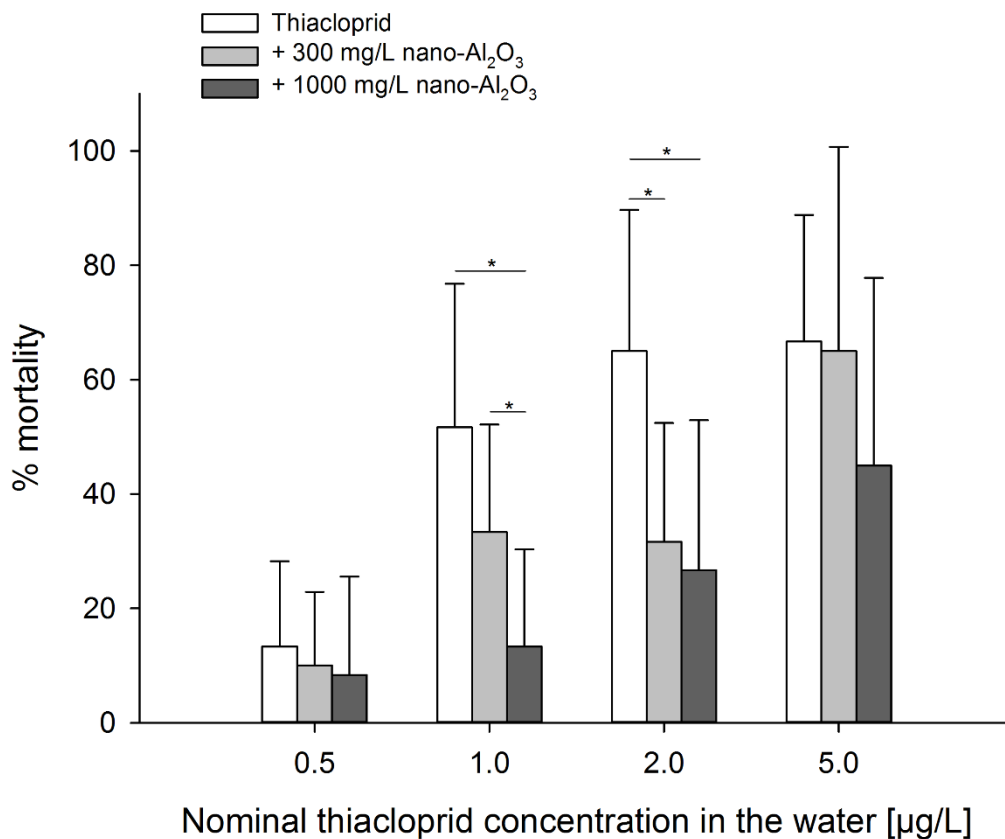


Fig. 2. Mortality rates (means \pm SD) of larvae per test vessel.

Larvae were exposed to either thiacloprid solely, a mixture of thiacloprid and 300 mg/L nano- Al_2O_3 , or a mixture of 1000 mg/L nano- Al_2O_3 , after 96 h of exposure ($n = 12$). Four comparisons (Likelihood ratio test and Fishers exact test, if necessary) were conducted (one for each thiacloprid concentration) and significant differences between the data displayed at the respective two ends of the horizontal lines are given (* $p \leq \alpha$ when adjusted according to Holm-Bonferroni's method [23], Fishers exact test). Nominal values are shown in this graph, whereas measured concentrations can be obtained from Table 1.

To be more precise, the addition of 1000 mg/L or 300 mg/L nano- Al_2O_3 to 1.0 or 2.0 µg/L thiacloprid resulted in significantly lower mortality rates when compared to 1.0 and 2.0 µg/L thiacloprid solely. The observation that higher concentrations of nano- Al_2O_3 result in lower toxicity is furthermore supported

by the significant difference between the results obtained for the mixtures type A and type B (see Table 1) when 1.0 µg/L thiacloprid was applied.

Nevertheless, even though the mortality rate of larvae from mixture type A and type B was lower than for animals exposed to thiacloprid solely, it was obvious that all larvae exposed to thiacloprid concentrations > 0.5 µg/L showed strong convulsions during exposure and were unable to bury themselves into the sediment (S2 Fig). This effect was recorded for the vast majority of larvae exposed to 2.0 or 5.0 µg/L thiacloprid after 24 h and for larvae exposed to 1.0 µg/L after 48 h. Moreover, larvae exposed to both nano-Al₂O₃ concentrations, solely or in addition to 0.5 µg/L thiacloprid, displayed whitish gut lumina, obviously formed by agglomerations of nano-Al₂O₃ (Fig 3 b). This phenomenon increased in intensity with particle concentration, as well as with exposure time.

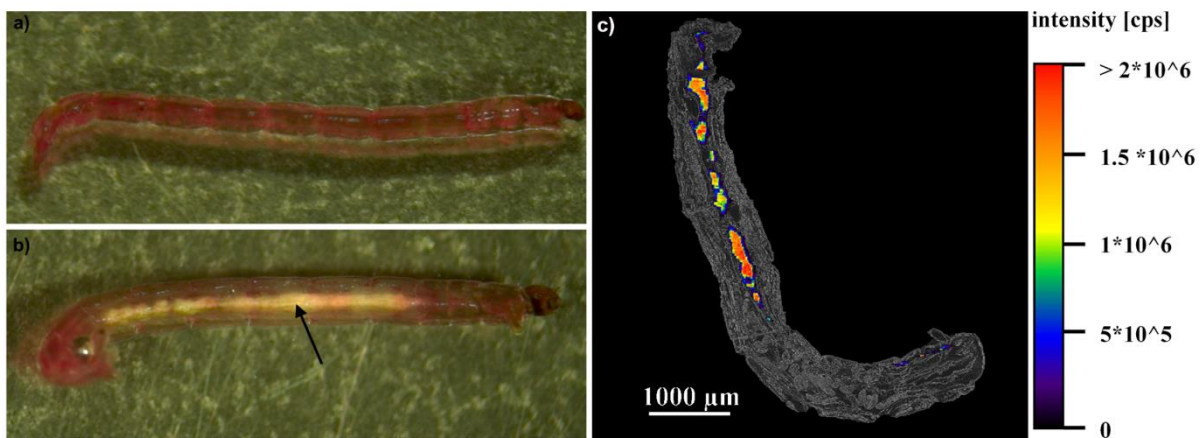


Fig. 3. Images of *C. riparius* larvae.

a) photography of a larva from the control (after 96 h of exposure). **b)** photography of a larva exposed to 1000 mg/L nano-Al₂O₃ (after 96 h of exposure). The arrow marks the agglomeration of nano-Al₂O₃ within the gut. **c)** overlay of an image of a thin section of a larva (after 96 h of exposure to 1000 mg/L nano-Al₂O₃) at phase contrast and the aluminum distribution within this section, which was measured by LA-ICP-MS imaging techniques

3.4. LA-ICP-MS imaging

Aluminum aggregates were detected within the gut lumina of larvae exposed to nano-Al₂O₃ (Fig 3 c) using LA-ICP-MS. In contrast, no aluminum was detected in individuals from the control treatments. These results were consistent for all analyzed individuals (n = 5).

4. Discussion

The aim of the study was to investigate possible interactions of nano-Al₂O₃ and thiacloprid that may potentially affect the toxicity of this neonicotinoid insecticide on the non-biting midge *Chironomus riparius*. Due to the nature of this study, we did not focus on environmentally relevant concentrations, but on possible interactions between both substances within an organism. In our experiments, larvae were exposed to both substances solely or in binary mixtures, while mortality and behavior were monitored. The results of our study clearly showed that nano-Al₂O₃ particles were non-toxic when

applied solely, but prevent (or at least delayed) the negative effects of thiacloprid in mixture experiments, even though we could not measure any sorption of thiacloprid to the nano-sized particles. Our first result, the lack of toxic effects of nano-Al₂O₃, diverges from a former study of Oberholster *et al.* [24], who tested the effect of nano-sized α -alumina and γ -alumina (both with an average size range < 100 nm) on the survival rate of 2nd – 3rd instar larvae of *Chironomus tentans* and observed a significant decrease in survival of the larvae compared to the control. Also other parameters like growth length, DNA strand breaks, or catalase enzyme activity indicated harmful effects of α -alumina and γ -alumina [24]. The presence of toxic effects in the study of Oberholster *et al.* [24] and in other studies (e.g. [25, 26]) contradicts with the absence of effects in our experiments, but can be attributed to differences in endpoints, test setups, test species and life stages. In this context, it must be noted that the transferability of results between different nanoparticle studies must be handled with extreme care, since nanoparticles – even if they are chemically identical – dramatically change their properties and, likely also their ecotoxicity (or mode of action) when characteristics like size or shape differ [1, 9, 24, 27, 28]. In our case, the absence of toxicity is likely caused by the relatively large size of the nano-Al₂O₃ particles, since larger particles tend to have less toxic impacts than smaller ones of the same chemical composition [6, 24, 26]. Next to the result that the nano-Al₂O₃ did not affect the mortality rate of fourth instar larvae of *C. riparius*, we observed that the mortality rates increased in all treatments with increasing thiacloprid concentration. This trend was expected, since former studies already have revealed the strong toxicity of thiacloprid on the non-target organism *C. riparius* [13]. Moreover, larvae exposed to higher concentrations than 0.5 μ g/L thiacloprid showed heavy convulsions and were unable to bury themselves in the sediment. These convulsions, and also mortality, were likely caused by a permanent stimulus of the nervous system by thiacloprid, which acts as an agonist of the nicotinic acetylcholine receptor [29]. Behavioral impairments of *C. riparius* larvae exposed to thiacloprid or imidacloprid have also been found by Langer-Jaesrich *et al.* [13] and Azevedo-Pereira *et al.* [30, 31]. However, effect concentrations of thiacloprid were much higher in our study compared to the literature. For example, Langer-Jaesrich *et al.* [13] report LC₅₀ values of 5.18 or 1.5 μ g/L thiacloprid, when larvae were exposed for 10 or 17 days, respectively. We assume that the lack of food adds stress to the larvae, which may have enhanced the toxicity of thiacloprid synergistically. In controls, however, none of the investigated endpoints was affected by starvation.

Although toxic effects of thiacloprid were demonstrated, we observed that the mortality rate of the midge larvae was significantly reduced in the mixture treatments with intermediate thiacloprid concentrations, compared to thiacloprid as single substance. Consequently, the presence of nano-Al₂O₃ had a positive effect on the survivability, which was also found to be concentration dependent. However, this effect was absent for the lowest and highest thiacloprid concentrations, probably since the concentrations of the insecticide were either too low to cause any effect, or too high in cases when the protective effect of nano-Al₂O₃ particles could not compensate the neurotoxic effects of thiacloprid. Although it is already known that nanoparticles, particularly those which are present in the intestinal tract, can reduce negative

impacts of toxins [2, 6], the underlying mechanisms are scarcely described until now. However, as the rationale for our study was to test interactions that are not based on adsorption, we explicitly had chosen particles with suitable properties, which were successfully confirmed for pristine and defecated nano- Al_2O_3 particles by sorption experiments. So, we can definitely exclude reduced bioavailability of thiacloprid to be caused by sorption processes both outside or inside the animals. Thus, the reduced toxicity is likely a result of another toxicological mechanism. From our point of view, it is more likely that nano- Al_2O_3 either changes the physico-chemical properties of the intestinal tract (e.g. the pH), or it forms a physical barrier within the intestinal tract, i.e. by covering the gut epithelium or by thickening the peritrophic membrane. The latter assumption is based on the observation that nano- Al_2O_3 was ingested by the larvae and aggregated within the gut. Such ingestion and aggregation or accumulation of nano-sized Al_2O_3 have already been described by Zhu *et al.* [26] for *Daphnia magna*, in which also other nanoparticles, e.g. nano- C_{60} [11], carbon nanotubes [32] or TiO_2 [33] aggregated/accumulated. For chironomids, the ingestion of nano- Al_2O_3 was obviously oral, since the larvae are deposit-feeders and nano- Al_2O_3 particles tend to settle down on the substrate [14]. We assume that the feeding behavior of, and, consequently, the uptake of nano- Al_2O_3 particles by larvae exposed to higher thiacloprid concentrations ($> 0.5 \mu\text{g/L}$) was impaired by the insecticide. Thus, in these individuals, no aggregates of nano- Al_2O_3 that are visible with the naked eye could be detected. Since we have demonstrated a protective effect of nano- Al_2O_3 also for individuals exposed to higher thiacloprid concentrations, however, we assume that they ingested nano- Al_2O_3 as well, but to a lower extent. Moreover, it is likely that most of the nano- Al_2O_3 was ingested within the first few hours of the exposure experiments, before thiacloprid lead to convulsions and impaired the foraging behavior. This might also explain the positive correlation between survival and nano- Al_2O_3 concentration. We expect that larvae, exposed to high concentrations of nano- Al_2O_3 , ingested more of these particles which, at least in the short term, led to benefits during further exposure, e.g. by enhancing the physical barrier within the gut. Moreover, the mortality rates and the observed protective effect of nano- Al_2O_3 are reflected in the regression curves calculated for the internal thiacloprid concentrations in the midge larvae. These curves showed - although the internal concentrations were rather similar - a trend towards a higher saturation level when thiacloprid was administered as a single substance compared to larvae that have been exposed to mixtures. Furthermore, the data revealed thiacloprid to accumulate in the larvae despite of its rather low $\log K_{\text{ow}}$ of 1.26. However, it cannot be excluded that a time span of 24 h might be too short for the larvae to excrete substantial amounts of ingested thiacloprid and/or its metabolites. This assumption is also supported by a study of Azevedo-Pereira *et al.* [31], which showed that *C. riparius* larvae exposed to a neonicotinoid for 96 h recovered only after 6 days in clean medium.

Given that the animals suffer from thiacloprid even in the mixture experiments, we expect that the nano- Al_2O_3 just deferred their death and did not totally prevent it. In addition, the aggregation of nano- Al_2O_3 within the intestinal tract of organisms may lead to decreased uptake rates for various other, also beneficial substances, not only thiacloprid. Under such conditions, the food ingestion and nutrient

absorption in these animals are reasonably suspected to be affected [33]. All this probably does not affect the mortality rate of *C. riparius* larvae under acute treatment, but will likely impair the animals and possibly even increase mortality under chronic conditions. At the moment, however, we can only speculate about the chronic effects of nano- Al_2O_3 and, therefore, further experiments with extended exposure times, e.g. experiments following the OECD guidelines 218/219 [15, 16], should be conducted. These results will help to interpret the results of future nanoparticle studies, since an obstruction of the gut of sediment or particle-feeders by an aggregation/accumulation of nanomaterials might be of importance for the risk assessment of these substances. Nevertheless, our present results on acute effects already revealed a new and previously undetected kind of interaction between nanoparticles and pollutants within an organism. This observation highlights the need of more research about nanomaterials, particularly in view on their interactions with other chemicals in ecotoxicology.

Acknowledgements

We thank Martin Pattky, Sylvain Merel, Christian Zwiener, Sandra Dietz, Elisabeth Früh and Paul Thellmann (all Tübingen University) for helping advice and (technical) support.

References

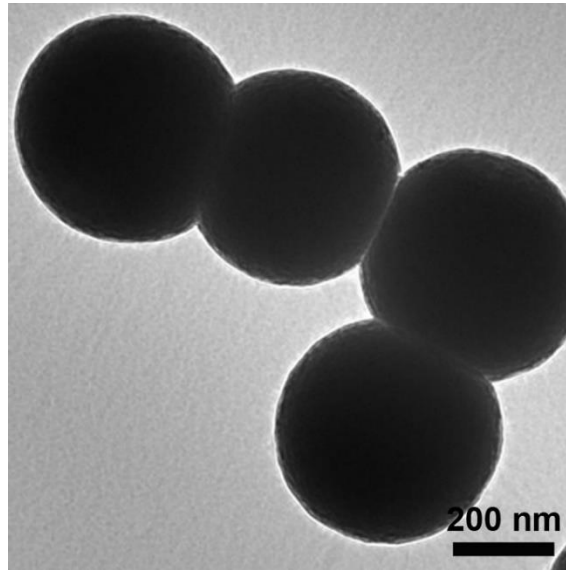
1. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*. 2005;823-39.
2. Nowack B, Bucheli TD. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental pollution*. 2007;150(1):5-22.
3. Hartland A, Lead JR, Slaveykova V, O'Carroll D, Valsami-Jones E. The environmental significance of natural nanoparticles. *Nature education knowledge*. 2013;4(8):7.
4. Wagner S, Gondikas A, Neubauer E, Hofmann T, von der Kammer F. Spot the difference: engineered and natural nanoparticles in the environment—release, behavior, and fate. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014;53(46):12398-419.
5. Ju-Nam Y, Lead JR. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the total environment*. 2008;400(1):396-414.
6. Wiesner MR, Lowry GV, Alvarez P, Dionysiou D, Biswas P. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental science & technology*. 2006;40(14):4336-45.
7. Scown T, Van Aerle R, Tyler C. Review: do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? *Critical reviews in toxicology*. 2010;40(7):653-70.

8. Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao A-J, *et al.* Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*. 2008;17(5):372-86.
9. Schultz C, Powell K, Crossley A, Jurkschat K, Kille P, Morgan AJ, *et al.* Analytical approaches to support current understanding of exposure, uptake and distributions of engineered nanoparticles by aquatic and terrestrial organisms. *Ecotoxicology*. 2015;24(2):239-61. doi: 10.1007/s10646-014-1387-3.
10. Handy RD, Von der Kammer F, Lead JR, Hassellöv M, Owen R, Crane M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*. 2008;17(4):287-314.
11. Baun A, Sørensen SN, Rasmussen R, Hartmann NB, Koch CB. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C₆₀. *Aquatic Toxicology*. 2008;86(3):379-87.
12. Lead JR, Wilkinson KJ. Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends. *Environmental Chemistry*. 2006;3(3):159-71.
13. Langer-Jaesrich M, Köhler H-R, Gerhardt A. Assessing toxicity of the insecticide thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) using multiple end points. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2010;58(4):963-72.
14. Armitage PD, Cranston PS, Pinder LCV. *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. London: Chapman & Hall; 1995.
15. OECD. Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 2004.
16. OECD. Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 2004.
17. Roh H-S, Choi GK, An J-S, Cho CM, Kim DH, Park IJ, *et al.* Size-controlled synthesis of monodispersed mesoporous α -Alumina spheres by a template-free forced hydrolysis method. *Dalton Transactions*. 2011;40(26):6901-5.
18. Roberts AP, Mount AS, Seda B, Souther J, Qiao R, Lin S, *et al.* In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental science & technology*. 2007;41(8):3025-9.
19. Hirabayashi K, Wotton RS. Organic matter processing by chironomid larvae (Diptera: Chironomidae). *Hydrobiologia*. 1998;382(1-3):151-9.

20. Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*. 2003;86(2):412-31.
21. Berlioz-Barbier A, Buleté A, Faburé J, Garric J, Cren-Olivé C, Vulliet E. Multi-residue analysis of emerging pollutants in benthic invertebrates by modified micro-quick-easy-cheap-efficient-rugged-safe extraction and nanoliquid chromatography–nanospray–tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*. 2014;1367:16-32.
22. Inostroza PA, Wicht A-J, Huber T, Nagy C, Brack W, Krauss M. Body burden of pesticides and wastewater-derived pollutants on freshwater invertebrates: Method development and application in the Danube River. *Environmental pollution*. 2016;214:77-85.
23. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of statistics*. 1979:65-70.
24. Oberholster P, Musee N, Botha A-M, Chelule P, Focke W, Ashton P. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2011;74(3):416-23.
25. Li Y, Yu S, Wu Q, Tang M, Pu Y, Wang D. Chronic Al₂O₃-nanoparticle exposure causes neurotoxic effects on locomotion behaviors by inducing severe ROS production and disruption of ROS defense mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of hazardous materials*. 2012;219:221-30.
26. Zhu X, Zhu L, Chen Y, Tian S. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *Journal of nanoparticle research*. 2009;11(1):67-75.
27. Gorth DJ, Rand DM, Webster TJ. Silver nanoparticle toxicity in *Drosophila*: size does matter. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:343-50.
28. Ispas C, Andreescu D, Patel A, Goia DV, Andreescu S, Wallace KN. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish. *Environmental science & technology*. 2009;43(16):6349-56.
29. Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W, Nauen R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest management science*. 2008;64(11):1099-105.
30. Azevedo-Pereira H, Lemos M, Soares AM. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: linking acetylcholinesterase activity to behaviour. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2011;74(5):1210-5.

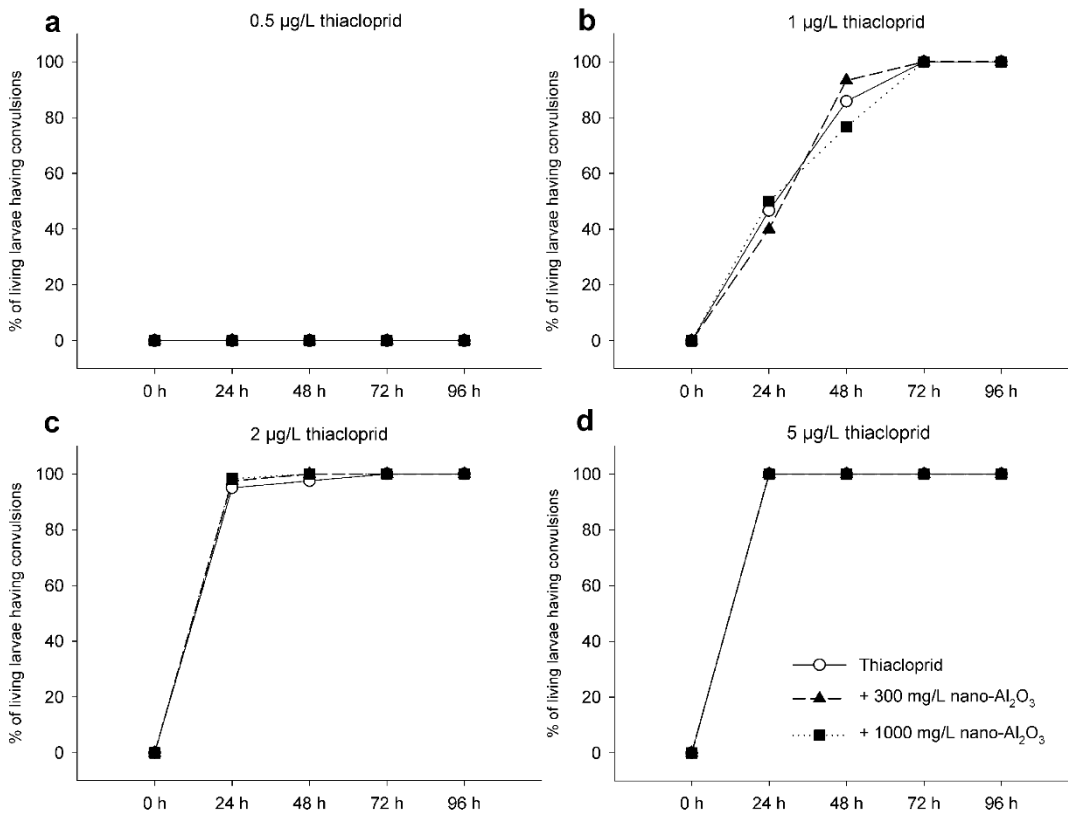
31. Azevedo-Pereira HM, Lemos MF, Soares AM. Behaviour and growth of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) under imidacloprid pulse and constant exposure scenarios. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2011;219(1-4):215-24.
32. Petersen EJ, Akkanen J, Kukkonen JV, Weber Jr WJ. Biological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental science & technology*. 2009;43(8):2969-75.
33. Zhu X, Chang Y, Chen Y. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 2010;78(3):209-15.

Supporting information



S1 Fig. Transmission electron microscopy (TEM) image of nano- Al_2O_3 particles.

The sample was prepared by dispersing the powdery material in ethanol; one drop of the suspension was dried on the copper grid with a holy carbon film.



S2 Fig. Percentages of living *C. riparius* larvae showing convulsions during exposure (96 h).

Values are shown for different nominal concentrations of thiacloprid in water (a-d).

S1 Text. Detailed description of chemical analyses.

We used a modified QuEChERS extraction procedure for the quantification of thiacloprid. Therefore, we homogenized 10-30 mg frozen in liquid nitrogen with a Micro-homogenizer (Carl Roth GmbH, Germany) in a 2.5 mL tube (Eppendorf, Germany) larvae for sample extraction and cleanup. 20 μ L deuterated internal standard thiacloprid-D4 (Sigma-Aldrich, USA) were added, resulting in a final concentration of 8.0 μ g/L in the analyzed sample. A volume of 0.5 mL water (Chromasolv[®], Sigma-Aldrich, USA) and 0.5 mL acetonitrile were added, and the sample was shaken for 20 s using a Vortex mixer. After addition of 25 mg NaCl (Sigma-Aldrich, USA) and 75 mg anhydrous MgSO₄ (Sigma-Aldrich, USA) the sample was immediately shaken for 20 s using a Vortex mixer and centrifuged for 2 min at 10000 rpm. A volume of 0.5 mL of the acetonitrile phase were transferred to 12 mg primary-secondary amine (PSA, Agilent technologies, Germany) and 90 mg anhydrous MgSO₄, then shaken for 20 s and centrifuged for 2 min at 10000 rpm. The supernatant was concentrated in a nitrogen stream at room temperature, and the residue was reconstituted in 250 μ L methanol and filtered with a PTFE syringe filter (pore size 0.45 μ m, Chromafil[®], Macherey-Nagel, Germany).

For the LC-MS analyses we injected aliquots of 10 μ L onto a Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1x150 mm, 3.5-Micron, narrow bore, Agilent Technologies, USA) with a narrow bore guard column (2.1 x 12.5 mm, 5-Micron, Agilent Technologies). A jetstream electrospray ionization (ESI) source was operated with a nebulizer pressure of 35 psig, drying gas temperature of 160 °C, a flow rate of 16 L/min, and a fragmentor voltage of 360 V. In the positive mode, capillary voltage was set to -4000 V, skimmer voltage to 65 V and the nozzle voltage to -500 V. The mass range was 80 - 1200 m/z with a data acquisition rate of 1 spectrum/s. The sheath gas temperature was set to 325 °C with a flow rate of 11 L/min. For internal calibration, purine and HP0921 (Agilent Technologies, USA, m/z = 121.0508, 922.0097) were used and the mass range was set to 70 ppm. A gradient elution was performed at a flow rate of 0.3 mL/min using water containing 0.1 % formic acid and methanol. The initial content of 95 % water was decreased after 1 min to 5 % water over 7 min and, after another 7 min at 5 %, increased to 95 % water over 0.5 min.

Data analysis was performed with MassHunter software (Agilent Technologies, USA). For quantification of water-samples, a calibration curve in the range of 0.2-10 μ g/L thiacloprid was used ($r^2 = 0.9991$) and the limit of detection was 0.2 μ g/L. Thiacloprid concentrations in larvae were calculated based on peak area of the deuterated internal standard of 8.0 μ g/L and the detection limit was 1.0 μ g/L.

S1 Table. Data set. Excel file.

Table S1: Raw data. Mortality of *C. riparius* larvae after 96 h of exposure.

Treatment	Replicate	Alive per dish	Thiacloprid (µg/L)	Al ₂ O ₃ (mg/L)	Dead per dish	Larvae (inserted)	Mortality per dish (%)
0.5_1000NP	1	4	0.5	1000	1	5	20
0.5_1000NP	2	5	0.5	1000	0	5	0
0.5_1000NP	3	5	0.5	1000	0	5	0
0.5_1000NP	4	4	0.5	1000	1	5	20
0.5_1000NP	5	5	0.5	1000	0	5	0
0.5_1000NP	6	2	0.5	1000	3	5	60
0.5_1000NP	7	5	0.5	1000	0	5	0
0.5_1000NP	8	5	0.5	1000	0	5	0
0.5_1000NP	9	5	0.5	1000	0	5	0
0.5_1000NP	10	5	0.5	1000	0	5	0
0.5_1000NP	11	5	0.5	1000	0	5	0
0.5_1000NP	12	5	0.5	1000	0	5	0
0.5_NP300	1	5	0.5	300	0	5	0
0.5_NP300	2	4	0.5	300	1	5	20
0.5_NP300	3	4	0.5	300	1	5	20
0.5_NP300	4	3	0.5	300	2	5	40
0.5_NP300	5	5	0.5	300	0	5	0
0.5_NP300	6	5	0.5	300	0	5	0
0.5_NP300	7	4	0.5	300	1	5	20
0.5_NP300	8	4	0.5	300	1	5	20
0.5_NP300	9	5	0.5	300	0	5	0
0.5_NP300	10	5	0.5	300	0	5	0
0.5_NP300	11	5	0.5	300	0	5	0
0.5_NP300	12	5	0.5	300	0	5	0
0.5_thia	1	4	0.5	0	1	5	20
0.5_thia	2	5	0.5	0	0	5	0
0.5_thia	3	4	0.5	0	1	5	20
0.5_thia	4	5	0.5	0	0	5	0
0.5_thia	5	5	0.5	0	0	5	0
0.5_thia	6	4	0.5	0	1	5	20
0.5_thia	7	5	0.5	0	0	5	0
0.5_thia	8	4	0.5	0	1	5	20
0.5_thia	9	5	0.5	0	0	5	0
0.5_thia	10	3	0.5	0	2	5	40
0.5_thia	11	5	0.5	0	0	5	0
0.5_thia	12	3	0.5	0	2	5	40
1_1000NP	1	5	1	1000	0	5	0
1_1000NP	2	5	1	1000	0	5	0
1_1000NP	3	4	1	1000	1	5	20
1_1000NP	4	5	1	1000	0	5	0

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 1)

Treatment	Replicate	Alive per dish	Thiacloprid (µg/L)	Al ₂ O ₃ (mg/L)	Dead per dish	Larvae (inserted)	Mortality per dish (%)
1_1000NP	5	4	1	1000	1	5	20
1_1000NP	6	5	1	1000	0	5	0
1_1000NP	7	5	1	1000	0	5	0
1_1000NP	8	4	1	1000	1	5	20
1_1000NP	9	2	1	1000	3	5	60
1_1000NP	10	4	1	1000	1	5	20
1_1000NP	11	5	1	1000	0	5	0
1_1000NP	12	4	1	1000	1	5	20
1_NP300	1	5	1	300	0	5	0
1_NP300	2	3	1	300	2	5	40
1_NP300	3	2	1	300	3	5	60
1_NP300	4	5	1	300	0	5	0
1_NP300	5	4	1	300	1	5	20
1_NP300	6	3	1	300	2	5	40
1_NP300	7	2	1	300	3	5	60
1_NP300	8	3	1	300	2	5	40
1_NP300	9	3	1	300	2	5	40
1_NP300	10	4	1	300	1	5	20
1_NP300	11	3	1	300	2	5	40
1_NP300	12	3	1	300	2	5	40
1_thia	1	1	1	0	4	5	80
1_thia	2	3	1	0	2	5	40
1_thia	3	1	1	0	4	5	80
1_thia	4	4	1	0	1	5	20
1_thia	5	3	1	0	2	5	40
1_thia	6	2	1	0	3	5	60
1_thia	7	0	1	0	5	5	100
1_thia	8	2	1	0	3	5	60
1_thia	9	2	1	0	3	5	60
1_thia	10	4	1	0	1	5	20
1_thia	11	4	1	0	1	5	20
1_thia	12	3	1	0	2	5	40
2_1000NP	1	5	2	1000	0	5	0
2_1000NP	2	4	2	1000	1	5	20
2_1000NP	3	4	2	1000	1	5	20
2_1000NP	4	4	2	1000	1	5	20
2_1000NP	5	5	2	1000	0	5	0
2_1000NP	6	2	2	1000	3	5	60
2_1000NP	7	5	2	1000	0	5	0
2_1000NP	8	5	2	1000	0	5	0
2_1000NP	9	1	2	1000	4	5	80
2_1000NP	10	3	2	1000	2	5	40
2_1000NP	11	4	2	1000	1	5	20

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 1)

Treatment	Replicate	Alive per dish	Thiacloprid (µg/L)	Al ₂ O ₃ (mg/L)	Dead per dish	Larvae (inserted)	Mortality per dish (%)
2_1000NP	12	2	2	1000	3	5	60
2_NP300	1	2	2	300	3	5	60
2_NP300	2	2	2	300	3	5	60
2_NP300	3	3	2	300	2	5	40
2_NP300	4	2	2	300	3	5	60
2_NP300	5	5	2	300	0	5	0
2_NP300	6	4	2	300	1	5	20
2_NP300	7	4	2	300	1	5	20
2_NP300	8	3	2	300	2	5	40
2_NP300	9	4	2	300	1	5	20
2_NP300	10	5	2	300	0	5	0
2_NP300	11	4	2	300	1	5	20
2_NP300	12	3	2	300	2	5	40
2_thia	1	0	2	0	5	5	100
2_thia	2	2	2	0	3	5	60
2_thia	3	3	2	0	2	5	40
2_thia	4	3	2	0	2	5	40
2_thia	5	1	2	0	4	5	80
2_thia	6	0	2	0	5	5	100
2_thia	7	1	2	0	4	5	80
2_thia	8	3	2	0	2	5	40
2_thia	9	1	2	0	4	5	80
2_thia	10	2	2	0	3	5	60
2_thia	11	1	2	0	4	5	80
2_thia	12	4	2	0	1	5	20
5_1000NP	1	2	5	1000	3	5	60
5_1000NP	2	1	5	1000	4	5	80
5_1000NP	3	1	5	1000	4	5	80
5_1000NP	4	3	5	1000	2	5	40
5_1000NP	5	5	5	1000	0	5	0
5_1000NP	6	3	5	1000	2	5	40
5_1000NP	7	5	5	1000	0	5	0
5_1000NP	8	4	5	1000	1	5	20
5_1000NP	9	4	5	1000	1	5	20
5_1000NP	10	4	5	1000	1	5	20
5_1000NP	11	1	5	1000	4	5	80
5_1000NP	12	0	5	1000	5	5	100
5_NP300	1	0	5	300	5	5	100
5_NP300	2	0	5	300	5	5	100
5_NP300	3	0	5	300	5	5	100
5_NP300	4	4	5	300	1	5	20
5_NP300	5	1	5	300	4	5	80
5_NP300	6	4	5	300	1	5	20

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 1)

Treatment	Replicate	Alive per dish	Thiacloprid (µg/L)	Al ₂ O ₃ (mg/L)	Dead per dish	Larvae (inserted)	Mortality per dish (%)
5_NP300	7	2	5	300	3	5	60
5_NP300	8	0	5	300	5	5	100
5_NP300	9	3	5	300	2	5	40
5_NP300	10	2	5	300	3	5	60
5_NP300	11	0	5	300	5	5	100
5_NP300	12	5	5	300	0	5	0
5_thia	1	3	5	0	2	5	40
5_thia	2	2	5	0	3	5	60
5_thia	3	1	5	0	4	5	80
5_thia	4	1	5	0	4	5	80
5_thia	5	0	5	0	5	5	100
5_thia	6	3	5	0	2	5	40
5_thia	7	0	5	0	5	5	100
5_thia	8	1	5	0	4	5	80
5_thia	9	2	5	0	3	5	60
5_thia	10	1	5	0	4	5	80
5_thia	11	3	5	0	2	5	40
5_thia	12	3	5	0	2	5	40
control	1	5	0	0	0	5	0
control	2	5	0	0	0	5	0
control	3	5	0	0	0	5	0
control	4	5	0	0	0	5	0
control	5	4	0	0	1	5	20
control	6	5	0	0	0	5	0
control	7	4	0	0	1	5	20
control	8	4	0	0	1	5	20
control	9	5	0	0	0	5	0
control	10	5	0	0	0	5	0
control	11	5	0	0	0	5	0
control	12	3	0	0	2	5	40
NP_300	1	5	0	300	0	5	0
NP_300	2	5	0	300	0	5	0
NP_300	3	5	0	300	0	5	0
NP_300	4	4	0	300	1	5	20
NP_300	5	5	0	300	0	5	0
NP_300	6	4	0	300	1	5	20
NP_300	7	5	0	300	0	5	0
NP_300	8	5	0	300	0	5	0
NP_1g/L	1	4	0	1000	1	5	20
NP_1g/L	2	4	0	1000	1	5	20
NP_1g/L	3	4	0	1000	1	5	20
NP_1g/L	4	4	0	1000	1	5	20
NP_1g/L	5	5	0	1000	0	5	0

Treatment	Replicate	Alive per dish	Thiacloprid (µg/L)	Al₂O₃ (mg/L)	Dead per dish	Larvae (inserted)	Mortality per dish (%)
NP_1g/L	6	4	0	1000	1	5	20
NP_1g/L	7	5	0	1000	0	5	0
NP_1g/L	8	2	0	1000	3	5	60
NP_1g/L	9	5	0	1000	0	5	0
NP_1g/L	10	5	0	1000	0	5	0
NP_1g/L	11	5	0	1000	0	5	0
NP_1g/L	12	5	0	1000	0	5	0
NP_300	9	5	0	300	0	5	0
NP_300	10	5	0	300	0	5	0
NP_300	11	5	0	300	0	5	0
NP_300	12	5	0	300	0	5	0

Table S2: Raw data. Percentages of living *C. riparius* larvae showing convulsions during exposure (96 h).

Time	TC	NP	No convulsion	Convulsions
24 h	0.5	0	100.00%	0.00%
	1	0	53.33%	46.67%
	2	0	5.00%	95.00%
	5	0	0.00%	100.00%
	0.5	300	100.00%	0.00%
	1	300	60.00%	40.00%
	2	300	2.50%	97.50%
	5	300	0.00%	100.00%
	0.5	1000	100.00%	0.00%
	1	1000	50.00%	50.00%
	2	1000	1.67%	98.33%
	5	1000	0.00%	100.00%
48 h	0.5	0	100.00%	0.00%
	1	0	14.17%	85.83%
	2	0	2.50%	97.50%
	5	0	0.00%	100.00%
	0.5	300	100.00%	0.00%
	1	300	6.67%	93.33%
	2	300	0.00%	100.00%
	5	300	0.00%	100.00%
	0.5	1000	100.00%	0.00%
	1	1000	23.33%	76.67%
	2	1000	0.00%	100.00%
	5	1000	0.00%	100.00%
72 h	0.5	0	100.00%	0.00%
	1	0	0.00%	100.00%
	2	0	0.00%	100.00%
	5	0	0.00%	100.00%
	0.5	300	100.00%	0.00%
	1	300	0.00%	100.00%
	2	300	0.00%	100.00%
	5	300	0.00%	100.00%
	0.5	1000	100.00%	0.00%
	1	1000	0.00%	100.00%
	2	1000	0.00%	100.00%
	5	1000	0.00%	100.00%

Time	TC	NP	No convulsion	Convulsions
96 h	0.5	0	100.00%	0.00%
	1	0	0.00%	100.00%
	2	0	0.00%	100.00%
	5	0	0.00%	100.00%
	0.5	300	100.00%	0.00%
	1	300	0.00%	100.00%
	2	300	0.00%	100.00%
	5	300	0.00%	100.00%
	0.5	1000	100.00%	0.00%
	1	1000	0.00%	100.00%
	2	1000	0.00%	100.00%
	5	1000	0.00%	100.00%

Kapitel 2: Nano-sized zeolites as modulators of thiacloprid toxicity on *Chironomus riparius*

Carla S. Lorenz^{1*}, Anna-Jorina Wicht², Leyla Guluzada³, Barbara Crone⁴, Uwe Karst⁴, Hwa Jun Lee⁵, Rita Triebskorn^{1,6}, Stefan B. Haderlein³, Carolin Huhn², Heinz-R. Köhler¹

¹Institute of Evolution and Ecology, Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, 72076 Tübingen, Germany

²Institute of Physical and Theoretical Chemistry, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany

³Center for Applied Geosciences, Environmental Mineralogy and Chemistry, University of Tübingen, Hölderlinstraße 12, 72074 Tübingen, Germany

⁴Institute of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Münster, Corrensstraße 30, D-48149 Münster, Germany

⁵Center for Ordered Nanoporous Materials Synthesis, Division of Environmental Science and Engineering, POSTECH, Pohang 37673, Korea

⁶Steinbeis Transfer-Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, 72108 Rottenburg, Germany

*Corresponding author; Phone: +49 7071 29 78818; E-mail: lorenz.carla@web.de

Abstract

This study investigated whether zeolites of different size (Y30 (nano-sized) and H-Beta(OH)-III (forming large aggregates/agglomerates composed of 50 nm small primary particles)) exerted acute toxicity on larvae of the non-biting midge, *Chironomus riparius*, and whether such zeolites are able to modulate the toxicity of a common insecticide, thiacloprid, by means of adsorption of a dissolved toxicant. We conducted acute toxicity tests with fourth instar larvae of *C. riparius*. In these tests, larvae were exposed to zeolites or thiacloprid solely, or to mixtures of both compounds. The mixtures comprised 1.0 µg/L thiacloprid in addition to low (5.2 mg/L), medium (18.2 mg/L), and high (391.7 mg/L) zeolite concentrations, resulting in different adsorption rates of thiacloprid. As biological endpoints, changes in mortality rates and in behavior were monitored every 24 h over a total investigation period of 96 h. Furthermore, we conducted chemical analyses of thiacloprid in the medium and the larvae and located the zeolite particles within the larvae by LA-ICP-MS imaging techniques. Our results demonstrate that both types of zeolites did not exert acute toxicity when applied as single-substances, but led to reduced acute toxicity of thiacloprid when applied together with thiacloprid. These results are in line with the sorption properties of zeolites indicating reduced bioavailability of thiacloprid, although our data indicate that thiacloprid can desorb from zeolites to some extent. While freely dissolved (i.e. non-sorbed) fraction of thiacloprid was a good parameter to roughly estimate toxic effects, it did not correlate with measured internal thiacloprid concentrations. Moreover, it was shown that both zeolite types were ingested by the larvae, but no indication for cellular uptake of them was found.

1. Introduction

The toxicity of particles within the nanoscale range has been intensively investigated during the last years, due to their unique properties and industrial benefits. While early studies addressed “colloids” up to 1 μm (Everett 1972) the focus has shifted towards “nanoparticles” with particles sizes of 1–100 nm (e.g. Delay & Frimmel 2012; Hartland *et al.* 2013; Lead & Wilkinson 2006; Nowack & Bucheli 2007; Scown *et al.* 2010). The origin of colloids/nanoparticles can be natural or synthetic (e.g. Delay & Frimmel 2012; Lead & Wilkinson 2006; Navarro *et al.* 2008; Nowack & Bucheli 2007; Oberdörster *et al.* 2005). Particularly synthetic particles have nowadays widespread applications, for example in electronics, personal care products, or pharmaceuticals (e.g. Handy & Shaw 2007; Nowack & Bucheli 2007; Oberdörster 2010; Oberdörster *et al.* 2005; Savolainen *et al.* 2010). Due to the numerous application fields, such particles enter the environment intentionally and unintentionally (e.g. Delay & Frimmel 2012; Maynard 2006; Moore 2006; Navarro *et al.* 2008; Nowack & Bucheli 2007; Wagner *et al.* 2014) and thus potentially may lead to detrimental effects on organisms. For example, nanoparticles were shown to cause stress in biota by inducing reactive oxygen species (Navarro *et al.* 2008; Savolainen *et al.* 2010), by affecting cell membranes (e.g. Bacchetta *et al.* 2012; Moore 2006; Schultz *et al.* 2015) or by increasing the uptake of chemicals by acting as a vehicle (Moore 2006; Nowack & Bucheli 2007; Scown *et al.* 2010). Therefore, nanoparticles became a “hot topic” in ecotoxicology. Generally, risk assessment of colloids/nanoparticles is very complex (e.g. Delay & Frimmel 2012; Handy & Shaw 2007; Maynard 2006; Navarro *et al.* 2008; Oberdörster 2010; Oberdörster *et al.* 2005; Savolainen *et al.* 2010), partly because adequate analytical methods to quantify nanoparticles were scarce. Consequently, little is known about the environmental concentrations and fate of such particles (Delay & Frimmel 2012; Maynard 2006; Navarro *et al.* 2008; Oberdörster 2010; Scown *et al.* 2010). General predictions cannot be made, because since particles - even if chemically identical – may vary in size, surface characteristics or shape, and the herewith related properties (Moore 2006; Navarro *et al.* 2008; Oberdörster 2010; Oberdörster *et al.* 2005; Savolainen *et al.* 2010; Scown *et al.* 2010). Moreover, colloids/nanoparticles can interact with environmental pollutants, other particles or biota (e.g. Delay & Frimmel 2012; Lead & Wilkinson 2006; Navarro *et al.* 2008; Nowack & Bucheli 2007; Savolainen *et al.* 2010; Scown *et al.* 2010).

In our study, we focused on the role of colloids/nanoparticles as sorbents for toxic chemicals. While adsorption to nanoparticles could lead to enhanced exposure and thus toxicity of chemicals, e.g. by colloid-facilitated transport into organisms, adsorption might also cause reduced bioavailability and thus decrease the toxicity of chemicals (Baun *et al.* 2008; Hartland *et al.* 2013; Lead & Wilkinson 2006; Navarro *et al.* 2008; Nowack & Bucheli 2007). In our study, we investigated the effects of adsorption on the toxicity of the neonicotinoid insecticide thiacloprid in the presence of nano-sized zeolites as sorbents. We tested two zeolite types with different particle sizes because the size of the adsorbent might influence the effective toxicity of the adsorbate. Zeolites are highly suitable materials to address these questions as they are strong adsorbents and environmentally relevant due to applications in various

fields, e.g. as catalysts in the chemical industry, as odor control compounds, in (waste-)water treatment to remove organic pollutants and heavy metals and as drug carriers (e.g. Braschi *et al.* 2010; Ellis & Korth 1993; James & Sampath 1999; Lehman & Larsen 2014; Ötker & Akmeahmet-Balcıoğlu 2005; Wang & Peng 2010; Yilmaz & Müller 2009). However, toxicity studies so far mainly focused on micro-sized zeolites, whereas studies on nano-zeolites are scarce (Lehman & Larsen 2014). Consequently, in this study we focused on the acute toxicity of nano-sized, highly sorptive zeolites (Y30 and H-Beta(OH)-III) in the presence and absence of thiacloprid. The tests for acute toxicity were performed with fourth instar larvae of the non-biting midge *Chironomus riparius* in aqueous microcosms with exposure to either suspended zeolites or dissolved thiacloprid or both. The major questions addressed in our study were:

- (1) Do zeolites *per se* affect the mortality rate or the behavior of *C. riparius* larvae under acute exposure?
- (2) Do zeolites affect the toxicity of thiacloprid on larvae of *C. riparius* under acute exposure? If yes, do they act as vehicles and enhance the uptake and thus the acute toxicity of thiacloprid? Or is the bioavailability and, therefore, also the toxicity of thiacloprid reduced?
- (3) Does the particle size of the zeolite sorbents matter?

2. Material and Methods

2.1. Zeolites

Zeolites are microporous, crystalline aluminosilicates, abundant in numerous natural and synthetic modifications with the generalized formula $M_{x/n}[(AlO_2)_x(SiO_2)_y] \cdot z H_2O$ ($n = \text{charge of } M$) (Baerlocher *et al.* 2001). Their framework consists of AlO_4^- and SiO_4^- -tetrahedra with aluminum- and silica-atoms interconnected through oxygen-bridges (Masters & Maschmeyer 2011). Zeolites show a very homogeneous pore size distribution with a high (up to 1000 m²/g) internal pore surface area. Due to their highly microporous structure and structural anionic exchange sites, zeolites serve as cation exchangers and molecular sieves.

The structure of the zeolite Y30 (Thermo Fisher Scientific, USA) is of faujasite type. Faujasite type zeolites consist of sodalite cages and their pores are orthogonal to each-other. The surface area of our Y30 zeolites is 780 m²/g, the SiO₂/Al₂O₃ mole ratio is 30:1 and the pore volume is 0.56 cm³/g (based on N₂ physisorption). The average pore-diameter of Y-type zeolite is 0.74 nm and the size of a unit cell is ~3 nm, depending on Si/Al ratio, concentration of counter-cations and degree of hydration (Scherzer 1978). To obtain nano-sized particles we milled the purchased Y30 particles using a planetary mill (Pulverisette 5; Fritsch GmbH) for 30 min in zirconium oxide beakers using zirconium oxide milling balls of 0.1 mm diameter (Retsch GmbH). After dry sieving through a 0.063 mm grid to recover the milling balls, the milled zeolite was washed thrice in distilled water and methanol and centrifuged

(Herolab HiCen 21) for 10 min at 5000 rpm to eliminate larger particles by sedimentation. Sedimentation time and sedimentation velocity were calculated using Stoke's law (Batchelor 2000).

Beta(OH)-III zeolites were synthesized at the Center for Ordered Nanoporous Materials Synthesis, POSTECH (Korea). The reagents for the Beta(OH)-III zeolites synthesis included tetraethylammonium hydroxide (TEAOH, 35 % aqueous solution, Aldrich), aluminum metal (99.5 %, Alfa Aesar), and fumed silica (100 %, Degussa). The aluminum metal source was first mixed with a solution of TEAOH in water. Then, fumed silica was added to this mixture. The chemical composition of the synthesis mixtures used here was $43.2\text{TEAOH}\cdot 0.8\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 80\text{SiO}_2\cdot 1200\text{H}_2\text{O}$ (Cambor *et al.* 1998). After stirring at room temperature for 24 h, the synthesis mixture was loaded into a Teflon-lined 45 mL autoclave and heated at 140 °C for 6 d with agitation (60 rpm) under autogenous pressure. The solid products were then recovered by centrifugation (15,000 rpm for 10 min), washed repeatedly with distilled water, and dried overnight at room temperature. The resulting particles with a size of 50 nm were calcinated in air at 500 °C for 8 h to remove residues of the organic template TEAOH and were refluxed twice in 1 mol/L ammonium nitrate aqueous solution at 80 °C for 6 h. After a secondary calcination in air at 550 °C for 2 h the particles (H-Beta(OH)-III) were obtained for further tests.

Particle sizes of both zeolites were measured by a laser diffraction method in aqueous suspension. Zeolites were dispersed in MilliQ water (MilliQ, academic, Filter: Millipak 40 gamma gold 0.22 μm) via ultrasonication (2 min) and analyzed in a Mastersizer 2000 (Malvern Instruments) with a Hydro 2000 S dispersing module (Malvern Instruments). We measured the particle size distributions of purchased Y30 particles, milled Y30 particles, Y30 particles after milling and settling, Beta(OH)-III particles and calcinated H-Beta(OH)-III particles. Moreover, we characterized the milled Y30 particles in the supernatant after sedimentation and calcinated H-Beta(OH)-III particles by SEM images using a Hitachi SU 8030 scanning electron microscope, operated at an accelerated voltage of 1 kV. For this purpose, samples were sonicated in ethanol before they were transferred to the surface of a silicon wafer.

To evaluate the sorption characteristics and to calculate the K_d -value of Y30, batch experiments using aqueous suspensions of zeolites and dissolved thiacloprid were conducted at controlled conditions in compliance with exposure conditions of the acute toxicity test. Thiacloprid (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 and 30 mg/L) and Y30 (0.1 and 0.25 g/L) in 0.1 mM KCl were equilibrated on an overhead shaker. Experiments were conducted at pH 7 without adding buffers, and each sample was prepared in triplicates. After 12 h of shaking, samples were centrifuged at 6240 g (Heraeus Megafuge 1.0 R Centrifuge, Thermo Fisher, at 6000 rpm for 10 min). The supernatant was transferred to 1.5 mL autosampler glass vials and was analyzed using HPLC-UV (isocratic mode; mobile phase: MeOH 60 %/H₂O 40 %; retention time of thiacloprid: 5 min 36 s). To determine the sorption kinetics, samples were taken and analyzed at different times (ranging from 1 min to 48 h). The extent of adsorption was calculated by a mass balance based on the difference of the initial and equilibrated aqueous thiacloprid concentrations. The sorption isotherms and the sorption coefficient (K_d -value,

which gives the ratio between sorbed thiacloprid concentration and the concentration of thiacloprid in water. High K_d -values indicate that more thiacloprid is bound to the particles, which means higher sorption) of thiacloprid at Y30 was than calculated by taking an average of triplicates.

2.2. Test concentrations and preparation of test solutions

We chose three concentrations of Y30 zeolite (low, medium and high) to obtain 30, 60 or 97 % sorption of the total thiacloprid, as calculated by the following equation:

$$r_{sw} = \frac{\frac{1}{f_w} - 1}{K_d}$$

(eq. 1)

Where

r_{sw} – concentration of adsorbent (mass of sorbent per volume of aqueous phase)

f_w – fraction of the adsorbate present in the water phase

K_d – distribution coefficient

Thus, the applied zeolite concentrations were 5.2 mg/L (low), 18.2 mg/L (medium) and 391.7 mg/L (high), respectively, and we used these concentrations (± 5 % handling variability) also for the experiments with H-Beta(OH)-III particles. For each of the two zeolite sorbents, we tested the three particle concentrations solely, as well as in mixtures with 1.0 $\mu\text{g/L}$ thiacloprid. Moreover, the effects of 1.0 $\mu\text{g/L}$ thiacloprid solely were assessed and a control treatment with filtered and dechlorinated tap water (filtered by iron and active carbon filter) was run simultaneously. Consequently, eight different treatments were tested within one experiment, with $n = 15$.

Test concentrations were prepared with filtered and dechlorinated tap water directly before the experiment started. A stock solution of 5.0 mg/L thiacloprid (analytical standard, Sigma Aldrich, Germany) in demineralized water was prepared prior to testing and was stirred overnight in the dark at 7 °C. Y30 zeolites were available in an aqueous stock suspension of 2.32 g/L zeolites dispersed in aqua dest.. This stock suspension was stirred via ultrasonication (15 min) before it was diluted to test concentrations. H-Beta(OH)-III zeolites suspensions were prepared directly from dry zeolite powder and were dispersed in the test medium by ultrasonication (15 min). After setting up the test concentrations for the experiments, all dispersions were left to rest for 1 h to allow adsorption of thiacloprid to zeolites in the mixture treatments.

2.3. Maintenance of *Chironomus riparius*

Chironomus riparius (Diptera, Chironomidae) belongs to one of the most abundant insects in freshwater systems and is of high ecological relevance (Armitage *et al.* 1995; Langer-Jaesrich *et al.* 2010). Larvae of this species are sediment-dwelling and feed on detritus (Armitage *et al.* 1995). Moreover, this midge

is a well-established model organism in ecotoxicology (e.g. OECD 2004a; OECD 2004b; OECD 2010; OECD 2011) and toxic effects of thiacloprid on this organism have been described already (Langer-Jaesrich *et al.* 2010; Lorenz *et al.* 2017).

The animals of our study originated from a stock culture established at our laboratory at the University of Tübingen (Germany), originating from a *C. riparius* larvae stock obtained from Goethe University Frankfurt/Main (Germany) in 2013. The animals were kept in a climate chamber at a temperature of 21.0 ± 0.5 °C and a light dark cycle of 16:8 h. Larvae were reared in basins (30 x 55 x 12 cm), containing a 3 cm thick layer of fine quartz sand (particle size: 0.1-0.3 mm) and filtered and dechlorinated tap water with a continuous, gentle aeration. They were fed every second day with ground TetraMin® fish flakes (Tetra, Germany), and 50 % of the water volume was changed once per week. Moreover, all basins were covered by breeding cages (55 x 65 x 120 cm; mesh material with a mesh size of 0.5 mm²) to allow swarming and mating of adult midges.

2.4. Acute toxicity test

Test vessels (glass, diameter: 7.0 cm, height: 6.5 cm) were saturated overnight with the corresponding test solution, even though only low, if any, adsorption of thiacloprid on glass was expected due to the chemical properties of this compound. Earlier studies under the same experimental conditions did not reveal any adsorption of thiacloprid to glass (Lorenz *et al.* 2017). As glass (SiO₂) is slightly negatively charged at the pH applied (7.8 ± 0.2) we also exclude the zeolites (zeta potential Y30: -42 mV; Beta(OH)-III. -40 mV) to bind the surface of the vessels. Subsequently, the test vessels were emptied before 30 g (dry wt.) fine quartz sand (SiO₂, particle size: 0.1-0.3 mm; adsorption of zeolites and thiacloprid was negligible for the above-mentioned reasons) and 100 mL of the respective test solution were filled into them. Prior to filling the vessels, all dispersions and solutions were stirred by ultrasonication for 15 min before they were partitioned. So, zeolites were supposed to be equally distributed within the dispersions and, consequently, also in test vessels. To adjust the temperature of the test dispersions/solutions to those of the breeding basins, we incubated the test vessels for 2 h in the climate chamber before the temperature of the medium was measured and larvae were added. Five individuals of fourth instar larvae of *C. riparius* were added to each test vessel using a blunt glass pipette. The test vessels were covered with perforated Parafilm® (Carl Roth GmbH, Germany) to minimize evaporation and placed in a random arrangement on a desk within the climate chamber. Larvae were exposed for 96 h and no food was added to avoid potential interactions between food and test substances. Every 24 h we checked the test vessels and collected data on mortality (i.e., the absence of movement up to 30 s after gentle stimulation, or untraceable larvae) and on behavioral disruption, i.e., convulsions correlated with the disability to bury themselves into the sediment. Moreover, we removed dead animals to avoid contamination of the test vessels by carcass decomposition products. Our criterion for test validity was a mortality rate of ≤ 10 % in the control.

2.5. Chemical analyses

Thiacloprid analyses were conducted for water samples and larvae. The medium was analyzed to determine whether actual and nominal aqueous thiacloprid concentrations matched, and to confirm adsorption of thiacloprid to zeolites. For each tested concentration, one replicate was analyzed. Water samples were taken from the exposure experiments directly before larvae were introduced (0 h) and, additionally, at the end of the exposure (96 h). The samples were stored in 1.5 mL Eppendorf tubes (Eppendorf, Germany) at -18 °C. Prior to analysis, samples were centrifuged at 3000 rpm for 3 min, and 1.0 mL supernatant was filtered through a PTFE syringe filter (pore size 0.45 µm, Chromafil, Macherey-Nagel, Germany). Thiacloprid concentrations were quantified by LC-MS. Internal thiacloprid concentrations of *C. riparius* larvae were determined for surviving individuals after termination of the exposure experiment. Animals originated from all treatments, excluding those which were exposed to zeolites solely. Moreover, larvae were analyzed both with gut contents (these larvae were frozen directly in liquid nitrogen after the termination of the exposure) as well as with depleted guts. For gut depletion, larvae were transferred to one Petri dish per treatment which was filled with 150 mL filtered and dechlorinated tap water after termination of the exposure experiment. Petri dishes were partially wrapped in aluminum foil to reduce light-induced stress (Hirabayashi & Wotton 1998). Under these conditions, the larvae were allowed to empty their guts for 24 h, subsequently frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. To quantify thiacloprid within the larvae, a liquid-liquid extraction method was developed based on the QuEChERS extraction procedure that originally was used in food analysis but recently adjusted to analyze environmental samples and biota (Anastassiades *et al.* 2003; Berlioz-Barbier *et al.* 2014). For sample extraction and cleanup, 10-30 mg of frozen larvae tissue was homogenized in liquid nitrogen with a Micro-homogenizer (Carl Roth GmbH, Germany) in a 2.5 mL tubes (Eppendorf, Germany). A volume of 20 µL deuterated internal standard thiacloprid-D4 in methanol (Sigma-Aldrich, USA) was added, resulting in a final concentration of 8.0 µg/L in the analyzed sample. Subsequently, 0.5 mL water (chromasolv, Sigma-Aldrich, USA) and 0.5 mL acetonitrile were added, and the sample was shaken for 20 s using a Vortex mixer. After addition of 25 mg NaCl (Sigma-Aldrich, USA) and 75 mg anhydrous MgSO₄ (Sigma-Aldrich, USA) the sample was immediately shaken for 20 s using a Vortex mixer and centrifuged for 2 min at 10000 rpm. A volume of 0.5 mL of the acetonitrile phase was transferred to 12 mg primary-secondary amine (PSA, Agilent technologies, Germany) and 90 mg anhydrous MgSO₄, then shaken for 20 s and centrifuged for 2 min at 10000 rpm. The supernatant was concentrated in a nitrogen stream at room temperature, and the residue was reconstituted in 250 µL methanol and filtered with a PTFE syringe filter (pore size 0.45 µm, Chromafil Macherey-Nagel, Germany). Also these samples were analyzed by LC-MS.

For LC-MS analysis, a 1260 Infinity LC system coupled to a 6550 iFunnel QTOF LC/MS system (Agilent Technologies, Germany) was used. Aliquots of 10 µL were injected onto a Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 x 150 mm, 3.5-Micron, narrow bore, Agilent Technologies, USA) with a narrow bore guard column (2.1 x 12.5 mm, 5-Micron, Agilent Technologies). A jetstream electrospray ionization

(ESI) source was operated with a nebulizer pressure of 35 psig, drying gas temperature of 160 °C, a flow rate of 16 L/min, and a fragmentor voltage of 360 V. In the positive mode, capillary voltage was set to -4000 V, skimmer voltage to 65 V, and the nozzle voltage to -500 V. The mass range was 80-1200 m/z with a data acquisition rate of 1 spectrum/s. The sheath gas temperature was set to 325 °C with a flow rate of 11 L/min. For internal calibration, purine and HP0921 (Agilent Technologies, USA, m/z = 121.0508, 922.0097) were used, the mass range was set to 50 ppm. A gradient elution was performed at a flow rate of 0.3 mL/min using water and methanol both containing 0.1 % formic acid. The initial content of 95 % water was decreased after 1 min to 5 % water over 7 min and, after another 7 min at 5 %, increased to 95 % water over 30 s.

Data analysis was performed with MassHunter software (Agilent Technologies, USA). For quantification of water-samples, a calibration curve in the range of 0.2-10 µg/L thiacloprid was used ($r^2 = 0.9991$), the limit of detection was 0.2 µg/L. Thiacloprid concentrations in larvae were calculated based on peak area of the deuterated internal standard of 8.0 µg/L and the limit of detection was 1.0 µg/L.

2.6. LA-ICP-MS imaging

To verify ingestion of zeolites by the larvae, LA-ICP-MS imaging techniques for the detection of aluminum within thin sections of larvae were used. Therefore, 10 surviving larvae, exposed to the highest zeolite concentrations or the control, were fixed in 2 % glutardialdehyde (Sigma Aldrich, Germany) buffered in 0.005 M cacodylate (sodium cacodylate trihydrate, pH 7.4, Sigma Aldrich, Germany). Fixed larvae were stored at 4 °C for at least one week. Afterwards, samples were de-calcified in 5 % TCA (trichloroacetic acid, ≥ 99 % p.a., Carl Roth GmbH, Germany) in formol (37 % p.a., stabilized with methanol, Carl Roth GmbH, Germany), dehydrated with ethanol and routinely processed for Technovit® embedding (Technovit® 7100, Heraeus Kulzer GmbH, Germany). Embedded samples were cut by a rotation microtome (Leica RM2265, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany) into sections of 7 µm thickness which were used for LA ICP MS imaging experiments. These were performed with the LA system LSX 213 G2⁺ (CETAC Technologies, USA) incorporating a frequency quintupled Nd:YAG laser with a wavelength of 213 nm and equipped with Chromium 2.2 software. The laser system device was coupled to a triple quadrupole based inductively coupled plasma mass spectrometer (iCap TQ, Thermo Fisher Scientific, Germany). The LA parameters relating to spot size, scanning speed, laser energy and carrier gas flow were optimized based on the best signal-to-noise ratio in combination with highest spatial resolution. The samples were ablated using a line by line scan with a laser energy density of 7,55 J/cm², 20 Hz laser shot frequency, 50 µm spot size and 250 µm/s scan speed. The aerosol was transported to the ICP with a carrier gas of helium (0.45 L/min) passing the ablation chamber. For maximum sensitivity and to minimize possible interferences, the measurement was performed in kinetic energy discrimination mode (KED) with helium as cell gas. ²⁷Al was monitored with dwell times of 0.1 s. Data evaluation was performed using the software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

2.7. Data analyses

A generalized linear mixed model (GLMM) with binary data distribution was used, with the Petri dish identity as a random factor. The statistics were done with “R” (R Development Core Team 2017) and an α -level set to 0.05. SigmaPlot 13 (Systat Software) was used to plot graphs.

3. Results

3.1. Zeolite characteristics

The results of the particle size measurements by laser diffraction in the aqueous phase are shown in Table 1. As expected, the sizes of Y30 particles decreased with the processing of the particles and matched well with the SEM results (Figure 1 A). The measured particle size of Beta(OH)-III zeolites, however, was several micrometers. Although calcination reduced the particle size or aggregation/agglomeration, the particles were much larger than 50 nm, the reported particle size of Beta(OH)-III zeolite primary particles.

Table 1: Particle size distribution of differently processed Y30 zeolites and Beta(OH)-III zeolites, obtained by laser diffraction measurements. d_{10} , d_{50} and d_{90} are particle size distribution parameters, indicating that 10, 50 or 90 % [v/v] of all particles were smaller or equal to the indicated size.

	d_{10} [nm]	d_{50} [nm]	d_{90} [nm]
Commercial Y30	1,082	2,772	5,838
Y30 milled	603	1,552	4,401
Y30 milled, supernatant after settling^a	202	441	691
Beta(OH)-III (non-calcinated)	3,700	21,500	108,500
H-Beta(OH)-III (calcinated)^a	4,100	9,200	20,900

Notes: ^a the particles which were used in the acute toxicity tests

The comparison of Y30 and H-Beta(OH)-III zeolites in SEM measurements revealed that Y30 zeolites, processed by milling and sedimentation, formed single primary particles (Figure 1 A). In contrast, H-Beta(OH)-III formed much larger aggregates/agglomerates of primary particles (Figure 1 B).

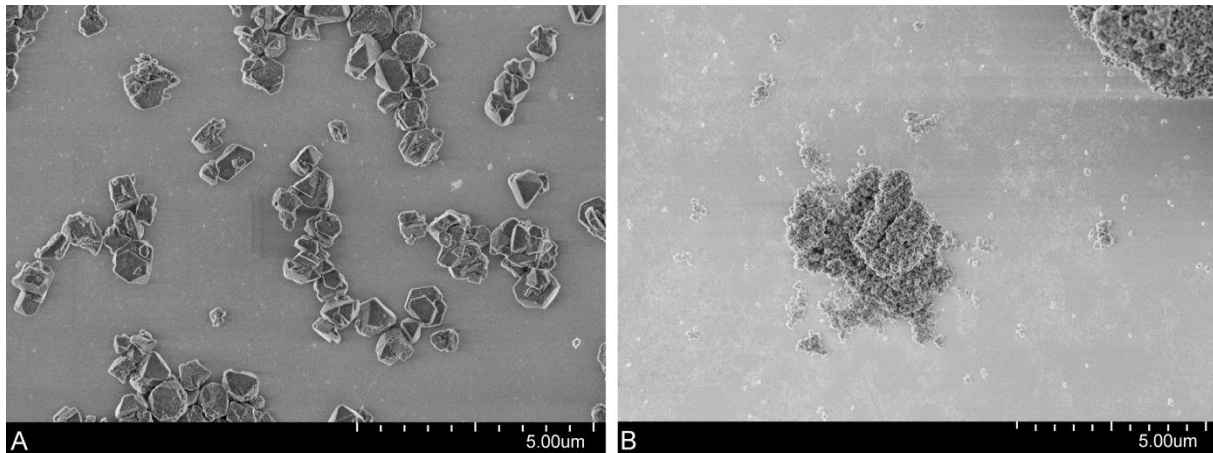


Figure 1: SEM images.

A) Y30 zeolites (after milling and settling) and **B)** calcinated H-Beta(OH)-III zeolites.

The sorption experiments showed that sorption of thiacloprid on Y30 was strong and followed the Langmuir isotherm model. The K_d -value at low concentrations within the linear range of the sorption isotherm was 82500 L/kg.

3.2. Chemical analyses

The chemical analyses of the medium revealed the thiacloprid concentrations did not differ between the start and the end of the experiment. Moreover, it was shown that both zeolite types strongly adsorbed thiacloprid. Y30 particles in the toxicity assays adsorbed thiacloprid in the predicted manner, hence, the concentration of thiacloprid in mixtures was below the detection limit ($< 0.2 \mu\text{g/L}$) when high Y30 concentrations were added (97 % adsorption was calculated), at $0.5 \mu\text{g/L}$ when the medium Y30 concentration was added (60 % adsorption was calculated) and at $0.65 \mu\text{g/L}$ for the lowest Y30 concentration (30 % adsorption was calculated). H-Beta(OH)-III particles, however, adsorbed thiacloprid to a much higher extent, so that dissolved thiacloprid was not detectable in all mixture experiments containing H-Beta(OH)-III zeolites. When applied solely, the thiacloprid concentration was $1.0 \pm 0.09 \mu\text{g/L}$.

The concentrations of thiacloprid associated with larval tissue were similar for all larvae exposed to thiacloprid, solely or in mixtures ($58.41 \text{ ng/g} \pm 14.42 \text{ ng/g}$ (wet weight) on the average), irrespective of the zeolite type added or the presence of gut contents in the sample.

3.3. Acute toxicity test

In general, control animals did not show any anomalies in behavior, and the average mortality rate was $4 \pm 8 \%$ (Figure 2 and Figure 3). Consequently, the criterion of validity (mean mortality $\leq 10 \%$ in the control) was met. Moreover, both zeolites, applied as single substances, did not lead to behavioral

disorders. In contrast, larvae exposed to thiacloprid as single compound or to mixtures with low or medium Y30 concentrations displayed behavioral impairments (Figure 2). However, behavioral changes were found to be delayed in a concentration-dependent manner of Y30. Moreover, larvae exposed to the treatment with the highest Y30 concentration and, thus, highest sorption of thiacloprid did not show any behavioral disruption.

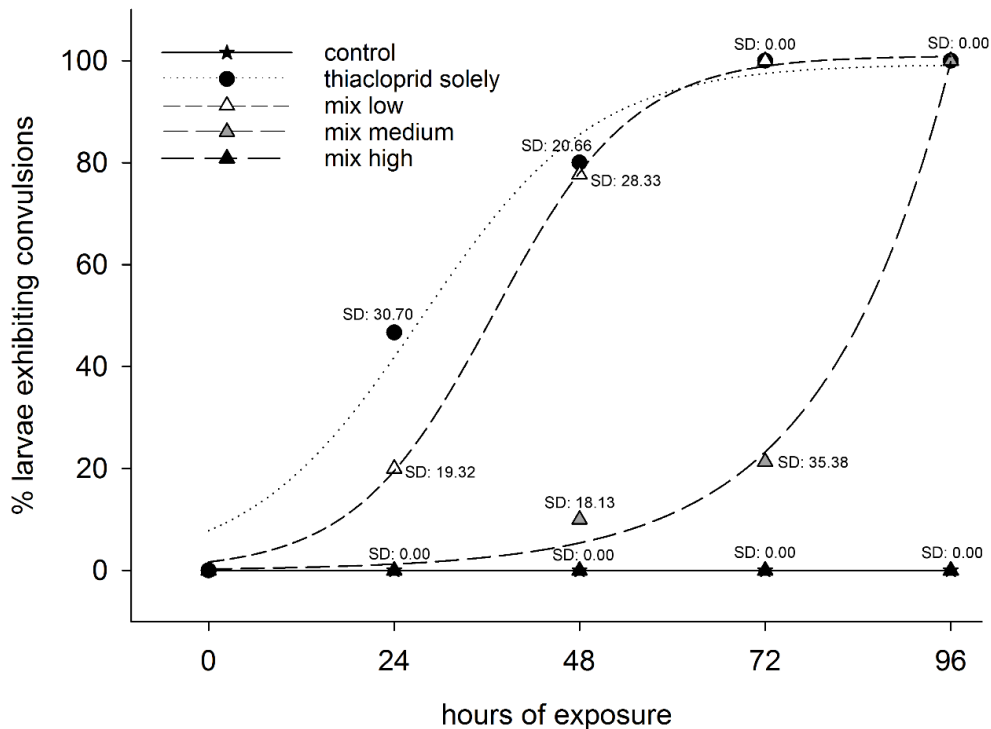


Figure 2: Behavioral disorders.

Best fitting curves, representing the percentages of living *C. riparius* larvae exhibiting convulsions in the experiment with Y30 zeolite. Animals were exposed to dechlorinated and filtered tap water as control, to 1.0 µg/L thiacloprid solely, or in mixtures with low, medium or high Y30 concentrations (per test vessel, n = 15).

In the experiment with H-Beta(OH)-III particles, no animals with behavioral disorders were observed. Experiments with thiacloprid solely showed an almost identical increase of convulsions over time as larvae of the identical treatment type in the experiment with Y30 did.

Mortality predominantly occurred between 72 and 96 h of exposure. In the experiment with Y30, we did not find any statistical differences between animals exposed to Y30 solely and the control (GLMM, df = 3, F = 0.5351; p-values for comparisons between the control and low Y30 concentration: 0.676, medium concentration: 0.467, high concentration: 0.676). Nevertheless, larvae exposed to thiacloprid, solely or in the mixtures that comprised low and medium Y30 concentrations, suffered from significantly increased mortality rates compared to the control or the mixture with the highest Y30 concentration, but were not significantly different from one another (GLMM, df = 4, F = 10.849; p-values for the comparison between the control and thiacloprid solely, mix low and mix medium: < 0.001, mix high: 0.4162; p-values for the comparisons between thiacloprid solely and mix

low: 0.4314, mix medium: 0.0819, mix high: < 0.001; p-values for the comparison between mix high and mix low, mix medium and thiacloprid solely: < 0.001). However, the mean mortality rate decreased with increasing zeolite concentration (Figure 3 A). Larvae exposed to the mixture with the highest Y30 concentration showed a low mortality rate that did not differ to the control.

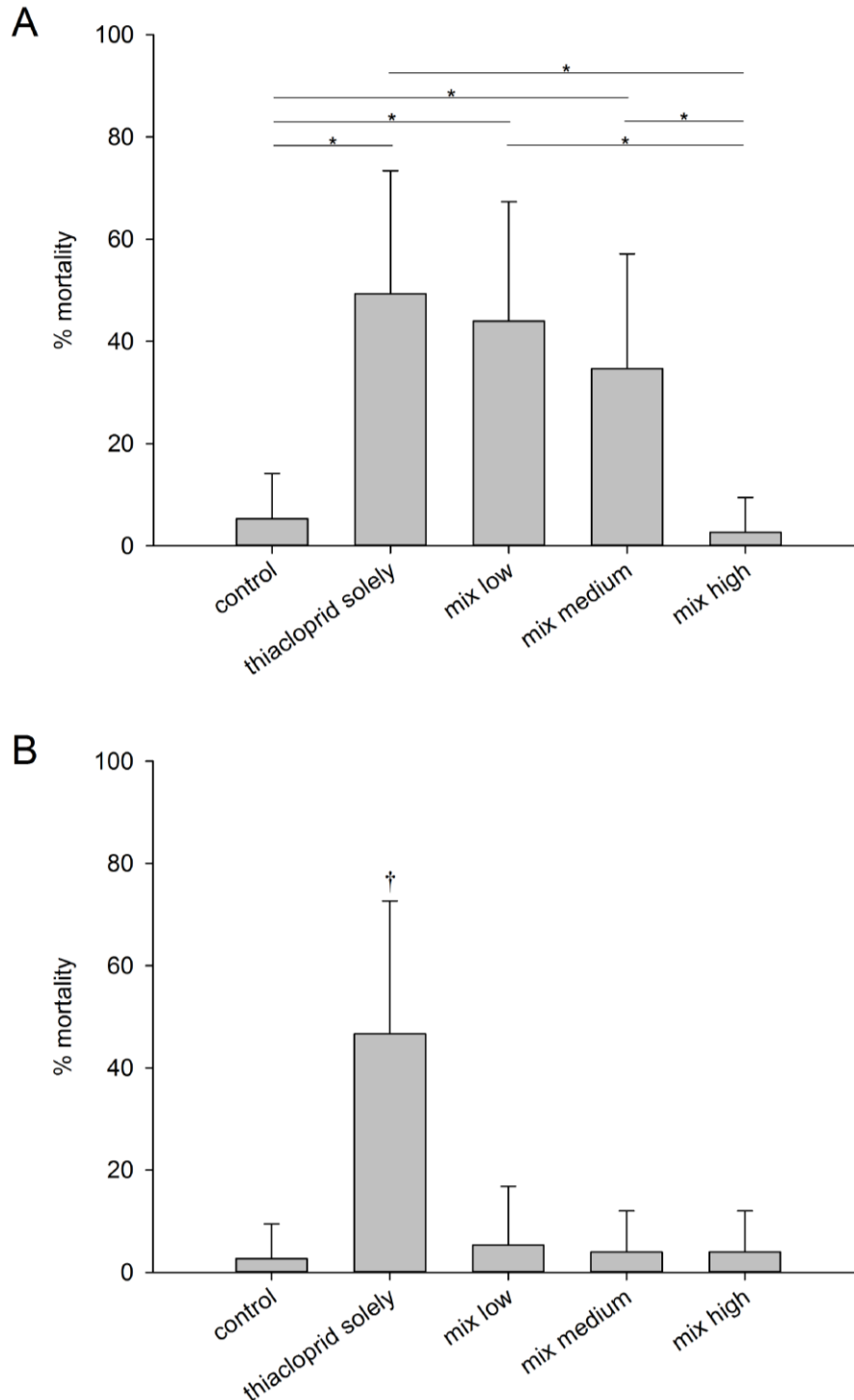


Figure 3: Mortality rates.

Means mortality rates \pm SD of *C. riparius* larvae per test vessel (n = 15) after exposure for 96 h to control conditions, to 1.0 $\mu\text{g/L}$ thiacloprid solely, or to 1.0 $\mu\text{g/L}$ thiacloprid in addition of low, medium and high concentrations of zeolites. **A)** Experiment with Y30 zeolites. Asterisks (*) mark $p \leq \alpha$. **B)** Experiment with H-Beta(OH)-III zeolites. The cross (†) marks the treatment group that showed significant differences vs. all other treatments.

Likewise, no statistical differences between animals solely exposed to H-Beta(OH)-III zeolites and the control were found (GLMM, $df = 3$, $F = 0.3354$; p values for comparisons between the control and low H-Beta(OH)-III concentration: 1.0; medium concentration: 0.651, high concentration: 0.414). In further analyses, it was shown that the mortality rate of larvae exposed to the mixtures of thiacloprid and H-Beta(OH)-III did not differ from the control as well. In the contrary, animals exposed solely to 1.0 $\mu\text{g/L}$ thiacloprid exhibited significantly higher mortality rates than larvae exposed to the mixtures or the control (GLMM, $df = 4$, $F = 13.488$; p -value for the comparison between the control and thiacloprid solely: < 0.001 , mix low: 0.433, mix medium: 0.660 and high: 0.660; p -values for all comparisons between thiacloprid solely and all three mixtures was < 0.001 ; Figure 3 B).

3.4. LA-ICP-MS imaging

To evaluate whether zeolites were taken up by the larvae, LA-ICP-MS imaging technology with aluminum as marker for zeolites was used. The distribution of aluminum within the larvae confirmed that both zeolites were ingested by the larvae and were widely present in the gut lumen (Figure 4). However, there was no indication that zeolites were taken up by the tissues of the organism, not even by the resorptive gut epithelium.

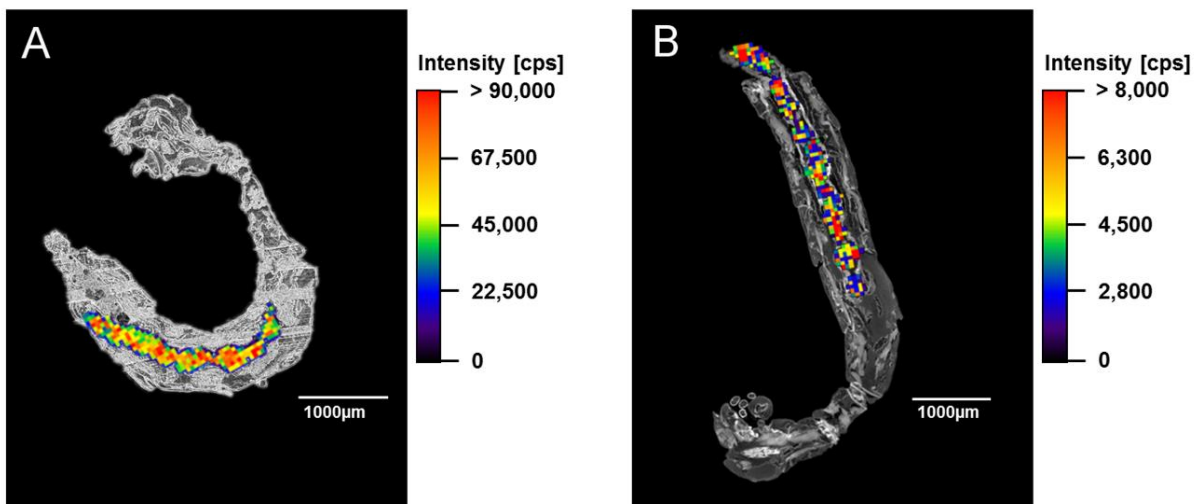


Figure 4: LA-ICP-MS analyses.

Overlay of images of a 7 μm thick section of a *C. riparius* larva exposed to the highest zeolite concentration solely and LA-ICP-MS images, which show the distribution of aluminum within the larva. **A)** Larva exposed to Y30 zeolites. **B)** Larva exposed to H-Beta(OH)-III zeolites.

As expected, larvae of the control did not show any aluminum-containing particles in the gut lumen or in any tissue.

4. Discussion

The purpose of this study was to assess the acute toxicity of two nano-zeolites and to test whether adsorption of the insecticide thiacloprid to these zeolites alters its acute toxicity. Since the main scope was on the possible interactions between thiacloprid and zeolites and not particularly on the assessment of distinct field situations, we did not use environmentally relevant concentrations, particularly for the nanoparticles.

Our results showed that both nano-zeolites, even in the rather high test concentration, did not affect the chosen endpoints when applied solely. This is in accordance with published toxicity studies on larger zeolites, for which save applications (e.g. in water remediation) have been shown (Lehman & Larsen 2014). Unfortunately, and contrary to our expectations, H-Beta(OH)-III particles could not be tested in their nano-sized form, since the small primary particles formed rather large aggregates/agglomerates in aqueous dispersions. Such formation of aggregations or agglomerations is a common issue in various studies dealing with colloids/nanoparticles and thus an additional challenge in exposure assessment (Savolainen *et al.* 2010; Schultz *et al.* 2015). In our case, we additionally expect that the H-Beta(OH)-III aggregates/agglomerates increased in size with time of exposure and thus assume that larvae were gradually exposed to smaller aggregates/agglomerates during the beginning of the experiment (due to previous ultrasonication) and to larger aggregates/agglomerates at the end of the exposure phase. Consequently, larvae have to be considered to be exposed to varying sizes of H-Beta(OH)-III particles with time, but some of these particles were neither nanoparticles, nor colloids. Consequently, since the size of primary particles is less important than the sizes of the aggregations (Seipenbusch *et al.* 2010), it is highly likely that the large sizes of the aggregates/agglomerates impaired possible cell uptake or, at least, largely reduced its probability. In fact, no cellular uptake of zeolite particles was detected by LA-ICP-MS, neither for nano-sized Y30 nor for the larger H-Beta(OH)-III particles, even though zeolites were definitely ingested by the larvae. The ingestion of zeolites by larvae is very plausible, since the zeolites deposit on the substratum – larger particle aggregates faster than smaller single crystal particles (e.g. Schultz *et al.* 2015; Scown *et al.* 2010) – and thus can be incorporated by the sediment-dwelling and detritus-feeding larvae of *C. riparius* (Armitage *et al.* 1995). Although we found no indication that these ingested particles exerted any toxic effect the results might be different under chronic exposure conditions. For example, Zhu *et al.* (2010) showed that TiO₂ nanoparticles accumulated in the intestinal tract of *Daphnia magna* and these animals were unable to empty their guts in the usual time. Therefore, Zhu *et al.* (2010) hypothesized negative impacts of this nanoparticle accumulation, e.g. on growth rate or reproduction, under long-time exposure. So, we cannot exclude such effect for chronically exposed chironomid larvae as well.

In contrast to the tested zeolites, thiacloprid, applied as a single substance, affected both investigated biological endpoints significantly in both experiments. Specifically, thiacloprid led to heavy convulsions of larvae (associated with the inability of burying themselves into the sediment) and an increased mortality rate. Both effects, convulsions and mortality of larvae, can be assigned to the mode of action

of thiacloprid, which stimulates the insect's nervous system by acting as agonist of the nicotinic acetylcholine receptor (Elbert *et al.* 2008), and have been already described in former studies (e.g. Langer-Jaesrich *et al.* 2010). Furthermore, our results corroborate the findings of a previous study by Lorenz *et al.* (2017), where, among others, fourth instar larvae of *C. riparius* were exposed to 1.0 µg/L thiacloprid in an identical experimental setup. However, although the same thiacloprid concentration was used in the mixture experiments, we found that Y30 zeolites reduced the acute toxic effects of thiacloprid in a concentration-dependent manner, and that all animals exposed to mixtures including H-Beta(OH)-III did not show any increased mortality or behavioral impairment compared to the control. Our results suggest that the investigated zeolites do not act as a vehicle for transporting thiacloprid into the cells of *C. riparius* larvae, and that the different size of the particles does not have any effect in the tested size range. We furthermore conclude that the insecticide's toxicity decreased due to the lower bioavailability of thiacloprid caused by adsorption, as the results of the acute toxicity tests correlate well with the measured equilibrium concentrations of aqueous dissolved thiacloprid. A reduction in the toxicity of chemicals caused by adsorption on particles is well documented in the literature (e.g. Knauer *et al.* 2007; Koelmans *et al.* 2006). For example, Baun *et al.* (2008) have demonstrated that nano-C₆₀ particles sorb pentachlorophenol (PCP) significantly, which leads to reduced toxicity of PCP on *Daphnia magna* when the animals were exposed to both substances simultaneously. Furthermore, several studies described adsorption of chemicals on zeolites (e.g. Braschi *et al.* 2010; Ellis & Korth 1993; Ötöker & Akmeşmet-Balciođlu 2005) and, for instance, James & Sampath (1999) have reported a decrease cadmium concentrations in water and fish (*Oreochromis mossambicus*) in the presence of zeolites. However, the mortality rate of larvae exposed to a mixture of thiacloprid and medium Y30 concentrations was higher than expected on the basis of a previous study (Lorenz *et al.* 2017). There, larvae had been exposed, amongst other concentrations, to 0.4 µg/L thiacloprid in an identical experimental setup, which resulted in a mortality rate of approximately 13 %. Furthermore, no behavioral impairments were observed. In the present study, medium concentrations of Y30 lead to a similar aqueous thiacloprid concentration, but the mortality rate was roughly 2.5-times higher and all larvae showed abnormal behavior after 96 h of exposure. This disparity indicates that thiacloprid might desorb from the nanoparticles to some minor extent under the different physicochemical conditions in the lumen of the intestinal tract. However, the amount of desorbed thiacloprid must have been too low to cause negative effects when a greater portion of thiacloprid was adsorbed in the experiment with high Y30 concentrations. Our conclusion that thiacloprid desorbed from zeolites in the gut lumen is also supported by the chemical analyses of the larvae's internal thiacloprid concentrations. Here, similar internal thiacloprid concentrations were found in all animals - irrespective of the zeolite type or concentration they were exposed to and irrespective of whether they had been allowed to defecate or not. In this context, we feel that further research is needed to explain this uniformity in the internal pesticide concentrations, particularly since it has been shown that the toxicity of thiacloprid on *C. riparius* can also be reduced/delayed by non-adsorbing particles (Lorenz *et al.* 2017).

In our study, we have documented the mechanistic basis for the reduced acute toxicity of thiacloprid when interacting with zeolites. In the future, chronic effects of both nano-zeolites used in this study should be tested to draw conclusions about their ecotoxicity. Further studies should also investigate the protective effects of zeolites in environmentally relevant concentrations, even though the quantification of these concentrations still remains a challenging issue. However, due to the high adsorption capacity that zeolites can have, measurable effects of realistic zeolite concentrations present in the environment might be likely.

Acknowledgements

We thank Leilei Luo, Reiner Anwander, Yucang Liang, Martin Pattky, Christian Zwiener, Sylvain Merel, Boris Bugsel, Klaus Roehler, Sandra Dietz, Elisabeth Früh, Sang Hyun Ahn, and Suk Bong Hong for discussions, helping advice, and support. We also thank Miriam Langer for reviewing this manuscript and for her constructive comments.

References

- Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, and Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international* 86:412-431.
- Armitage PD, Cranston PS, and Pinder LCV. 1995. *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. London: Chapman & Hall.
- Bacchetta R, Santo N, Fascio U, Moschini E, Freddi S, Chirico G, Camatini M, and Mantecca P. 2012. Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. *Nanotoxicology* 6:381-398.
- Baerlocher C, Olson D, and Meier W. 2001. *Atlas of Zeolite Framework Types*: Elsevier.
- Batchelor GK. 2000. *An introduction to fluid dynamics*: Cambridge university press.
- Baun A, Sørensen SN, Rasmussen R, Hartmann NB, and Koch CB. 2008. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C₆₀. *Aquatic Toxicology* 86:379-387.
- Berlitz-Barbier A, Buleté A, Faburé J, Garric J, Cren-Olivé C, and Vulliet E. 2014. Multi-residue analysis of emerging pollutants in benthic invertebrates by modified micro-quick-easy-cheap-efficient-rugged-safe extraction and nanoliquid chromatography–nanospray–tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A* 1367:16-32.
- Braschi I, Blasioli S, Gigli L, Gessa CE, Alberti A, and Martucci A. 2010. Removal of sulfonamide antibiotics from water: Evidence of adsorption into an organophilic zeolite Y by its structural modifications. *Journal of hazardous materials* 178:218-225.

- Cambolor M, Corma A, and Valencia S. 1998. Characterization of nanocrystalline zeolite Beta. *Microporous and Mesoporous Materials* 25:59-74.
- Delay M, and Frimmel FH. 2012. Nanoparticles in aquatic systems. *Analytical and bioanalytical chemistry* 402:583-592.
- Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W, and Nauen R. 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest management science* 64:1099-1105.
- Ellis J, and Korth W. 1993. Removal of geosmin and methylisoborneol from drinking water by adsorption on ultrastable zeolite-Y. *Water Research* 27:535-539.
- Everett D. 1972. Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units, appendix II: Definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry. *Pure and Applied Chemistry* 31:577-638.
- Handy RD, and Shaw BJ. 2007. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk & Society* 9:125-144.
- Hartland A, Lead JR, Slaveykova V, O'Carroll D, and Valsami-Jones E. 2013. The environmental significance of natural nanoparticles. *Nature Education Knowledge* 4:7.
- Hirabayashi K, and Wotton RS. 1998. Organic matter processing by chironomid larvae (Diptera: Chironomidae). *Hydrobiologia* 382:151-159.
- James R, and Sampath K. 1999. Effect of zeolite on the reduction of cadmium toxicity in water and a freshwater fish, *Oreochromis mossambicus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 62:222-229.
- Knauer K, Sobek A, and Bucheli TD. 2007. Reduced toxicity of diuron to the freshwater green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in the presence of black carbon. *Aquatic Toxicology* 83:143-148.
- Koelmans AA, Jonker MT, Cornelissen G, Bucheli TD, Van Noort PC, and Gustafsson Ö. 2006. Black carbon: the reverse of its dark side. *Chemosphere* 63:365-377.
- Langer-Jaesrich M, Köhler H-R, and Gerhardt A. 2010. Assessing toxicity of the insecticide thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) using multiple end points. *Archives of environmental contamination and toxicology* 58:963-972.
- Lead JR, and Wilkinson KJ. 2006. Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends. *Environmental Chemistry* 3:159-171.

- Lehman SE, and Larsen SC. 2014. Zeolite and mesoporous silica nanomaterials: greener syntheses, environmental applications and biological toxicity. *Environmental Science: Nano* 1:200-213.
- Lorenz CS, Wicht A-J, Guluzada L, Luo L, Jäger L, Crone B, Karst U, Triebkorn R, Liang Y, Anwander R, Haderlein SB, Huhn C, and Köhler H-R. 2017. Nano-sized Al₂O₃ reduces acute toxic effects of thiacloprid on the non-biting midge *Chironomus riparius*. *PLOS ONE* 12:e0176356. 10.1371/journal.pone.0176356
- Masters AF, and Maschmeyer T. 2011. Zeolites—From curiosity to cornerstone. *Microporous and Mesoporous Materials* 142:423-438.
- Maynard AD. 2006. Nanotechnology: assessing the risks. *Nano Today* 1:22-33.
- Moore M. 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International* 32:967-976.
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao A-J, Quigg A, Santschi PH, and Sigg L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17:372-386.
- Nowack B, and Bucheli TD. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental pollution* 150:5-22.
- Oberdörster G. 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine* 267:89-105.
- Oberdörster G, Oberdörster E, and Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*:823-839.
- OECD. 2004a. Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2004b. Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2010. Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing.
- OECD. 2011. Test No. 235: *Chironomus sp.*, Acute Immobilisation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing.
- Ötker HM, and Akmehmet-Balçioğlu I. 2005. Adsorption and degradation of enrofloxacin, a veterinary antibiotic on natural zeolite. *Journal of hazardous materials* 122:251-258.

- R Development Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Savolainen K, Alenius H, Norppa H, Pylkkänen L, Tuomi T, and Kasper G. 2010. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies - a review. *Toxicology* 269:92-104.
- Scherzer J. 1978. Dealuminated faujasite-type structures with SiO₂/Al₂O₃ ratios over 100. *Journal of Catalysis* 54:285-288.
- Schultz C, Powell K, Crossley A, Jurkschat K, Kille P, Morgan AJ, Read D, Tyne W, Lahive E, Svendsen C, and Spurgeon D. 2015. Analytical approaches to support current understanding of exposure, uptake and distributions of engineered nanoparticles by aquatic and terrestrial organisms. *Ecotoxicology* 24:239-261. 10.1007/s10646-014-1387-3
- Scown T, Van Aerle R, and Tyler C. 2010. Review: do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? *Critical reviews in toxicology* 40:653-670.
- Seipenbusch M, Rothenbacher S, Kirchhoff M, Schmid H-J, Kasper G, and Weber A. 2010. Interparticle forces in silica nanoparticle agglomerates. *Journal of Nanoparticle Research* 12:2037-2044.
- Wagner S, Gondikas A, Neubauer E, Hofmann T, and von der Kammer F. 2014. Spot the difference: engineered and natural nanoparticles in the environment - release, behavior, and fate. *Angewandte Chemie International Edition* 53:12398-12419.
- Wang S, and Peng Y. 2010. Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* 156:11-24.
- Yilmaz B, and Müller U. 2009. Catalytic applications of zeolites in chemical industry. *Topics in Catalysis* 52:888-895.
- Zhu X, Chang Y, and Chen Y. 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 78:209-215.

Raw data

Table S1: Percentages of living *C. riparius* larvae exhibiting convulsions during exposure (96 h) to treatments including Y30.

Time	Treatment	% of larvae exhibiting convulsion	SD (\pm)
24 h	control	0.00%	0.00%
	TC	46.67%	30.70%
	NP-low	0.00%	0.00%
	MP-medium	0.00%	0.00%
	NP-high	0.00%	0.00%
	mix-low	20.00%	19.32%
	mix-medium	0.00%	0.00%
	mix-high	0.00%	0.00%
48 h	control	0.00%	0.00%
	TC	80.00%	20.66%
	NP-low	0.00%	0.00%
	MP-medium	0.00%	0.00%
	NP-high	0.00%	0.00%
	mix-low	77.69%	28.33%
	mix-medium	10.00%	18.13%
	mix-high	0.00%	0.00%
72 h	control	0.00%	0.00%
	TC	100.00%	0.00%
	NP-low	0.00%	0.00%
	MP-medium	0.00%	0.00%
	NP-high	0.00%	0.00%
	mix-low	100.00%	0.00%
	mix-medium	21.33%	35.38%
	mix-high	0.00%	0.00%
96 h	control	0.00%	0.00%
	TC	100.00%	0.00%
	NP-low	0.00%	0.00%
	MP-medium	0.00%	0.00%
	NP-high	0.00%	0.00%
	mix-low	100.00%	0.00%
	mix-medium	100.00%	0.00%
	mix-high	0.00%	0.00%

Table S2: Percentages of living *C. riparius* larvae exhibiting convulsions during exposure (96 h) to treatments including H-Beta(OH)-III.

Time	Treatment	% of larvae exhibiting convulsion
24 h	control	0.00%
	TC	45.67%
	NP-low	0.00%
	MP-medium	0.00%
	NP-high	0.00%
	mix-low	0.00%
	mix-medium	0.00%
	mix-high	0.00%
48 h	control	0.00%
	TC	77.67%
	NP-low	0.00%
	MP-medium	0.00%
	NP-high	0.00%
	mix-low	0.00%
	mix-medium	0.00%
	mix-high	0.00%
72 h	control	0.00%
	TC	100.00%
	NP-low	0.00%
	MP-medium	0.00%
	NP-high	0.00%
	mix-low	0.00%
	mix-medium	0.00%
	mix-high	0.00%
96 h	control	0.00%
	TC	100.00%
	NP-low	0.00%
	MP-medium	0.00%
	NP-high	0.00%
	mix-low	0.00%
	mix-medium	0.00%
	mix-high	0.00%

Table S3: Mortality of *C. riparius* larvae after 96 h of exposure to treatments including Y30 zeolites.

treat	vessel	replicate	dead	larvae
control	1	1	1	1
control	1	1	0	2
control	1	1	0	3
control	1	1	0	4
control	1	1	0	5
control	2	2	0	1
control	2	2	0	2
control	2	2	0	3
control	2	2	0	4
control	2	2	0	5
control	3	3	0	1
control	3	3	0	2
control	3	3	0	3
control	3	3	0	4
control	3	3	0	5
control	4	4	0	1
control	4	4	0	2
control	4	4	0	3
control	4	4	0	4
control	4	4	0	5
control	5	5	0	1
control	5	5	0	2
control	5	5	0	3
control	5	5	0	4
control	5	5	0	5
control	6	6	0	1
control	6	6	0	2
control	6	6	0	3
control	6	6	0	4
control	6	6	0	5
control	7	7	0	1
control	7	7	0	2
control	7	7	0	3
control	7	7	0	4
control	7	7	0	5
control	8	8	0	1
control	8	8	0	2
control	8	8	0	3
control	8	8	0	4
control	8	8	0	5
control	9	9	0	1
control	9	9	0	2
control	9	9	0	3
control	9	9	0	4
control	9	9	0	5
control	10	10	1	1
control	10	10	0	2
control	10	10	0	3
control	10	10	0	4
control	10	10	0	5
control	11	11	0	1
control	11	11	0	2
control	11	11	0	3
control	11	11	0	4
control	11	11	0	5
control	12	12	0	1
control	12	12	0	2
control	12	12	0	3
control	12	12	0	4
control	12	12	0	5
control	13	13	1	1
control	13	13	0	2
control	13	13	0	3
control	13	13	0	4
control	13	13	0	5
control	14	14	1	1
control	14	14	0	2
control	14	14	0	3
control	14	14	0	4
control	14	14	0	5

treat	vessel	replicate	dead	larvae
control	15	15	0	1
control	15	15	0	2
control	15	15	0	3
control	15	15	0	4
control	15	15	0	5
Y30-solely low	16	1	0	1
Y30-solely low	16	1	0	2
Y30-solely low	16	1	0	3
Y30-solely low	16	1	0	4
Y30-solely low	16	1	0	5
Y30-solely low	17	2	1	1
Y30-solely low	17	2	0	2
Y30-solely low	17	2	0	3
Y30-solely low	17	2	0	4
Y30-solely low	17	2	0	5
Y30-solely low	18	3	0	1
Y30-solely low	18	3	0	2
Y30-solely low	18	3	0	3
Y30-solely low	18	3	0	4
Y30-solely low	18	3	0	5
Y30-solely low	19	4	0	1
Y30-solely low	19	4	0	2
Y30-solely low	19	4	0	3
Y30-solely low	19	4	0	4
Y30-solely low	19	4	0	5
Y30-solely low	20	5	0	1
Y30-solely low	20	5	0	2
Y30-solely low	20	5	0	3
Y30-solely low	20	5	0	4
Y30-solely low	20	5	0	5
Y30-solely low	21	6	0	1
Y30-solely low	21	6	0	2
Y30-solely low	21	6	0	3
Y30-solely low	21	6	0	4
Y30-solely low	21	6	0	5
Y30-solely low	22	7	0	1
Y30-solely low	22	7	0	2
Y30-solely low	22	7	0	3

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 2)

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Y30-solely low	22	7	0	4
Y30-solely low	22	7	0	5
Y30-solely low	23	8	0	1
Y30-solely low	23	8	0	2
Y30-solely low	23	8	0	3
Y30-solely low	23	8	0	4
Y30-solely low	23	8	0	5
Y30-solely low	24	9	0	1
Y30-solely low	24	9	0	2
Y30-solely low	24	9	0	3
Y30-solely low	24	9	0	4
Y30-solely low	24	9	0	5
Y30-solely low	25	10	1	1
Y30-solely low	25	10	1	2
Y30-solely low	25	10	0	3
Y30-solely low	25	10	0	4
Y30-solely low	25	10	0	5
Y30-solely low	26	11	0	1
Y30-solely low	26	11	0	2
Y30-solely low	26	11	0	3
Y30-solely low	26	11	0	4
Y30-solely low	26	11	0	5
Y30-solely low	27	12	0	1
Y30-solely low	27	12	0	2
Y30-solely low	27	12	0	3
Y30-solely low	27	12	0	4
Y30-solely low	27	12	0	5
Y30-solely low	28	13	0	1
Y30-solely low	28	13	0	2
Y30-solely low	28	13	0	3
Y30-solely low	28	13	0	4
Y30-solely low	28	13	0	5
Y30-solely low	29	14	0	1
Y30-solely low	29	14	0	2
Y30-solely low	29	14	0	3
Y30-solely low	29	14	0	4
Y30-solely low	29	14	0	5

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Y30-solely low	30	15	0	1
Y30-solely low	30	15	0	2
Y30-solely low	30	15	0	3
Y30-solely low	30	15	0	4
Y30-solely low	30	15	0	5
Y30-solely medium	31	1	0	1
Y30-solely medium	31	1	0	2
Y30-solely medium	31	1	0	3
Y30-solely medium	31	1	0	4
Y30-solely medium	31	1	0	5
Y30-solely medium	32	2	1	1
Y30-solely medium	32	2	0	2
Y30-solely medium	32	2	0	3
Y30-solely medium	32	2	0	4
Y30-solely medium	32	2	0	5
Y30-solely medium	33	3	0	1
Y30-solely medium	33	3	0	2
Y30-solely medium	33	3	0	3
Y30-solely medium	33	3	0	4
Y30-solely medium	33	3	0	5
Y30-solely medium	34	4	1	1
Y30-solely medium	34	4	0	2
Y30-solely medium	34	4	0	3
Y30-solely medium	34	4	0	4
Y30-solely medium	34	4	0	5
Y30-solely medium	35	5	0	1
Y30-solely medium	35	5	0	2
Y30-solely medium	35	5	0	3
Y30-solely medium	35	5	0	4
Y30-solely medium	35	5	0	5
Y30-solely medium	36	6	1	1
Y30-solely medium	36	6	0	2
Y30-solely medium	36	6	0	3
Y30-solely medium	36	6	0	4
Y30-solely medium	36	6	0	5
Y30-solely medium	37	7	1	1
Y30-solely medium	37	7	1	2

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 2)

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Y30-solely medium	37	7	0	3
Y30-solely medium	37	7	0	4
Y30-solely medium	37	7	0	5
Y30-solely medium	38	8	0	1
Y30-solely medium	38	8	0	2
Y30-solely medium	38	8	0	3
Y30-solely medium	38	8	0	4
Y30-solely medium	38	8	0	5
Y30-solely medium	39	9	0	1
Y30-solely medium	39	9	0	2
Y30-solely medium	39	9	0	3
Y30-solely medium	39	9	0	4
Y30-solely medium	39	9	0	5
Y30-solely medium	40	10	0	1
Y30-solely medium	40	10	0	2
Y30-solely medium	40	10	0	3
Y30-solely medium	40	10	0	4
Y30-solely medium	40	10	0	5
Y30-solely medium	41	11	1	1
Y30-solely medium	41	11	1	2
Y30-solely medium	41	11	0	3
Y30-solely medium	41	11	0	4
Y30-solely medium	41	11	0	5
Y30-solely medium	42	12	0	1
Y30-solely medium	42	12	0	2
Y30-solely medium	42	12	0	3
Y30-solely medium	42	12	0	4
Y30-solely medium	42	12	0	5
Y30-solely medium	43	13	0	1
Y30-solely medium	43	13	0	2
Y30-solely medium	43	13	0	3
Y30-solely medium	43	13	0	4
Y30-solely medium	43	13	0	5
Y30-solely medium	44	14	0	1
Y30-solely medium	44	14	0	2
Y30-solely medium	44	14	0	3
Y30-solely medium	44	14	0	4

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Y30-solely medium	44	14	0	5
Y30-solely medium	45	15	0	1
Y30-solely medium	45	15	0	2
Y30-solely medium	45	15	0	3
Y30-solely medium	45	15	0	4
Y30-solely medium	45	15	0	5
Y30-solely high	46	1	0	1
Y30-solely high	46	1	0	2
Y30-solely high	46	1	0	3
Y30-solely high	46	1	0	4
Y30-solely high	46	1	0	5
Y30-solely high	47	2	0	1
Y30-solely high	47	2	0	2
Y30-solely high	47	2	0	3
Y30-solely high	47	2	0	4
Y30-solely high	47	2	0	5
Y30-solely high	48	3	0	1
Y30-solely high	48	3	0	2
Y30-solely high	48	3	0	3
Y30-solely high	48	3	0	4
Y30-solely high	48	3	0	5
Y30-solely high	49	4	0	1
Y30-solely high	49	4	0	2
Y30-solely high	49	4	0	3
Y30-solely high	49	4	0	4
Y30-solely high	49	4	0	5
Y30-solely high	50	5	1	1
Y30-solely high	50	5	0	2
Y30-solely high	50	5	0	3
Y30-solely high	50	5	0	4
Y30-solely high	50	5	0	5
Y30-solely high	51	6	0	1
Y30-solely high	51	6	0	2
Y30-solely high	51	6	0	3
Y30-solely high	51	6	0	4
Y30-solely high	51	6	0	5
Y30-solely high	52	7	0	1

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 2)

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Y30-solely high	52	7	0	2
Y30-solely high	52	7	0	3
Y30-solely high	52	7	0	4
Y30-solely high	52	7	0	5
Y30-solely high	53	8	0	1
Y30-solely high	53	8	0	2
Y30-solely high	53	8	0	3
Y30-solely high	53	8	0	4
Y30-solely high	53	8	0	5
Y30-solely high	54	9	0	1
Y30-solely high	54	9	0	2
Y30-solely high	54	9	0	3
Y30-solely high	54	9	0	4
Y30-solely high	54	9	0	5
Y30-solely high	55	10	0	1
Y30-solely high	55	10	0	2
Y30-solely high	55	10	0	3
Y30-solely high	55	10	0	4
Y30-solely high	55	10	0	5
Y30-solely high	56	11	0	1
Y30-solely high	56	11	0	2
Y30-solely high	56	11	0	3
Y30-solely high	56	11	0	4
Y30-solely high	56	11	0	5
Y30-solely high	57	12	1	1
Y30-solely high	57	12	1	2
Y30-solely high	57	12	0	3
Y30-solely high	57	12	0	4
Y30-solely high	57	12	0	5
Y30-solely high	58	13	0	1
Y30-solely high	58	13	0	2
Y30-solely high	58	13	0	3
Y30-solely high	58	13	0	4
Y30-solely high	58	13	0	5
Y30-solely high	59	14	0	1
Y30-solely high	59	14	0	2
Y30-solely high	59	14	0	3

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Y30-solely high	59	14	0	4
Y30-solely high	59	14	0	5
Y30-solely high	60	15	0	1
Y30-solely high	60	15	0	2
Y30-solely high	60	15	0	3
Y30-solely high	60	15	0	4
Y30-solely high	60	15	0	5
TC solely	61	1	1	1
TC solely	61	1	1	2
TC solely	61	1	0	3
TC solely	61	1	0	4
TC solely	61	1	0	5
TC solely	62	2	1	1
TC solely	62	2	1	2
TC solely	62	2	0	3
TC solely	62	2	0	4
TC solely	62	2	0	5
TC solely	63	3	1	1
TC solely	63	3	1	2
TC solely	63	3	0	3
TC solely	63	3	0	4
TC solely	63	3	0	5
TC solely	64	4	1	1
TC solely	64	4	1	2
TC solely	64	4	1	3
TC solely	64	4	1	4
TC solely	64	4	0	5
TC solely	65	5	1	1
TC solely	65	5	1	2
TC solely	65	5	0	3
TC solely	65	5	0	4
TC solely	65	5	0	5
TC solely	66	6	0	1
TC solely	66	6	0	2
TC solely	66	6	0	3
TC solely	66	6	0	4
TC solely	66	6	0	5
TC solely	67	7	1	1
TC solely	67	7	1	2
TC solely	67	7	1	3
TC solely	67	7	1	4
TC solely	67	7	0	5
TC solely	68	8	1	1
TC solely	68	8	1	2
TC solely	68	8	1	3
TC solely	68	8	0	4
TC solely	68	8	0	5
TC solely	69	9	1	1
TC solely	69	9	0	2
TC solely	69	9	0	3
TC solely	69	9	0	4
TC solely	69	9	0	5
TC solely	70	10	1	1
TC solely	70	10	1	2
TC solely	70	10	0	3
TC solely	70	10	0	4
TC solely	70	10	0	5
TC solely	71	11	1	1
TC solely	71	11	1	2
TC solely	71	11	1	3
TC solely	71	11	1	4
TC solely	71	11	1	5
TC solely	72	12	1	1
TC solely	72	12	1	2
TC solely	72	12	1	3

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 2)

treat	vessel	replicate	dead	larvae
TC solely	72	12	0	4
TC solely	72	12	0	5
TC solely	73	13	1	1
TC solely	73	13	1	2
TC solely	73	13	0	3
TC solely	73	13	0	4
TC solely	73	13	0	5
TC solely	74	14	1	1
TC solely	74	14	1	2
TC solely	74	14	0	3
TC solely	74	14	0	4
TC solely	74	14	0	5
TC solely	75	15	1	1
TC solely	75	15	1	2
TC solely	75	15	1	3
TC solely	75	15	0	4
TC solely	75	15	0	5
Y30-mix low	76	1	1	1
Y30-mix low	76	1	0	2
Y30-mix low	76	1	0	3
Y30-mix low	76	1	0	4
Y30-mix low	76	1	0	5
Y30-mix low	77	2	0	1
Y30-mix low	77	2	0	2
Y30-mix low	77	2	0	3
Y30-mix low	77	2	0	4
Y30-mix low	77	2	0	5
Y30-mix low	78	3	1	1
Y30-mix low	78	3	1	2
Y30-mix low	78	3	0	3
Y30-mix low	78	3	0	4
Y30-mix low	78	3	0	5
Y30-mix low	79	4	1	1
Y30-mix low	79	4	1	2
Y30-mix low	79	4	0	3
Y30-mix low	79	4	0	4
Y30-mix low	79	4	0	5
Y30-mix low	80	5	1	1
Y30-mix low	80	5	0	2
Y30-mix low	80	5	0	3
Y30-mix low	80	5	0	4
Y30-mix low	80	5	0	5
Y30-mix low	81	6	1	1
Y30-mix low	81	6	1	2
Y30-mix low	81	6	0	3
Y30-mix low	81	6	0	4
Y30-mix low	81	6	0	5
Y30-mix low	82	7	1	1
Y30-mix low	82	7	1	2
Y30-mix low	82	7	1	3
Y30-mix low	82	7	0	4
Y30-mix low	82	7	0	5
Y30-mix low	83	8	1	1
Y30-mix low	83	8	1	2
Y30-mix low	83	8	1	3
Y30-mix low	83	8	0	4
Y30-mix low	83	8	0	5
Y30-mix low	84	9	1	1
Y30-mix low	84	9	0	2
Y30-mix low	84	9	0	3
Y30-mix low	84	9	0	4
Y30-mix low	84	9	0	5
Y30-mix low	85	10	1	1
Y30-mix low	85	10	1	2
Y30-mix low	85	10	1	3
Y30-mix low	85	10	1	4
Y30-mix low	85	10	0	5
Y30-mix low	86	11	1	1
Y30-mix low	86	11	0	2
Y30-mix low	86	11	0	3
Y30-mix low	86	11	0	4
Y30-mix low	86	11	0	5

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Y30-mix low	87	12	1	1
Y30-mix low	87	12	1	2
Y30-mix low	87	12	0	3
Y30-mix low	87	12	0	4
Y30-mix low	87	12	0	5
Y30-mix low	88	13	1	1
Y30-mix low	88	13	1	2
Y30-mix low	88	13	1	3
Y30-mix low	88	13	0	4
Y30-mix low	88	13	0	5
Y30-mix low	89	14	1	1
Y30-mix low	89	14	1	2
Y30-mix low	89	14	1	3
Y30-mix low	89	14	1	4
Y30-mix low	89	14	0	5
Y30-mix low	90	15	1	1
Y30-mix low	90	15	1	2
Y30-mix low	90	15	1	3
Y30-mix low	90	15	0	4
Y30-mix low	90	15	0	5
Y30-mix medium	91	1	0	1
Y30-mix medium	91	1	0	2
Y30-mix medium	91	1	0	3
Y30-mix medium	91	1	0	4
Y30-mix medium	91	1	0	5
Y30-mix medium	92	2	0	1
Y30-mix medium	92	2	0	2
Y30-mix medium	92	2	0	3
Y30-mix medium	92	2	0	4
Y30-mix medium	92	2	0	5
Y30-mix medium	93	3	1	1
Y30-mix medium	93	3	0	2
Y30-mix medium	93	3	0	3
Y30-mix medium	93	3	0	4
Y30-mix medium	93	3	0	5
Y30-mix medium	94	4	1	1
Y30-mix medium	94	4	0	2
Y30-mix medium	94	4	0	3
Y30-mix medium	94	4	0	4
Y30-mix medium	94	4	0	5
Y30-mix medium	95	5	1	1
Y30-mix medium	95	5	1	2
Y30-mix medium	95	5	1	3
Y30-mix medium	95	5	0	4
Y30-mix medium	95	5	0	5
Y30-mix medium	96	6	1	1

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 2)

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Y30-mix medium	96	6	1	2
Y30-mix medium	96	6	0	3
Y30-mix medium	96	6	0	4
Y30-mix medium	96	6	0	5
Y30-mix medium	97	7	1	1
Y30-mix medium	97	7	1	2
Y30-mix medium	97	7	1	3
Y30-mix medium	97	7	0	4
Y30-mix medium	97	7	0	5
Y30-mix medium	98	8	1	1
Y30-mix medium	98	8	1	2
Y30-mix medium	98	8	0	3
Y30-mix medium	98	8	0	4
Y30-mix medium	98	8	0	5
Y30-mix medium	99	9	1	1
Y30-mix medium	99	9	1	2
Y30-mix medium	99	9	0	3
Y30-mix medium	99	9	0	4
Y30-mix medium	99	9	0	5
Y30-mix medium	100	10	1	1
Y30-mix medium	100	10	1	2
Y30-mix medium	100	10	1	3
Y30-mix medium	100	10	0	4
Y30-mix medium	100	10	0	5
Y30-mix medium	101	11	1	1
Y30-mix medium	101	11	1	2
Y30-mix medium	101	11	1	3
Y30-mix medium	101	11	0	4
Y30-mix medium	101	11	0	5
Y30-mix medium	102	12	1	1
Y30-mix medium	102	12	1	2
Y30-mix medium	102	12	1	3
Y30-mix medium	102	12	0	4
Y30-mix medium	102	12	0	5
Y30-mix medium	103	13	1	1
Y30-mix medium	103	13	1	2
Y30-mix medium	103	13	0	3

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Y30-mix medium	103	13	0	4
Y30-mix medium	103	13	0	5
Y30-mix medium	104	14	0	1
Y30-mix medium	104	14	0	2
Y30-mix medium	104	14	0	3
Y30-mix medium	104	14	0	4
Y30-mix medium	104	14	0	5
Y30-mix medium	105	15	1	1
Y30-mix medium	105	15	0	2
Y30-mix medium	105	15	0	3
Y30-mix medium	105	15	0	4
Y30-mix medium	105	15	0	5
Y30-mix high	106	1	0	1
Y30-mix high	106	1	0	2
Y30-mix high	106	1	0	3
Y30-mix high	106	1	0	4
Y30-mix high	106	1	0	5
Y30-mix high	107	2	0	1
Y30-mix high	107	2	0	2
Y30-mix high	107	2	0	3
Y30-mix high	107	2	0	4
Y30-mix high	107	2	0	5
Y30-mix high	108	3	0	1
Y30-mix high	108	3	0	2
Y30-mix high	108	3	0	3
Y30-mix high	108	3	0	4
Y30-mix high	108	3	0	5
Y30-mix high	109	4	0	1
Y30-mix high	109	4	0	2
Y30-mix high	109	4	0	3
Y30-mix high	109	4	0	4
Y30-mix high	109	4	0	5
Y30-mix high	110	5	0	1
Y30-mix high	110	5	0	2
Y30-mix high	110	5	0	3
Y30-mix high	110	5	0	4
Y30-mix high	110	5	0	5
Y30-mix high	111	6	0	1
Y30-mix high	111	6	0	2
Y30-mix high	111	6	0	3
Y30-mix high	111	6	0	4
Y30-mix high	111	6	0	5
Y30-mix high	112	7	0	1
Y30-mix high	112	7	0	2
Y30-mix high	112	7	0	3
Y30-mix high	112	7	0	4
Y30-mix high	112	7	0	5
Y30-mix high	113	8	0	1
Y30-mix high	113	8	0	2
Y30-mix high	113	8	0	3
Y30-mix high	113	8	0	4
Y30-mix high	113	8	0	5
Y30-mix high	114	9	0	1
Y30-mix high	114	9	0	2
Y30-mix high	114	9	0	3
Y30-mix high	114	9	0	4
Y30-mix high	114	9	0	5
Y30-mix high	115	10	0	1
Y30-mix high	115	10	0	2
Y30-mix high	115	10	0	3
Y30-mix high	115	10	0	4

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Y30-mix high	115	10	0	5
Y30-mix high	116	11	1	1
Y30-mix high	116	11	0	2
Y30-mix high	116	11	0	3
Y30-mix high	116	11	0	4
Y30-mix high	116	11	0	5
Y30-mix high	117	12	0	1
Y30-mix high	117	12	0	2
Y30-mix high	117	12	0	3
Y30-mix high	117	12	0	4
Y30-mix high	117	12	0	5
Y30-mix high	118	13	0	1
Y30-mix high	118	13	0	2
Y30-mix high	118	13	0	3
Y30-mix high	118	13	0	4
Y30-mix high	118	13	0	5
Y30-mix high	119	14	1	1
Y30-mix high	119	14	0	2
Y30-mix high	119	14	0	3
Y30-mix high	119	14	0	4
Y30-mix high	119	14	0	5
Y30-mix high	120	15	0	1
Y30-mix high	120	15	0	2
Y30-mix high	120	15	0	3
Y30-mix high	120	15	0	4
Y30-mix high	120	15	0	5

Table S4: Mortality of *C. riparius* larvae after 96 h of exposure to treatments including H-Beta(OH)-III zeolites.

treat	vessel	replicate	dead	larvae
control	1	1	0	1
control	1	1	0	2
control	1	1	0	3
control	1	1	0	4
control	1	1	0	5
control	2	2	0	1
control	2	2	0	2
control	2	2	0	3
control	2	2	0	4
control	2	2	0	5
control	3	3	0	1
control	3	3	0	2
control	3	3	0	3
control	3	3	0	4
control	3	3	0	5
control	4	4	1	1
control	4	4	0	2
control	4	4	0	3
control	4	4	0	4
control	4	4	0	5
control	5	5	0	1
control	5	5	0	2
control	5	5	0	3
control	5	5	0	4
control	5	5	0	5
control	6	6	0	1
control	6	6	0	2
control	6	6	0	3
control	6	6	0	4
control	6	6	0	5
control	7	7	0	1
control	7	7	0	2
control	7	7	0	3
control	7	7	0	4
control	7	7	0	5
control	8	8	0	1
control	8	8	0	2
control	8	8	0	3
control	8	8	0	4
control	8	8	0	5
control	9	9	0	1
control	9	9	0	2
control	9	9	0	3
control	9	9	0	4
control	9	9	0	5
control	10	10	0	1
control	10	10	0	2
control	10	10	0	3
control	10	10	0	4
control	10	10	0	5
control	11	11	0	1
control	11	11	0	2
control	11	11	0	3
control	11	11	0	4
control	11	11	0	5
control	12	12	0	1
control	12	12	0	2
control	12	12	0	3
control	12	12	0	4
control	12	12	0	5
control	13	13	1	1
control	13	13	0	2
control	13	13	0	3
control	13	13	0	4
control	13	13	0	5
control	14	14	0	1
control	14	14	0	2
control	14	14	0	3
control	14	14	0	4
control	14	14	0	5

treat	vessel	replicate	dead	larvae
control	15	15	0	1
control	15	15	0	2
control	15	15	0	3
control	15	15	0	4
control	15	15	0	5
Beta-solely low	16	1	0	1
Beta-solely low	16	1	0	2
Beta-solely low	16	1	0	3
Beta-solely low	16	1	0	4
Beta-solely low	16	1	0	5
Beta-solely low	17	2	0	1
Beta-solely low	17	2	0	2
Beta-solely low	17	2	0	3
Beta-solely low	17	2	0	4
Beta-solely low	17	2	0	5
Beta-solely low	18	3	0	1
Beta-solely low	18	3	0	2
Beta-solely low	18	3	0	3
Beta-solely low	18	3	0	4
Beta-solely low	18	3	0	5
Beta-solely low	19	4	0	1
Beta-solely low	19	4	0	2
Beta-solely low	19	4	0	3
Beta-solely low	19	4	0	4
Beta-solely low	19	4	0	5
Beta-solely low	20	5	0	1
Beta-solely low	20	5	0	2
Beta-solely low	20	5	0	3
Beta-solely low	20	5	0	4
Beta-solely low	20	5	0	5
Beta-solely low	21	6	0	1
Beta-solely low	21	6	0	2
Beta-solely low	21	6	0	3
Beta-solely low	21	6	0	4
Beta-solely low	21	6	0	5
Beta-solely low	22	7	0	1
Beta-solely low	22	7	0	2
Beta-solely low	22	7	0	3

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 2)

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Beta-solely low	22	7	0	4
Beta-solely low	22	7	0	5
Beta-solely low	23	8	0	1
Beta-solely low	23	8	0	2
Beta-solely low	23	8	0	3
Beta-solely low	23	8	0	4
Beta-solely low	23	8	0	5
Beta-solely low	24	9	0	1
Beta-solely low	24	9	0	2
Beta-solely low	24	9	0	3
Beta-solely low	24	9	0	4
Beta-solely low	24	9	0	5
Beta-solely low	25	10	0	1
Beta-solely low	25	10	0	2
Beta-solely low	25	10	0	3
Beta-solely low	25	10	0	4
Beta-solely low	25	10	0	5
Beta-solely low	26	11	1	1
Beta-solely low	26	11	0	2
Beta-solely low	26	11	0	3
Beta-solely low	26	11	0	4
Beta-solely low	26	11	0	5
Beta-solely low	27	12	0	1
Beta-solely low	27	12	0	2
Beta-solely low	27	12	0	3
Beta-solely low	27	12	0	4
Beta-solely low	27	12	0	5
Beta-solely low	28	13	0	1
Beta-solely low	28	13	0	2
Beta-solely low	28	13	0	3
Beta-solely low	28	13	0	4
Beta-solely low	28	13	0	5
Beta-solely low	29	14	0	1
Beta-solely low	29	14	0	2
Beta-solely low	29	14	0	3
Beta-solely low	29	14	0	4
Beta-solely low	29	14	0	5

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Beta-solely low	30	15	1	1
Beta-solely low	30	15	0	2
Beta-solely low	30	15	0	3
Beta-solely low	30	15	0	4
Beta-solely low	30	15	0	5
Beta-solely medium	31	1	1	1
Beta-solely medium	31	1	0	2
Beta-solely medium	31	1	0	3
Beta-solely medium	31	1	0	4
Beta-solely medium	31	1	0	5
Beta-solely medium	32	2	0	1
Beta-solely medium	32	2	0	2
Beta-solely medium	32	2	0	3
Beta-solely medium	32	2	0	4
Beta-solely medium	32	2	0	5
Beta-solely medium	33	3	1	1
Beta-solely medium	33	3	0	2
Beta-solely medium	33	3	0	3
Beta-solely medium	33	3	0	4
Beta-solely medium	33	3	0	5
Beta-solely medium	34	4	0	1
Beta-solely medium	34	4	0	2
Beta-solely medium	34	4	0	3
Beta-solely medium	34	4	0	4
Beta-solely medium	34	4	0	5
Beta-solely medium	35	5	1	1
Beta-solely medium	35	5	0	2
Beta-solely medium	35	5	0	3
Beta-solely medium	35	5	0	4
Beta-solely medium	35	5	0	5
Beta-solely medium	36	6	0	1
Beta-solely medium	36	6	0	2
Beta-solely medium	36	6	0	3

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 2)

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Beta-solely medium	36	6	0	4
Beta-solely medium	36	6	0	5
Beta-solely medium	37	7	0	1
Beta-solely medium	37	7	0	2
Beta-solely medium	37	7	0	3
Beta-solely medium	37	7	0	4
Beta-solely medium	37	7	0	5
Beta-solely medium	38	8	0	1
Beta-solely medium	38	8	0	2
Beta-solely medium	38	8	0	3
Beta-solely medium	38	8	0	4
Beta-solely medium	38	8	0	5
Beta-solely medium	39	9	0	1
Beta-solely medium	39	9	0	2
Beta-solely medium	39	9	0	3
Beta-solely medium	39	9	0	4
Beta-solely medium	39	9	0	5
Beta-solely medium	40	10	0	1
Beta-solely medium	40	10	0	2
Beta-solely medium	40	10	0	3
Beta-solely medium	40	10	0	4
Beta-solely medium	40	10	0	5
Beta-solely medium	41	11	0	1
Beta-solely medium	41	11	0	2
Beta-solely medium	41	11	0	3
Beta-solely medium	41	11	0	4
Beta-solely medium	41	11	0	5
Beta-solely medium	42	12	0	1
Beta-solely medium	42	12	0	2
Beta-solely medium	42	12	0	3
Beta-solely medium	42	12	0	4
Beta-solely medium	42	12	0	5

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Beta-solely medium	43	13	0	1
Beta-solely medium	43	13	0	2
Beta-solely medium	43	13	0	3
Beta-solely medium	43	13	0	4
Beta-solely medium	43	13	0	5
Beta-solely medium	44	14	0	1
Beta-solely medium	44	14	0	2
Beta-solely medium	44	14	0	3
Beta-solely medium	44	14	0	4
Beta-solely medium	44	14	0	5
Beta-solely medium	45	15	0	1
Beta-solely medium	45	15	0	2
Beta-solely medium	45	15	0	3
Beta-solely medium	45	15	0	4
Beta-solely medium	45	15	0	5
Beta-solely high	46	1	0	1
Beta-solely high	46	1	0	2
Beta-solely high	46	1	0	3
Beta-solely high	46	1	0	4
Beta-solely high	46	1	0	5
Beta-solely high	47	2	0	1
Beta-solely high	47	2	0	2
Beta-solely high	47	2	0	3
Beta-solely high	47	2	0	4
Beta-solely high	47	2	0	5
Beta-solely high	48	3	1	1
Beta-solely high	48	3	0	2
Beta-solely high	48	3	0	3
Beta-solely high	48	3	0	4
Beta-solely high	48	3	0	5
Beta-solely high	49	4	0	1
Beta-solely high	49	4	0	2
Beta-solely high	49	4	0	3
Beta-solely high	49	4	0	4
Beta-solely high	49	4	0	5

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 2)

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Beta-solely high	50	5	0	1
Beta-solely high	50	5	0	2
Beta-solely high	50	5	0	3
Beta-solely high	50	5	0	4
Beta-solely high	50	5	0	5
Beta-solely high	51	6	0	1
Beta-solely high	51	6	0	2
Beta-solely high	51	6	0	3
Beta-solely high	51	6	0	4
Beta-solely high	51	6	0	5
Beta-solely high	52	7	1	1
Beta-solely high	52	7	0	2
Beta-solely high	52	7	0	3
Beta-solely high	52	7	0	4
Beta-solely high	52	7	0	5
Beta-solely high	53	8	1	1
Beta-solely high	53	8	0	2
Beta-solely high	53	8	0	3
Beta-solely high	53	8	0	4
Beta-solely high	53	8	0	5
Beta-solely high	54	9	0	1
Beta-solely high	54	9	0	2
Beta-solely high	54	9	0	3
Beta-solely high	54	9	0	4
Beta-solely high	54	9	0	5
Beta-solely high	55	10	1	1
Beta-solely high	55	10	0	2
Beta-solely high	55	10	0	3
Beta-solely high	55	10	0	4
Beta-solely high	55	10	0	5
Beta-solely high	56	11	0	1
Beta-solely high	56	11	0	2
Beta-solely high	56	11	0	3
Beta-solely high	56	11	0	4
Beta-solely high	56	11	0	5
Beta-solely high	57	12	0	1
Beta-solely high	57	12	0	2

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Beta-solely high	57	12	0	3
Beta-solely high	57	12	0	4
Beta-solely high	57	12	0	5
Beta-solely high	58	13	0	1
Beta-solely high	58	13	0	2
Beta-solely high	58	13	0	3
Beta-solely high	58	13	0	4
Beta-solely high	58	13	0	5
Beta-solely high	59	14	0	1
Beta-solely high	59	14	0	2
Beta-solely high	59	14	0	3
Beta-solely high	59	14	0	4
Beta-solely high	59	14	0	5
Beta-solely high	60	15	0	1
Beta-solely high	60	15	0	2
Beta-solely high	60	15	0	3
Beta-solely high	60	15	0	4
Beta-solely high	60	15	0	5
TC solely	61	1	1	1
TC solely	61	1	1	2
TC solely	61	1	0	3
TC solely	61	1	0	4
TC solely	61	1	0	5
TC solely	62	2	1	1
TC solely	62	2	1	2
TC solely	62	2	1	3
TC solely	62	2	1	4
TC solely	62	2	0	5
TC solely	63	3	1	1
TC solely	63	3	1	2
TC solely	63	3	1	3
TC solely	63	3	0	4
TC solely	63	3	0	5
TC solely	64	4	1	1
TC solely	64	4	1	2
TC solely	64	4	0	3
TC solely	64	4	0	4
TC solely	64	4	0	5
TC solely	65	5	1	1
TC solely	65	5	1	2
TC solely	65	5	1	3
TC solely	65	5	1	4
TC solely	65	5	1	5
TC solely	66	6	0	1
TC solely	66	6	0	2
TC solely	66	6	0	3
TC solely	66	6	0	4
TC solely	66	6	0	5
TC solely	67	7	0	1
TC solely	67	7	0	2
TC solely	67	7	0	3
TC solely	67	7	0	4
TC solely	67	7	0	5
TC solely	68	8	1	1
TC solely	68	8	0	2

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 2)

treat	vessel	replicate	dead	larvae
TC solely	68	8	0	3
TC solely	68	8	0	4
TC solely	68	8	0	5
TC solely	69	9	1	1
TC solely	69	9	1	2
TC solely	69	9	1	3
TC solely	69	9	0	4
TC solely	69	9	0	5
TC solely	70	10	1	1
TC solely	70	10	1	2
TC solely	70	10	0	3
TC solely	70	10	0	4
TC solely	70	10	0	5
TC solely	71	11	1	1
TC solely	71	11	1	2
TC solely	71	11	1	3
TC solely	71	11	0	4
TC solely	71	11	0	5
TC solely	72	12	1	1
TC solely	72	12	1	2
TC solely	72	12	1	3
TC solely	72	12	0	4
TC solely	72	12	0	5
TC solely	73	13	1	1
TC solely	73	13	1	2
TC solely	73	13	0	3
TC solely	73	13	0	4
TC solely	73	13	0	5
TC solely	74	14	1	1
TC solely	74	14	1	2
TC solely	74	14	1	3
TC solely	74	14	0	4
TC solely	74	14	0	5
TC solely	75	15	1	1
TC solely	75	15	1	2
TC solely	75	15	0	3
TC solely	75	15	0	4
TC solely	75	15	0	5
Beta-mix low	76	1	1	1
Beta-mix low	76	1	1	2
Beta-mix low	76	1	0	3
Beta-mix low	76	1	0	4
Beta-mix low	76	1	0	5
Beta-mix low	77	2	1	1
Beta-mix low	77	2	0	2
Beta-mix low	77	2	0	3
Beta-mix low	77	2	0	4
Beta-mix low	77	2	0	5
Beta-mix low	78	3	1	1
Beta-mix low	78	3	0	2
Beta-mix low	78	3	0	3
Beta-mix low	78	3	0	4
Beta-mix low	78	3	0	5
Beta-mix low	79	4	0	1
Beta-mix low	79	4	0	2
Beta-mix low	79	4	0	3
Beta-mix low	79	4	0	4
Beta-mix low	79	4	0	5
Beta-mix low	80	5	0	1
Beta-mix low	80	5	0	2
Beta-mix low	80	5	0	3
Beta-mix low	80	5	0	4
Beta-mix low	80	5	0	5
Beta-mix low	81	6	0	1
Beta-mix low	81	6	0	2
Beta-mix low	81	6	0	3
Beta-mix low	81	6	0	4
Beta-mix low	81	6	0	5
Beta-mix low	82	7	0	1
Beta-mix low	82	7	0	2
Beta-mix low	82	7	0	3
Beta-mix low	82	7	0	4

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Beta-mix low	82	7	0	5
Beta-mix low	83	8	0	1
Beta-mix low	83	8	0	2
Beta-mix low	83	8	0	3
Beta-mix low	83	8	0	4
Beta-mix low	83	8	0	5
Beta-mix low	84	9	0	1
Beta-mix low	84	9	0	2
Beta-mix low	84	9	0	3
Beta-mix low	84	9	0	4
Beta-mix low	84	9	0	5
Beta-mix low	85	10	0	1
Beta-mix low	85	10	0	2
Beta-mix low	85	10	0	3
Beta-mix low	85	10	0	4
Beta-mix low	85	10	0	5
Beta-mix low	86	11	0	1
Beta-mix low	86	11	0	2
Beta-mix low	86	11	0	3
Beta-mix low	86	11	0	4
Beta-mix low	86	11	0	5
Beta-mix low	87	12	0	1
Beta-mix low	87	12	0	2
Beta-mix low	87	12	0	3
Beta-mix low	87	12	0	4
Beta-mix low	87	12	0	5
Beta-mix low	88	13	0	1
Beta-mix low	88	13	0	2
Beta-mix low	88	13	0	3
Beta-mix low	88	13	0	4
Beta-mix low	88	13	0	5
Beta-mix low	89	14	0	1
Beta-mix low	89	14	0	2
Beta-mix low	89	14	0	3
Beta-mix low	89	14	0	4
Beta-mix low	89	14	0	5
Beta-mix low	90	15	0	1
Beta-mix low	90	15	0	2
Beta-mix low	90	15	0	3
Beta-mix low	90	15	0	4
Beta-mix low	90	15	0	5
Beta-mix medium	91	1	0	1
Beta-mix medium	91	1	0	2
Beta-mix medium	91	1	0	3
Beta-mix medium	91	1	0	4
Beta-mix medium	91	1	0	5
Beta-mix medium	92	2	0	1
Beta-mix medium	92	2	0	2
Beta-mix medium	92	2	0	3
Beta-mix medium	92	2	0	4
Beta-mix medium	92	2	0	5
Beta-mix medium	93	3	1	1
Beta-mix medium	93	3	0	2
Beta-mix medium	93	3	0	3
Beta-mix medium	93	3	0	4

Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten (Kapitel 2)

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Beta-mix medium	93	3	0	5
Beta-mix medium	94	4	1	1
Beta-mix medium	94	4	0	2
Beta-mix medium	94	4	0	3
Beta-mix medium	94	4	0	4
Beta-mix medium	94	4	0	5
Beta-mix medium	95	5	0	1
Beta-mix medium	95	5	0	2
Beta-mix medium	95	5	0	3
Beta-mix medium	95	5	0	4
Beta-mix medium	95	5	0	5
Beta-mix medium	96	6	0	1
Beta-mix medium	96	6	0	2
Beta-mix medium	96	6	0	3
Beta-mix medium	96	6	0	4
Beta-mix medium	96	6	0	5
Beta-mix medium	97	7	0	1
Beta-mix medium	97	7	0	2
Beta-mix medium	97	7	0	3
Beta-mix medium	97	7	0	4
Beta-mix medium	97	7	0	5
Beta-mix medium	98	8	1	1
Beta-mix medium	98	8	0	2
Beta-mix medium	98	8	0	3
Beta-mix medium	98	8	0	4
Beta-mix medium	98	8	0	5
Beta-mix medium	99	9	0	1
Beta-mix medium	99	9	0	2
Beta-mix medium	99	9	0	3
Beta-mix medium	99	9	0	4
Beta-mix medium	99	9	0	5
Beta-mix medium	100	10	0	1

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Beta-mix medium	100	10	0	2
Beta-mix medium	100	10	0	3
Beta-mix medium	100	10	0	4
Beta-mix medium	100	10	0	5
Beta-mix medium	101	11	0	1
Beta-mix medium	101	11	0	2
Beta-mix medium	101	11	0	3
Beta-mix medium	101	11	0	4
Beta-mix medium	101	11	0	5
Beta-mix medium	102	12	0	1
Beta-mix medium	102	12	0	2
Beta-mix medium	102	12	0	3
Beta-mix medium	102	12	0	4
Beta-mix medium	102	12	0	5
Beta-mix medium	103	13	0	1
Beta-mix medium	103	13	0	2
Beta-mix medium	103	13	0	3
Beta-mix medium	103	13	0	4
Beta-mix medium	103	13	0	5
Beta-mix medium	104	14	0	1
Beta-mix medium	104	14	0	2
Beta-mix medium	104	14	0	3
Beta-mix medium	104	14	0	4
Beta-mix medium	104	14	0	5
Beta-mix medium	105	15	0	1
Beta-mix medium	105	15	0	2
Beta-mix medium	105	15	0	3
Beta-mix medium	105	15	0	4
Beta-mix medium	105	15	0	5
Beta-mix high	106	1	0	1
Beta-mix high	106	1	0	2
Beta-mix high	106	1	0	3
Beta-mix high	106	1	0	4
Beta-mix high	106	1	0	5
Beta-mix high	107	2	1	1
Beta-mix high	107	2	0	2

treat	vessel	replicate	dead	larvae
Beta-mix high	107	2	0	3
Beta-mix high	107	2	0	4
Beta-mix high	107	2	0	5
Beta-mix high	108	3	0	1
Beta-mix high	108	3	0	2
Beta-mix high	108	3	0	3
Beta-mix high	108	3	0	4
Beta-mix high	108	3	0	5
Beta-mix high	109	4	0	1
Beta-mix high	109	4	0	2
Beta-mix high	109	4	0	3
Beta-mix high	109	4	0	4
Beta-mix high	109	4	0	5
Beta-mix high	110	5	0	1
Beta-mix high	110	5	0	2
Beta-mix high	110	5	0	3
Beta-mix high	110	5	0	4
Beta-mix high	110	5	0	5
Beta-mix high	111	6	0	1
Beta-mix high	111	6	0	2
Beta-mix high	111	6	0	3
Beta-mix high	111	6	0	4
Beta-mix high	111	6	0	5
Beta-mix high	112	7	0	1
Beta-mix high	112	7	0	2
Beta-mix high	112	7	0	3
Beta-mix high	112	7	0	4
Beta-mix high	112	7	0	5
Beta-mix high	113	8	1	1
Beta-mix high	113	8	0	2
Beta-mix high	113	8	0	3
Beta-mix high	113	8	0	4
Beta-mix high	113	8	0	5
Beta-mix high	114	9	1	1
Beta-mix high	114	9	0	2
Beta-mix high	114	9	0	3
Beta-mix high	114	9	0	4
Beta-mix high	114	9	0	5
Beta-mix high	115	10	0	1
Beta-mix high	115	10	0	2
Beta-mix high	115	10	0	3
Beta-mix high	115	10	0	4
Beta-mix high	115	10	0	5
Beta-mix high	116	11	0	1
Beta-mix high	116	11	0	2
Beta-mix high	116	11	0	3
Beta-mix high	116	11	0	4
Beta-mix high	116	11	0	5
Beta-mix high	117	12	0	1
Beta-mix high	117	12	0	2
Beta-mix high	117	12	0	3
Beta-mix high	117	12	0	4
Beta-mix high	117	12	0	5
Beta-mix high	118	13	0	1
Beta-mix high	118	13	0	2
Beta-mix high	118	13	0	3
Beta-mix high	118	13	0	4
Beta-mix high	118	13	0	5
Beta-mix high	119	14	0	1
Beta-mix high	119	14	0	2
Beta-mix high	119	14	0	3
Beta-mix high	119	14	0	4
Beta-mix high	119	14	0	5
Beta-mix high	120	15	0	1
Beta-mix high	120	15	0	2
Beta-mix high	120	15	0	3
Beta-mix high	120	15	0	4
Beta-mix high	120	15	0	5

Kapitel 3: Examination of Fluorescent Silica Nanoparticles and their Tracking within Larvae of *Chironomus riparius*

Carla S. Lorenz¹ †

¹Institute of Evolution and Ecology, Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, D-72076 Tübingen, Germany

Abstract

The present study examined whether fluorescent SiO₂ nanoparticles (100 nm, connected to the fluorescent dye rhodamine B, excitation wavelength: 350 nm; emission wavelength: 581 nm) were suitable to be localized within living organisms by confocal microscopy. Moreover, their (cellular) uptake by larvae of the non-biting midge *Chironomus riparius* was investigated. For this purpose, larvae were exposed to the fluorescent SiO₂ nanoparticles or to rhodamine B solely for 96 h before fluorescence was measured by confocal microscopy. Our results showed that SiO₂ nanoparticles were suitable for the applied method and that the particles were ingested by the larvae. However, the SiO₂ nanoparticles aggregated within the lumen of the intestinal tract and no evidence for cellular uptake was found. Nevertheless, the study also showed that the larvae of *C. riparius* are well-suited to be analyzed by confocal microscopy in this respect.

†In cooperation with Leilei Luo², Yucang Liang², Reiner Anwander² and Heinz-R. Köhler¹

²Institute of Inorganic Chemistry, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen, Germany

1. Introduction

Nanoparticles (particles with a size ≤ 100 nm) occur naturally in the environment and derive e.g. from volcanic activities or weathering (Hartland *et al.* 2013; Hochella *et al.* 2008; Oberdörster *et al.* 2005). In the last decades, however, the interest on these small particles increased tremendously, as they found application in many fields and are commonly synthesized for numerous usage. For example, they are used in electronics or cosmetics (Oberdörster *et al.* 2005) or as drug carriers (Slowing *et al.* 2008). As a consequence, their frequent use also leads to increased intentional and unintentional introduction into the environment (Oberdörster *et al.* 2005). Nevertheless, our knowledge about the effects and fate of nanoparticles in the environment is scarce and risk assessment is very challenging (e.g. Oberdörster 2010; Savolainen *et al.* 2010). It is known that nanoparticles can interact with other environmentally relevant substances, like pollutants (e.g. Delay & Frimmel 2012; Scown *et al.* 2010), or they directly affect biota, e.g. by penetrating cell membranes (e.g. Bacchetta *et al.* 2012; Schultz *et al.* 2015) or by inducing reactive oxygen species (e.g. Navarro *et al.* 2008; Savolainen *et al.* 2010). To understand the toxicity of nanoparticles, much effort has been spent in the investigation of cellular uptake of nanomaterials. It has been shown that the cellular uptake of nanoparticles depends, amongst other parameters, on surface properties, protein corona, charge, shape and size of the nanoparticles and that slight differences between nanoparticles can lead to substantially differences concerning their uptake into cells (e.g. Albanese *et al.* 2012; He *et al.* 2010; Huang *et al.* 2010; Lesniak *et al.* 2012; Nel *et al.* 2009; Shang *et al.* 2014; Verma & Stellacci 2010). In addition, the mechanisms of cellular uptake, e.g. receptor mediated endocytosis (Zhao *et al.* 2011), phagocytosis (He *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2011), passive diffusion or active transport (Schultz *et al.* 2015), are also very diverse and depend on the properties of the nanoparticles too (Albanese *et al.* 2012; Nel *et al.* 2009; Shang *et al.* 2014; Verma & Stellacci 2010). Therefore, the comparability of different nanoparticles or nanoparticle studies is extremely limited and further research is needed to understand the mechanisms behind cellular uptake of nanoparticles. For this purpose, the tracking of nanoparticles within cells or biota is a useful tool. One possibility for tracking is fluorescent labelling of nanoparticles, coupled with fluorescence microscopy (e.g. He *et al.* 2010; Huang *et al.* 2010; Mohan *et al.* 2010; Schultz *et al.* 2015). The synthesis of suitable fluorescent nanoparticles and their tracking within living organisms were the objectives of the present study. So, we tested whether the association between the fluorescent rhodamine B and the SiO₂ nanoparticles was stable enough to allow detection of the SiO₂ nanoparticles by confocal microscopy, without leakage of rhodamine B. Therefore, we exposed larvae of the non-biting midge *Chironomus riparius* to the fluorescent SiO₂ nanoparticles or rhodamine B solely, and compared the staining of tissues among the differently treated larvae. Applying such experimental design enabled us to determine whether the association between the SiO₂ nanoparticles and rhodamine B was stable during the gut passage or not. Moreover, by tracking the fluorescent SiO₂ nanoparticles within the larvae, we may contribute to the investigation of cellular uptake mechanisms. Furthermore, the suitability of the

sediment-bound and detritus feeding (Armitage *et al.* 1995; Johnston *et al.* 2010; Scown *et al.* 2010) *C. riparius* larvae for the applied methods was evaluated.

2. Material and Methods

2.1. Fluorescent mesoporous silica nanoparticles

The synthesis of fluorescent silica nanoparticles was carried out in three steps. Firstly, mesoporous SiO₂ nanoparticles (MSNs) were synthesized by adding cetyltrimethylammonium chloride solution (25 wt%, 46.46 g), triethanolamine (0.36 g) and water (72 mL) into a 250 mL flask. The mixture was stirred using a 3 cm stirring bar at 60 °C (150 rpm) for 1 h. Tetraethyl orthosilicate (TEOS, 8 mL) dissolved in cyclohexane (32 mL) was then added carefully to form a biphasic reaction system. The solution was stirred at 60 °C (150 rpm) for 24 h. The nanoparticles were collected by centrifugation and washed twice with ethanol. The template was removed by stirring in a mixture of HCl (4 mL 32 %) and ethanol (160 mL) at 75 °C for four times for 3 h each. The final nanoparticles were collected and dried at 80 °C overnight. Secondly, MSNs were used to synthesize methylamino functionalized MSNs (MAMSNs). Therefore, MSNs (0.9 g) were suspended in toluene (50 mL) by sonication for 15 min. Trimethoxy(3-(methylamino)propyl)silane (3.4 mL) was then added, the suspension was refluxed at 120 °C for 24 h. The functionalized MSNs were obtained after washing with ethanol three times and drying at 75 °C overnight. In the third step, the fluorescent dye (rhodamine B) was added to the MAMSNs. For this purpose, MAMSNs (0.45 g) were suspended in dichloromethane (36 mL) by sonication for 20 min, then the solution of rhodamine B (0.22 g) and dicyclohexylcarbodiimide (0.22 g) dissolved in dichloromethane (27 mL) was added. The mixture was stirred at 40 °C for 24 h. The final nanoparticles were obtained after washing with ethanol six times and drying at 75 °C overnight. The final fluorescent nanoparticles had a mean size of 100 nm (Figure 1). Their excitation wavelength for fluorescence is 350 nm and light is emitted at 581 nm.

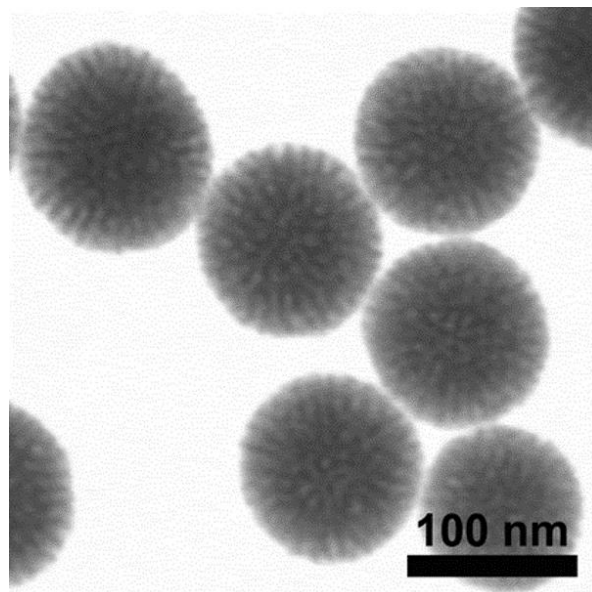


Figure 1: Image of the fluorescent SiO₂ nanoparticles (MAMSNs) taken by a scanning electron microscope (SEM, Hitachi SU 8030).

2.2. Cultivation of *Chironomus riparius*

A stock culture of *Chironomus riparius*, originating from animals of Goethe University Frankfurt/Main, Germany, was kept in a climate chamber (21 °C ± 0.5 °C, 16:8 light:dark) at the University of Tübingen. Larvae were kept in plastic basins (30 x 55 x 12 cm), filled with fine quartz sand (particle size: 0.1-0.3 mm, fill level: 2-3 cm) and dechlorinated tap water (filtered by iron and active carbon filters) with gently aeration. They were fed ground TetraMin® (Tetra, Germany) every second day, and 50 % of the water was exchanged once per week with a mixture of dechlorinated tap water and demineralized water (1:1). To allow adult midges swarming and mating, all plastic basins were covered by breeding cages (55 x 65 x 120 cm, mesh size: 0.5 mm²).

2.3. Exposure

For the experiments, we used 10 day old larvae of *C. riparius*. They were exposed to either MAMSNs, rhodamine B (Sigma-Adrich, Germany) or control conditions (dechlorinated tap water). The test vessels (glass, diameter: 7 cm, height: 6.5 cm) were filled with 30 g fine quartz sand (particle size: 0.1-0.3 mm) and 100 mL of either 50 mg/L MAMSN dispersion, 500 µg/L rhodamine B (Sigma-Adrich, Germany) or dechlorinated tap water, all aerated. Furthermore, larvae of the MAMSNs treatment were fed daily with small portions of a feed mixture composed of 5 mg MAMSNs, 20 mg ground TetraMin® (Tetra, Germany) and 30 µL demineralized water, which was dried for 96 h before application. Animals of the other treatments were fed with ground TetraMin® (Tetra, Germany). The exposure lasted for 96 h and took place in a climate chamber (21 °C ± 0.5 °C, 16:8 light:dark).

2.4. Confocal microscopy

Directly before the 14 day old larvae were measured by confocal microscopy (n = 3), they were placed on a microscope slide and embedded in a 1 % agarose (Sigma-Adrich, Germany) solution. Larvae survived this procedure enabling us to locate the nanoparticles within living organisms.

Analyses were conducted with a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany). The excitation wavelength was 450 nm and emitted light with wavelengths between 550-620 nm were detected. All pictures were taken with identical settings (excepting magnification) to guarantee comparability. To create 3D images, the Leica Application Suite X software (LAS X, Leica Microsystems GmbH, Germany) was used.

3. Results

Confocal microscopy of control animals showed slight autofluorescence, which was strongest at the head capsule (Figure 2 A-C). This was found in all animals, irrespective of the treatment group. Larvae exposed to rhodamine B showed fluorescence in their entire body (Figure 2 D-F). On the opposite, animals exposed to MAMSNs showed strong fluorescence within the lumen of the intestinal tract, but not within cells (Figure 2 G-I). These results were consistent for all analyzed individuals (n = 3).

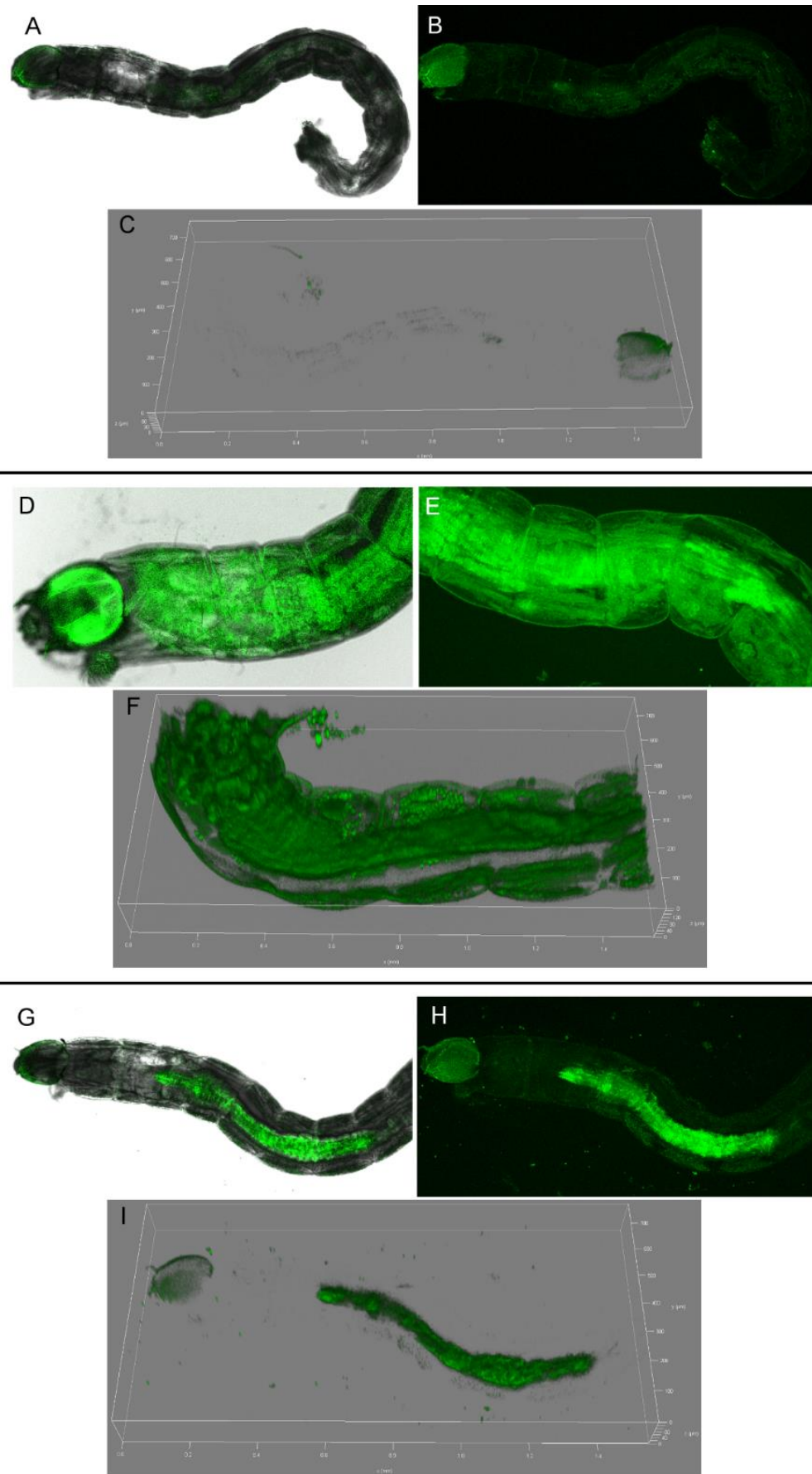


Figure 2: Pictures of *C. riparius* larvae taken by confocal microscopy. **A-C**: control; **D-F**: exposed to rhodamine B; **G-I**: exposed to fluorescent SiO₂ nanoparticles (MAMSNs). **A, D & G**: Overlays of pictures (phase contrast and fluorescence); **B, E & H**: stacks of several pictures (fluorescence); **C, F & I**: 3D pictures of fluorescence.

4. Discussion

The aim of the study was, on one hand, to assess whether the association between SiO₂ nanoparticles and the fluorescent dye rhodamine B was stable enough to enable particle location within an organism. On the other hand, we wanted to assess the uptake of fluorescent nanoparticles by *Chironomus riparius* larvae.

Confocal microscopy demonstrated that the larvae itself (control treatment) showed autofluorescence, especially at the head capsule. This result was expected, as it is known from literature that many arthropods show autofluorescence of their cuticula (e.g. Klaus & Schawaroch 2006; Koga *et al.* 2009; Thimm & Tebbe 2003). However, as internal tissues had minor autofluorescence, the background noise in the confocal microscope was very low. The contrary was found for larvae exposed to rhodamine B, which exhibited an unspecific staining of the entire body. By comparing this result with the fluorescence pattern of larvae exposed to MAMSNs, we found that animals exposed to MAMSNs showed fluorescence (in addition to autofluorescence) only within the lumen of the intestinal tract, demonstrating that no rhodamine B was released by the SiO₂ nanoparticles. Therefore, the used MAMSNs were found to be suitable for application and detection by confocal microscopy, and also the 14 day old larvae of *C. riparius* were suitable for confocal microscopy. Furthermore, our results showed an aggregation of MAMSNs within the lumen of the intestinal tract, as shown for various nanoparticles in several organisms before (e.g. Baun *et al.* 2008; Lorenz *et al.* 2017a; Lorenz *et al.* 2017b; Mohan *et al.* 2010; Petersen *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2010). These aggregations may lead to abnormal food intake rates as shown by Zhu *et al.* (2010) for *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles, or, as assumed by our previous work, may lead to reduced assimilation of substances at the gut epithelia or peritrophic membrane (Lorenz *et al.* 2017b). However, effects of nanoparticles that have aggregated within the lumen of the intestinal tract of animals are largely unknown and were not object of our study. Moreover, we did not find any indication for cellular uptake of the MAMSNs in our study. However, as mentioned before, the mechanisms for cellular uptake of nanoparticles are very complex. Therefore, we cannot exclude any uptake of SiO₂ nanoparticles of 100 nm size into cells of *C. riparius* under all circumstances, particularly since for example Huang *et al.* (2010) found cellular uptake of SiO₂ nanoparticles into cultivated human melanoma cells. Possibly, intracellular uptake of MAMSNs in our study was impeded by, amongst other parameters, the experimental setup, nanoparticle characteristics like size, shape and/or surface, or by a protein corona (Shang *et al.* 2014), but further research is urgently needed to answer this question. In addition, the uptake of individual nanoparticles could not be analyzed by confocal microscopy, since the resolution was too low to display single particles (Schultz *et al.* 2015). Therefore, we cannot reject the assumption of cellular uptake under the experimental conditions completely, however, we are able to exclude that such mechanism occurs to great extent.

From a practical point of view, we can recommend the MAMSNs and also larvae of *C. riparius* for confocal microscopy studies.

Acknowledgements

The study is part of the intramural graduate program “EXPAND” funded by the Excellence Initiative of Eberhard Karls University Tübingen. Moreover, we thank Nina Glöckner for technical advice at the confocal microscope.

References

Albanese A, Tang PS, and Chan WC. 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering* 14:1-16.

Armitage PD, Cranston PS, and Pinder LCV. 1995. *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. London: Chapman & Hall.

Bacchetta R, Santo N, Fascio U, Moschini E, Freddi S, Chirico G, Camatini M, and Mantecca P. 2012. Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. *Nanotoxicology* 6:381-398.

Baun A, Sørensen SN, Rasmussen R, Hartmann NB, and Koch CB. 2008. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C₆₀. *Aquatic Toxicology* 86:379-387.

Delay M, and Frimmel FH. 2012. Nanoparticles in aquatic systems. *Analytical and bioanalytical chemistry* 402:583-592.

Hartland A, Lead JR, Slaveykova V, O'Carroll D, and Valsami-Jones E. 2013. The environmental significance of natural nanoparticles. *Nature Education Knowledge* 4:7.

He C, Hu Y, Yin L, Tang C, and Yin C. 2010. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31:3657-3666.

Hochella MF, Lower SK, Maurice PA, Penn RL, Sahai N, Sparks DL, and Twining BS. 2008. Nanominerals, mineral nanoparticles, and earth systems. *Science* 319:1631-1635.

Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, and He J. 2010. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials* 31:438-448.

Johnston BD, Scown TM, Moger J, Cumberland SA, Baalousha M, Linge K, van Aerle R, Jarvis K, Lead JR, and Tyler CR. 2010. Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO₂, CeO₂, and ZnO to fish. *Environmental science & technology* 44:1144-1151.

Klaus AV, and Schawaroch V. 2006. Novel methodology utilizing confocal laser scanning microscopy for systematic analysis in arthropods (Insecta). *Integrative and Comparative Biology* 46:207-214.

Koga R, Tsuchida T, and Fukatsu T. 2009. Quenching autofluorescence of insect tissues for in situ detection of endosymbionts. *Applied Entomology and Zoology* 44:281-291.

- Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli MP, Åberg C, Dawson KA, and Salvati A. 2012. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS nano* 6:5845-5857.
- Lorenz CS, Wicht A-J, Guluzada L, Crone B, Lee HJ, Karst U, Triebkorn R, Haderlein SB, Huhn C, and Köhler H-R. 2017a. Nano-sized zeolites as modulators of thiacloprid toxicity on *Chironomus riparius*. *PeerJ*. 2017; 5: e3525.
- Lorenz CS, Wicht A-J, Guluzada L, Luo L, Jäger L, Crone B, Karst U, Triebkorn R, Liang Y, Anwander R, Haderlein SB, Huhn C, and Köhler H-R. 2017b. Nano-sized Al₂O₃ reduces acute toxic effects of thiacloprid on the non-biting midge *Chironomus riparius*. *PLOS ONE* 12: e0176356. 10.1371/journal.pone.0176356
- Mohan N, Chen C-S, Hsieh H-H, Wu Y-C, and Chang H-C. 2010. In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*. *Nano letters* 10:3692-3699.
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao A-J, Quigg A, Santschi PH, and Sigg L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17:372-386.
- Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, and Thompson M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials* 8:543-557.
- Oberdörster G. 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine* 267:89-105.
- Oberdörster G, Oberdörster E, and Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*:823-839.
- Petersen EJ, Akkanen J, Kukkonen JV, and Weber Jr WJ. 2009. Biological uptake and depuration of carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental science & technology* 43:2969-2975.
- Savolainen K, Alenius H, Norppa H, Pylkkänen L, Tuomi T, and Kasper G. 2010. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies - a review. *Toxicology* 269:92-104.
- Schultz C, Powell K, Crossley A, Jurkschat K, Kille P, Morgan AJ, Read D, Tyne W, Lahive E, Svendsen C, and Spurgeon D. 2015. Analytical approaches to support current understanding of exposure, uptake and distributions of engineered nanoparticles by aquatic and terrestrial organisms. *Ecotoxicology* 24:239-261. 10.1007/s10646-014-1387-3
- Scown T, Van Aerle R, and Tyler C. 2010. Review: do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? *Critical reviews in toxicology* 40:653-670.

Shang L, Nienhaus K, and Nienhaus GU. 2014. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology* 12:1.

Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu C-W, and Lin VS-Y. 2008. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced drug delivery reviews* 60:1278-1288.

Thimm T, and Tebbe CC. 2003. Protocol for rapid fluorescence in situ hybridization of bacteria in cryosections of microarthropods. *Applied and environmental microbiology* 69:2875-2878.

Verma A, and Stellacci F. 2010. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small* 6:12-21.

Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang X, Chen C, and Zhao Y. 2011. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small* 7:1322-1337.

Zhu X, Chang Y, and Chen Y. 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 78:209-215.

Publikationsliste

Originalpublikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften

Lorenz, C.S., Wicht, A.-J., Guluzada, L., Crone, B., Lee, H.J., Karst, U., Triebkorn, R., Haderlein, S.B., Huhn, C., Köhler, H.-R.: Nano-sized zeolites as modulators of thiacloprid toxicity on *Chironomus riparius*. PeerJ. 2017; 5: e3525.

Lorenz, C.S., Wicht, A.-J., Guluzada, L., Luo, L., Jäger, L., Crone, B., Karst, U., Triebkorn, R., Liang, Y., Anwander, R., Haderlein, S.B., Huhn, C., Köhler, H.-R.: Nano-sized Al₂O₃ reduces acute toxic effects of thiacloprid on the non-biting midge *Chironomus riparius*. PLOS ONE. 2017; 12(5): e0176356.

Tagungsbeiträge

SETAC Europe, 27. Jahrestagung der Society of Environmental Toxicology and Chemistry in Brüssel, Belgien (2017)

Poster: Wicht, A.-J., Lorenz, C.S., Früh, E., Guluzada, L., Köhler, H.-R., Dietz, S., Haderlein, S., Huhn, C.: Quantification of pesticides in fungi and midge larvae in the presence of nanoparticles

ANAKON in Tübingen, Deutschland (2017)

Poster: Wicht, A.-J., Lorenz, C.S., Früh, E., Guluzada, L., Köhler, H.-R., Dietz, S., Haderlein, S., Huhn, C.: Quantification of pesticides in fungi and midge larvae in the presence of nanoparticles

Young Environmental Scientists Meeting der SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) in Stockholm, Schweden (2017)

Vortrag: Wicht, A.-J., Lorenz, C.S., Guluzada, L., Haderlein, S.B., Köhler, H.-R., Huhn, C.: Investigation of the influence of pesticide sorption to nanoparticles on the mortality of chironomids

Meeting StEvE (*Meeting of Students in Evolution and Ecology*) in Tübingen, Deutschland (2016)

Vortrag: Lorenz, C.S., Guluzada, L., Luo, L., Wicht, A.-J., Früh, E., Dietz, S., Huhn, C., Haderlein, S.B., Köhler, H.-R.: Ecotoxicity of particle-associated compounds – EXPAND

Jahrestagung der SETAC GLB (Society of Environmental Toxicology and Chemistry, German Language Branch) in Tübingen, Deutschland (2016)

Vortrag: Lorenz, C.S., Jäger, L., Guluzada, L., Luo, L., Wicht, A.-J., Crone, B., Karst, U., Huhn, C., Liang, Y., Anwander, R., Haderlein, S.B., Köhler, H.-R.: Die Toxizität von Thiacloprid in Kombination mit verschiedenen Nanopartikeln auf Larven der Zuckmücke *Chironomus riparius*

Poster: Luo, L., Guluzada, L., Lorenz, C.S., Liang, Y., Haderlein, S.B., Köhler, H.-R., Anwander, R.: Synthesis of Al₂O₃ Nanoparticles and Its Performance in Pesticides Sorption and Effects on Aquatic Invertebrates

Poster: Wicht, A.-J., Lorenz, C.S., Schäfer, C., Köhler, H.-R., Huhn, C.: Determination of the neonicotinoid thiacloprid in *Chironomus riparius* larvae and toxicity changes upon its binding to nanoparticles

SETAC Europe, 26. Jahrestagung der Society of Environmental Toxicology and Chemistry in Nantes, Frankreich (2016)

Vortrag: Lorenz, C. S., Jäger, L., Guluzada, L., Luo, L., Wicht, A.-J., Huhn, C., Liang, Y., Haderlein, S. B., Köhler, H.-R.: Al₂O₃ nanoparticles reduce toxic effects of thiacloprid on the non-biting midge *Chironomus riparius*

Jahrestagung der SETAC GLB (Society of Environmental Toxicology and Chemistry, German Language Branch) in Zürich, Schweiz (2015)

Poster: Lorenz, C. S., Jäger, L., Guluzada, L., Luo, L., Liang, Y., Anwander, R., Haderlein, S. B., Köhler, H.-R.: Effect of Al₂O₃ nanoparticles on the toxicity of the neonicotinoid insecticide thiacloprid

SETAC Europe, 25. Jahrestagung der Society of Environmental Toxicology and Chemistry in Barcelona, Spanien (2015)

Posterpräsentation innerhalb einer Poster-Corner mit anschließender Diskussionsrunde: Lorenz, C. S., Jäger, L., Guluzada, L., Luo, L., Liang, Y., Anwander, R., Haderlein, S. B., Köhler, H.-R.: Do nanoparticles affect the toxicity of neonicotinoid insecticides?

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen im Institut für Evolution und Ökologie, Lehr- und Forschungsbereich Physiologische Ökologie der Tiere angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Heinz-R. Köhler, der mir die Möglichkeit gab, in der Arbeitsgruppe Physiologische Ökologie der Tiere zu promovieren und mir immer beratend und unterstützend zur Seite stand. Auch meiner Zweitbetreuerin Prof. Dr. Carolin Huhn möchte ich ganz herzlich für ihren konstruktiven Rat und Beistand danken. Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Rita Triebkorn, die mir ebenfalls mit Rat und Unterstützung zur Seite stand.

Der Eberhard Karls Universität Tübingen danke ich vielmals für die Finanzierung meiner Arbeit, welche als ein Teil des Promotionsverbundes „EXPAND“ aus Mitteln der Exzellenzinitiative gefördert wurde. Darüber hinaus möchte ich mich für weitere finanzielle Unterstützung bei der Reinhold-und-Maria-Teufel-Stiftung Tuttlingen bedanken. Durch deren Beihilfen wurde mir die Teilnahme an diversen Kongressen ermöglicht.

Für fruchtbare Gespräche und Beratungen möchte ich dem gesamten EXPAND Team, bestehend aus meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Heinz-R. Köhler und Prof. Dr. Carolin Huhn, sowie Prof. Dr. Stefan Haderlein, Prof. Dr. Reiner Anwander, Dr. Yucang Liang, Dr. Sandra Dietz, Dr. Martin Pattky, Jorina Wicht, Leyla Guluzada, Leilei Luo und Elisabeth Früh meinen Dank aussprechen. Auch den Kooperationspartnern Prof. Dr. Uwe Kast und Barbara Crone von der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Nina Glöckner danke ich für die Unterstützung bei der Konfokalmikroskopie.

Ein großes Dankeschön möchte ich an meine Kollegen richten (in alphabetischer Reihenfolge): Dr. Andreas Dieterich, Margret Galli, Christine Hepper, Stefanie Jacob, Stefanie Kraus, Katharina Peschke, Hannah Schmiege, Simon Schwarz, Mona Schweizer, Paul Thellmann, Sabrina Wilhelm und Michael Ziegler. Euch danke ich für das angenehme Arbeitsklima und bin froh, dass viele von Euch nicht nur zu meinen Kollegen, sondern inzwischen auch zu meinen Freunden zählen.

Schlussendlich geht ein riesengroßes Dankeschön an meine liebe Familie und meinen Freund Paul, die mir immer den Rücken freigehalten haben und auf deren Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte.