

TEXTE

29/2013

# Anwendung zweier am häufigsten verwendeter Nanomaterialien wie Titandioxid und Silber, sowie Gold, in den grundlegenden Testverfahren zur Charakterisierung dieser Substanzen

Kurzfassung



UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES  
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,  
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungskennzahl 3709 65 416  
UBA-FB 001715/KURZ

## **Anwendung zweier am häufigsten verwendeter Nanomaterialien wie Titandioxid und Silber, sowie Gold, in den grundlegenden Testverfahren zur Charakterisierung dieser Substanzen**

### **Kurzfassung**

von

**Dr. Kerstin Hund-Rinke**

**Dr. Thorsten Klawonn**

Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie  
IME, Schmallenberg

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

**UMWELTBUNDESAMT**

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter <http://www.uba.de/uba-info-medien/4462.html> verfügbar.

Die in der Studie geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

ISSN 1862-4804

Durchführung der Studie:	Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie Auf dem Aberg 1 57392 Schmallenberg
Abschlussdatum:	Dezember 2012
Herausgeber:	Umweltbundesamt Wörlitzer Platz 1 06844 Dessau-Roßlau Tel.: 0340/2103-0 Telefax: 0340/2103 2285 E-Mail: <a href="mailto:info@umweltbundesamt.de">info@umweltbundesamt.de</a> Internet: <a href="http://www.umweltbundesamt.de">http://www.umweltbundesamt.de</a> <a href="http://fuer-mensch-und-umwelt.de/">http://fuer-mensch-und-umwelt.de/</a>
Redaktion:	Fachgebiet IV 2.2 Arzneimittel, Wasch- und Reinigungsmittel Dr. Doris Völker

Dessau-Roßlau, April 2013

# 1 Einführung

Im November wurde von der Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN) der OECD das Sponsorship Programm ins Leben gerufen. Neben den OECD-Mitgliedern sind auch weitere Länder, Industrievereinigungen und NGO's vertreten. Ziel ist es, in einer konzertierten Aktion, Untersuchungen zur Gefährdungsabschätzung von Nanomaterialien zu initiieren. Hierfür einigte man sich auf 13 industrierelevante Materialgruppen, für die jeweils wiederum mehrere spezifische Nanomaterialien ausgewählt wurden. Ferner einigte man sich auf eine Liste von Endpunkten, die für die ausgewählten Substanzen adressiert werden sollen. Durch die systematische Untersuchung dieses repräsentativen Sets an Nanomaterialien verspricht man sich wertvolle Erkenntnisse zur potentiellen Beeinträchtigung von menschlicher Gesundheit und Umwelt.

Aufgrund seiner Rolle als Sponsor für TiO<sub>2</sub> und als Co-sponsor für Silber ist Deutschland in die Gefährdungsabschätzung speziell dieser zwei Materialien verstärkt involviert. Da ökotoxikologische Daten aus standardisierten Testverfahren für die ausgewählten Nanomaterialien fehlten und auch manche offene Fragen im Hinblick auf die Testdurchführung bestanden, bestand das Ziel des vorliegenden Projektes darin, einen Beitrag zu folgenden Themenfeldern zu leisten:

- Empfehlungen hinsichtlich einer potentiellen Anpassung der OECD-Richtlinien für die Untersuchung von Nanomaterialien
- Empfehlungen zur Applikation der untersuchten Nanomaterialien
- Ökotoxizität von TiO<sub>2</sub> und Silber auf
  - Die Regenwurmreproduktion
  - Die Respirationsrate der Bodenmikroflora
  - Die Nitrifikationsleistung der Bodenmikroflora
  - Die Keimung und das Wachstum von Pflanzen
  - Die Reproduktion von Chironomiden
  - Die Reproduktion von Daphnien
- Ökotoxizität von Gold auf
  - Das Wachstum von Grünalgen
  - Die Immobilisation von Daphnien
  - Die Entwicklung von Fischembryos
  - Die Reproduktion von Chironomiden

In einem ersten Schritt wählte das Umweltbundesamt verschiedene Nanomaterialien aus der Liste der OECD-Materialien aus. Die durchzuführenden Tests wurden auf Grundlage prioritär zu untersuchenden Materialien und dazu bereits vorliegenden Informationen ausgewählt. Das Untersuchungsprogramm des vorliegenden Projektes ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Nanopartikel und Testverfahren in dem vorliegenden Projekt**

	Titandioxid					Silber	Gold
	Produktname / Codename <sup>1</sup> / Hersteller						
OECD Richtlinie	Aeroxid® P25 Evonik <sup>2</sup>	PC105 (NM-102): Crystal Global	Hombikat UV 100 (NM-101): Sachtleben	UV TITAN M212 (NM-104): Sachtleben	UV TITAN M262 (NM-103): Sachtleben	Ag Pure W10 (NM-300K): rent a scientist	Gold (NM-330): Südafrika - MINTEK
201 (Algen – Wachstum)							x
202 – (Daphnien - Immobilisation)							x
211 (Daphnien - Reproduktion)	x						
219 (Chironomiden - Entwicklung)	x		x			x	x
Draft – Fisch-embryo-test(Entwicklung)							x
222 (Regenwurm - Reproduktion)	x		x		x	x	
208 (Pflanzen - Keimung, Wachstum)	x						
216/217 (Bodenmikroflora N- und C-Transformation)	x						

<sup>1</sup> in Klammern: Code des Materials gemäß OECD-Sponsorship Programm; <sup>2</sup> P25 wurde von Evonik verteilt; bei dem OECD Material NM-105 handelt es sich auch um das Produkt AEROXIDE® TiO<sub>2</sub> P25, jedoch um einen anderen Batch

## 2 Vorversuche

Ein entscheidender Schritt im Rahmen der ökotoxikologischen Prüfung ist die Zugabe der Testsubstanz zu dem Testmedium, da hierdurch die Biofügbarkeit und folglich die Toxizität beeinflusst wird. Noch gibt es keine spezifische Anweisung für die Untersuchung von Nanomaterialien. Durch Vorversuche sollten daher Hinweise auf geeignete Applikationsformen von Nanomaterialien gewonnen werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf den terrestrischen Testverfahren. Für die Tests mit Daphnien und Chironomiden wurde auf das Verfahren zurückgegriffen, dass anhand des Algentests vom Auftragnehmer über systematische Untersuchungen entwickelt worden war (Hund-Rinke et al. 2010 <sup>1</sup>). Ergänzende Untersuchungen betrafen die Einbindung von Filtration bzw. die Anwendung von Stabilisatoren sowie die Sorption von P25 an Algen, um die Häufigkeit der Futterzugabe im chronischen Daphnientest festzulegen.

---

<sup>1</sup> Hund-Rinke, K., Schlich, K., Wenzel, A.: TiO<sub>2</sub> nanoparticles - Relationship between dispersion preparation method and ecotoxicity in the algal growth test. Umweltwiss. Schadst. Forsch. 22 (2010) 5 S. 517-528.

### *Terrestrische Testverfahren*

Informationen zur Applikation in terrestrische Tests und zur Homogenität des Spikens von Feststoffen wurden am Beispiel des Regenwurmtests und Tests zur Bodenmikroflora gewonnen. Hierbei wurden verschiedene Applikationstechniken erprobt:

- Applikation als Dispersion
- Applikation als Feststoff
- Applikation in Boden
- Applikation in Futter

Aufgrund der hierbei gewonnenen Ergebnisse wurde folgende Vorgehensweise für die eigentliche Testung beschlossen:

- $\text{TiO}_2$  – pulverförmiger, unlöslicher Feststoff: Applikation über Suspension und über Feststoff in Boden und Futter (Rinderdung); Applikation über Feststoff in Boden erfolgt über ein Trägermaterial (luftgetrockneter Testboden; aufgrund der großen Materialmenge, die zugesetzt werden musste, wurde bei dem Spiken von Dung die Verwendung eines zusätzlichen Trägermaterials als nicht notwendig angesehen)
- Ag – Dispersion in Form von NM-300 K: Applikation über ein festes Trägermaterial (Boden), mit dem die Testsubstanz vermischt wird und die zu Boden zugegeben wird. Aufgrund der geringen Futtermenge im Vergleich zum Boden, wird bei der Zugabe auf Futter die wässrige Originalsubstanz direkt auf die Gesamtmenge an Dung gegeben.

Für Gold wurden keine terrestrischen Tests durchgeführt.

## **3 Haupttests**

Eine kurze Ergebnisübersicht findet sich in Tabelle 2. Hinweise auf Besonderheiten für einzelne Tests sind im Anschluss dargestellt.

Die **TiO<sub>2</sub> Nanomaterialien** waren als Pulver erhältlich. Die Ergebnisse sind als [mg TiO<sub>2</sub>/kg] bzw. [mg TiO<sub>2</sub>/L] aufgeführt. **Silber** was als Dispersion erhältlich. Neben der Gesamtkonzentration wurden in Boden und Sediment auch die ionische Silberkonzentration über DGT (diffusive gradient in thin films) bestimmt. Die Effektwerte werden daher sowohl bezogen auf die Nominalkonzentration als auch auf die Konzentration an Silberionen dargestellt. Die gemessene **Goldkonzentration** in NM-330 lag deutlich unter dem vom Hersteller mitgeteilten Wert (Soll: 0,01 % entsprechend 100 mg/L; gemessen: 43,8 mg/L). Das NIST Referenzmaterial 8011 (Goldnanopartikel, nominale Partikelgröße 10 nm) sowie eine Standardsilberlösung wurden immer gemeinsam mit allen Proben bestimmt. Beide Materialien zeigten eine Wiederfindung von ca. 100 %. Da Details zur angewendeten Analysenmethode des Herstellers von NM-330 nicht bekannt sind, kann die Diskrepanz der Ergebnisse bei dem Material NM-330 nicht erklärt werden. Wegen dieser Diskrepanz werden bei den ökotoxikologischen Tests die Test- und Effektkonzentrationen als % NM-330 (v/v) in der Testsuspension angegeben.

**Tabelle 2: Zusammenfassung der Ökotoxizität der verwendeten Nanomaterialien**

Test	Richtlinie	Nanomaterial	Ergebnis
<b>TiO<sub>2</sub></b>			
Regenwurm	OECD 222	P25, NM-101	Konzentrationsabhängige Stimulation im Winter bei Test in natürlichem Boden
		NM-103	Kein hemmender Effekt bis zur höchsten Testkonzentration Reproduktion: NOEC ≥ 400 mg/kg
Mikroflora – N-Transformation	OECD 216	P25	Gesteigerte Nitrifikationsraten bei Pulverapplikation Pulverapplikation: NOEC 9,3 mg/kg Applikation über Dispersion: NOEC ≥ 21 mg/kg (höchste Testkonzentration)
Mikroflora – Kohlenstoff-Transformation	OECD 217	P25	Kein hemmender Effekt bis höchste Testkonzentration Pulverapplikation: NOEC ≥ 100 mg/kg Applikation über Dispersion: NOEC ≥ 21 mg/kg
Pflanze (Bohne, Senf, Hafer)	OECD 208	P25	<u>Keimung und Wurzelwachstum</u> : kein Effekt bis zur höchsten Testkonzentration (Pulverapplikation 100 mg/kg; Dispersion 20 mg/kg); <u>Frischmasse</u> : kein Effekt bei Senf NOEC: Hafer: 67,0 mg/kg; Bohne: 44,0 mg/kg
Daphnien	OECD 211	P25	Medienwechsel: 3 mal wöchentlich bzw. täglich; Ultraschallbehandlung: 3 min oder 30 min: kein Effekt bis zur höchsten Testkonzentration (5 mg/L)
Chironomiden	OECD 219	P25, NM-101	Kein Effekt bis zur höchsten Testkonzentration (100 mg/L)
<b>NM-300K</b>			
Regenwurm	OECD 222	NM-300K	NOEC Reproduktion < 15 mg/kg (< 65,5 * 10 <sup>-3</sup> µg/kg) <sup>1</sup> (niedrigste Testkonzentration)
Chironomiden	OECD 219	NM-300K	Entwicklungsrate: NOEC 0,625 mg/L (4 µg/L) <sup>1</sup> Schlupf: NOEC 1,250 mg/L (19 µg/L) <sup>1</sup>
<b>NM-330 / NM-330DIS</b>			
Chironomiden	OECD 219	NM-330	Kein Effekt bis zur höchsten Testkonzentration Schlupf (beide Geschlechter zusammen): NOEC ≥ 50 % Entwicklungszeit (beide Geschlechter zusammen): NOEC ≥ 50 %
		NM-330DIS	Schlupf (beide Geschlechter zusammen): NOEC 10 %; Entwicklungszeit (beide Geschlechter zusammen): NOEC 10 %



**Tabelle 2 fortgesetzt**

Test	Richtlinie	Nanomaterial	Ergebnis
<b>NM-330 / NM-330DIS</b>			
Daphnien	OECD 202	NM-330	Kein Effekt bis zur höchsten Testkonzentration NOEC ≥ 50 %
		NM-330DIS	NOEC 2,5 %
Algen	OECD 201	NM-330	Biomasse, Wachstum: NOEC 0,63 %
		NM-330DIS	Biomasse, Wachstum: NOEC < 0,63 % (niedrigste Testkonzentration)
Fischembryotest	OECD Draft	NM-330	Kein Effekt bis zur höchsten Testkonzentration Embryoentwicklung: LC <sub>10</sub> > 50 % Schlupf: EC <sub>10</sub> > 50 %
		NM-330DIS	Embryoentwicklung: LC <sub>10</sub> 48 % (48 H9; LC <sub>50</sub> 10 % (48 h) Schlupf: EC <sub>10</sub> 1,2 % (72 h); EC <sub>50</sub> 10 % (72 h) 96 h: EC Werte nicht berechenbar (10 % Dispersion vergleichbar zur Kontrolle; 50 % Dispersion 100 % Effekt)

<sup>1</sup> Erster Wert (nicht in Klammer): bezogen auf die Nominalkonzentration; zweiter Wert (Wert in Klammer): bezogen auf die mittels DGTs gemessene Ionenkonzentration im Sedimentporenwasser

Im Folgenden werden, sofern relevant, spezifische Informationen für einzelne Tests dargestellt. Eine Wiederholung der Ergebnisse, die in der Tabelle aufgeführt sind, erfolgt in dieser Kurzfassung nicht, sodass einige Tests im Folgenden nicht erwähnt werden.

#### Regenwurmtest – TiO<sub>2</sub>

In den Kontrollansätzen ergab sich eine geringere Anzahl an Nachkommen wenn der Test im Winter in natürlichem Boden durchgeführt wurde. Für die ungecoateten Materialien P25 und NM-101 wurde dies nicht beobachtet, so dass sich eine Stimulation der Reproduktionsleistung im Vergleich zur Kontrolle ergab. Es gibt Hinweise, dass die biologische Uhr durch TiO<sub>2</sub> gestört wird. Bei dem gecoateten Nanomaterial NM-103 traten keine Unterschiede zur Kontrolle auf.

#### Regenwurmtest – Ag

Zusätzlich zu der Nachkommenanzahl wurde die Silberkonzentration im Wurm nach dessen Entkoten bestimmt. In den Kontrollwürmern sowie den Würmern, die in Böden mit Dispersanten inkubiert worden waren, wurde kein Silber detektiert. Geringe Gehalte ergaben sich dagegen bei den Würmern, die in Boden mit NM-300K (Nanosilber) inkubiert worden waren. Ein Unterschied zwischen den Applikationsformen (Spiken von Boden oder Futter) zeigte sich nicht. Auch war keine Abhängigkeit von der Silberkonzentration im Boden bzw. Futter festzustellen. Es wird daher davon ausgegangen, dass bereits bei der niedrigsten Silberkonzentration nahezu ein Gleichgewicht der Silberaufnahme erzielt wurde. Konzentrationsabhängige Effekte bei der Reproduktion traten dagegen bei höheren Konzentrationen im

Umgebungsmedium auf. Daraus wird geschlossen, dass die Fruchtbarkeit der Adulten nicht beeinträchtigt wird, sondern dass die Silber-sensitiven Lebensstadien die Entwicklung der Kokons bzw. der Jungwürmer im Boden darstellen. Welche von beiden der sensitivere Zustand ist, ist unbekannt.

In keinem Testdesign überstieg die Silberkonzentration im Wurm die Konzentration im Testgefäß, so dass Akkumulation ausgeschlossen wird. Es können keine Aussagen getroffen werden, ob das Silber im Gewebe oder aufgrund von unvollständigem Entkoten noch im Darm lokalisiert ist. Ebenfalls ist unbekannt, ob das Silber in Partikel oder Ionenform vorliegt.

#### Stickstoff-Transformation – TiO<sub>2</sub>

Die Applikation von Dispersionen führte zu keinem eindeutigen Ergebnis hinsichtlich ihrer Eignung, toxische Effekte hervorgerufen durch das Nanomaterial sichtbar zu machen. Im Gegensatz zur Pulverapplikation war der Unterschied zwischen den Ansätzen mit TiO<sub>2</sub> und den Kontrollansätzen gering und nicht statistisch signifikant. Es wird angenommen, dass die Applikation von TiO<sub>2</sub> über Dispersion nicht zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit für Mikroorganismen geführt hat.

#### Pflanzentest – TiO<sub>2</sub>

Zusätzlich zu den Endpunkten gemäß Richtlinie (Keimung, Biomasse) wurde noch die Wurzellänge detektiert. Es ergaben sich keine signifikanten Effekte auf Keimung und Wurzellänge. Auch wurden keine phytopathologischen Effekte bis zur höchsten Testkonzentration beobachtet (Pulverapplikation: 100 mg/kg; Applikation über Dispersion: 20 mg/kg). Als empfindlichster Endpunkt erwies sich die Biomasse. Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei *Avena sativa* (Saathafer) und *Phaseolus aureus* (Mungbohne) beobachtet. Im Gegensatz zur Pulverapplikation führte die Applikation über Dispersion zu Effekten, die bei der niedrigen Testkonzentration (10 mg/kg) stärker ausgeprägt waren als bei höheren (20 mg/kg). Es wird vermutet, dass durch Agglomeration in der Stammdispersion, die für die höhere Testkonzentration verwendet wurde, die Bioverfügbarkeit sank.

#### Chironomidentest – Test mit Spiken der Wasserphase –TiO<sub>2</sub>, Ag, Au

Es wurde deutliche Sedimentation der Partikel beobachtet, was dazu führte, dass in der überstehenden Wasserphase Partikelkonzentrationen auftraten, die unterhalb der Nachweisgrenze / Bestimmungsgrenze lagen. Nach 28 Tagen (Testende) wurde nahezu das ganze Nanomaterial im Sediment gefunden.

Nach Richtlinie sollen die Larven periodisch gefüttert werden. Bei stark sorbierenden Testsubstanzen besteht jedoch die Möglichkeit, das Futter zu Beginn des Tests auf einmal in das Sediment einzuarbeiten. Da das Sorptionsverhalten an das Futter nicht bekannt war, wurde in einem Versuch dieser Ansatz untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Schlupfrate deutlich verringert war – auch in der Kontrolle. Das Vorgehen einer einmaligen Fütterung wurde daher verworfen und die Larven periodisch gefüttert, auch wenn dadurch eine Sorption der Nanomaterialien an das Futter und damit eine veränderte Exposition nicht ausgeschlossen werden konnte.

#### Chironomidentest – Au

Der Zusatz von NM-330 und NM-330DIS führte zu gefärbten Testansätzen. Die Farbe veränderte sich während der Inkubationsperiode, was auf eine Veränderung des zugesetzten Dispersanten (NM-300DIS) sowie der Goldnanopartikel hindeutete.

In den Ansätzen mit NM-330DIS sank die Sauerstoffkonzentration in der Wasserphase in der höchsten Testkonzentration deutlich unter den Schwellenwert von 60 %. Selbst verstärkte Belüftung half nicht. Gleichzeitig wurde in diesen Testgefäßen eine erhöhte mikrobielle Besiedlung festgestellt.

Die Sauerstoffversorgung wurde werktäglich kontrolliert und lag nie unter der der anderen Gefäße. Ein technischer Effekt als Ursache für den reduzierten Sauerstoffgehalt wird daher ausgeschlossen. Es wird angenommen, dass der mikrobielle Abbau der toten Larven die Ursache für den Abfall der Sauerstoffkonzentration darstellt und dass nicht der niedrige Sauerstoffgehalt die Ursache für den fehlenden Schlupf ist.

#### Akuter Daphnientest – Au

NM-330DIS führte zu einer Reduktion des pH-Wertes und der Sauerstoffkonzentration. Während der pH-Wert noch in dem geforderten Bereich von pH 6 – 8 lag, sank die Sauerstoffkonzentration in allen Testansätzen mit NM-330DIS unter den Schwellenwert von 3 mg/L. Es wird davon ausgegangen, dass der niedrige Sauerstoffgehalt nicht die Ursache für die Toxizität in der höchsten Testkonzentration darstellt. So war die Sauerstoffkonzentration in der niedrigsten und der höchsten Testkonzentration vergleichbar niedrig, in der niedrigsten Testkonzentration wurde aber 0 % und in der höchsten 100 % Effekt ermittelt.

#### Algentest – Au

Aufgrund der limitierten Menge an NM-330 wurde der Test in Multi-well-Platten (96 well- und 24 well Platten) durchgeführt.

Aussagen zur Toxizität von NM-330 konnten nur für die Inkubationsperiode von 24 – 72 h getroffen werden. Die Ansätze mit NM-330DIS konnten dagegen für den gesamten Testzeitraum von 0 – 72 h ausgewertet werden, wobei die Auswertung für NM-330DIS zu vergleichbaren Ergebnissen führte, unabhängig ob der Test von 0 – 72 h oder von 24 – 72 h ausgewertet wurde. Hieraus wurde geschlossen, dass die Ergebnisse für beide Substanzen vergleichbar sind, selbst wenn NM-330 nur für den verkürzten Zeitraum, NM-330DIS dagegen für den kompletten Zeitraum ausgewertet wurden.

Tests in 96 well Platten mit einem Ansatzvolumen von 200 µL pro Vertiefung können verwendet werden, wenn die zur Verfügung stehende Substanzmenge stark limitiert ist. Allerdings ist bei diesen Ansätzen eines der drei Validitätskriterien (mittlerer Variationskoeffizient bei der Section-by-section-Wachstumsrate) nur schwer zu erfüllen. Ein Ansatz von 2 mL (24-well Platten) verbesserte die Validität der Tests. Allerdings schränkt dies die Anzahl an Varianten ein, die parallel untersucht werden können.

Die ermittelten Effektwerte waren für beide Ansatzvolumina vergleichbar.

#### Toxizität von Dispersanten – Ag, Au

Sowohl Silber als auch Gold lagen wurden als Dispersion zur Verfügung gestellt. Sowohl die Dispersion mit Nanomaterial als auch der Dispersant wurden untersucht. Während der Dispersant, der für die Stabilisierung der Silbernanopartikel verwendet wurde, nicht toxisch war, erwies sich der Dispersant für die Goldnanopartikel als toxisch. In Gegenwart von Gold war die Toxizität reduziert, was darauf hindeutet, dass aktive Bindungsstellen des Dispersanten, die mit den Testorganismen reagieren, durch Goldnanopartikel besetzt werden, wodurch die Toxizität schwächer ausfällt. Experimente, Goldnanopartikel anzureichern und damit die Dispersantenkonzentration im Test zu reduzieren, schlugen fehl.

## **4 Empfehlungen zur Testdurchführung**

### **4.1 Eignung der Test-Richtlinien**

Aus unseren Untersuchungen ist ersichtlich, dass die Richtlinien

- OECD Testrichtlinie Nr. 222 (Regenwurmreproduktionstest)
- OECD Testrichtlinie Nr. 216 (Bodenmikroflora: Stickstoff-Transformationstest)
- OECD Testrichtlinie Nr. 217 (Bodenmikroflora: Kohlenstoff-Transformationstest)
- OECD Testrichtlinie Nr. 208 (Pflanzenzest)
- OECD Testrichtlinie Nr. 219 (Chironomidentest mit Spiken der Wasserphase)
- OECD Testrichtlinie Nr. 211 (Daphnienreproduktionstest)
- OECD Testrichtlinie Nr. 202 (Daphnienakutttest)
- OECD Draft - Fischembryotest

verwendet werden können, um feste oder dispergierte Nanomaterialien zu untersuchen. Modifikationen in der Testdurchführung werden als nicht notwendig erachtet. Dies gilt jedoch nicht für die Applikation der Testsubstanzen in die Testmedien.

### **4.2 Applikation der Nanomaterialien in feste Testmedien**

Für ein Spiken von Feststoffen (z.B. Boden) mit Nanopartikeln als Feststoff wird die Zugabe über ein Feststoff (z.B. Testboden)-Nanopartikel-Gemisch (1 % vom Endgewicht) empfohlen. Eine Applikation in Form von Dispersionen wird als weniger geeignet angesehen. Diese Empfehlung wird damit begründet, dass in den meisten Tests, bei denen eine konzentrationsabhängige Wirkung bei einer Feststoffapplikation beobachtet wurde, diese bei Applikation der Nanopartikel in Form von Dispersionen nicht auftrat. Dies ergab sich beispielsweise bei folgenden Tests:

- Pflanzenzest mit *Avena sativa* – Wachstum
- Bodenmikroflora: Stickstoff-Transformation
- Regenwurmreproduktion

### **4.3 Spiken von Boden bzw. Spiken von Futter**

Es konnte kein offensichtlicher Unterschied in den Ergebnissen festgestellt werden, ob eine Exposition der Regenwürmer über gespiktes Futter oder gespikten Boden erfolgte. Es wird daher ein Spiken des Bodens empfohlen, da dies konform zu der jetzigen Vorgehensweise nach OECD-Richtlinie 222 (Regenwurmreproduktionstest) ist.

### **4.4 Spiken von wässrigen Testmedien mit unlöslichen Nanomaterialien, die pulverförmig vorliegen**

Es konnte keine Einschränkung in der bereits im Vorfeld dieses Projektes erarbeiteten Vorgehensweise zur Applikation von festen unlöslichen Nanomaterialien in wässrige Testmedien ermittelt werden (Hund-Rinke et al., 2010):

- Zugabe der für die Testkonzentration benötigten Materialmenge in das jeweilige Testmedium
- Kurzes Rühren auf dem Magnetrührer (1 min)
- Kurze Behandlung im Ultraschallbad (3 min, 500 W; Bandelin Sonorex RK 514 BH; 35 kHz; 215/860 W)

Filtration und die Verwendung von synthetischen Stabilisatoren (z.B. Natriumhexamethaphosphat 0.01 %) werden nicht empfohlen.

Für Nanomaterialien, die als wässrige Dispersion vorliegen, erwies sich ein Einmischen in das Testmedium auf dem Magnetrührer als ausreichend.

#### **4.5 Sensitivität der Testsysteme**

Es wurde beobachtet, dass keine Effekte (z.B. bei TiO<sub>2</sub>) in aquatischen Tests (Daphnien, Chironomiden) auftraten, doch terrestrische Organismen (Regenwürmer, Bodenmikroflora) beeinträchtigt wurden. Hieraus ergibt sich die Empfehlung, dass im Rahmen einer umfassenden Teststrategie terrestrische und aquatische Tests parallel durchgeführt werden sollten. Dies steht im Gegensatz zu der jetzigen Vorgehensweise bei REACH, wo terrestrische Tests im Gegensatz zu aquatischen Tests erst bei höheren Tonnagemengen gefordert werden. Bei dieser Empfehlung muss jedoch berücksichtigt werden, dass das aquatische Untersuchungsprogramm im Rahmen des vorliegenden Projektes nur einen eingeschränkten Satz an Testorganismen aufwies. Die Einbeziehung von Studien zur Fisch- und Algentoxizität könnte zu einer Modifikation der Schlussfolgerung führen, auch wenn die in der Literatur berichteten Ergebnisse nicht auf eine hohe Toxizität der untersuchten Nanomaterialien für diese Organismen hindeuten.

#### **4.6 Toxizität von Dispersanten**

Silber- und Gold-Nanopartikel standen nur als Dispersion zur Verfügung. Der Dispersant des Goldnanomaterials erwies sich als toxisch. Da die Versuche das Gold anzukonzentrieren fehlschlugen, wurde das ganze Produkt getestet. Die Ergebnisse lassen damit nur eine Beurteilung des gesamten Produktes zu und erlauben keine Rückschlüsse auf die Toxizität der Goldnanopartikel allein. Es wird empfohlen, dass die Hersteller für die Untersuchung im Rahmen von regulatorischen Fragestellungen auch das Nanomaterial ohne Dispersant zur Verfügung stellen. In der Umwelt werden sich Dispersant und Nanomaterialien trennen, so dass Informationen über das Verhalten und der Effekte reiner Nanopartikel benötigt werden.

#### **4.7 Gesamtkonzentration vs. Ionenkonzentration**

Für Ionen-freisetzende Metalle, wie beispielsweise Silber, können die Effektwerte auf Basis der Gesamtgehalte oder auf Basis der Ionenkonzentration angegeben werden. Dabei unterscheiden sich die Resultate deutlich. In unserer Studie differieren die Effektwerte zum Beispiel um den Faktor 10<sup>3</sup> – 10<sup>4</sup>, je nachdem ob der Gesamtgehalt oder die Ionenkonzentration, die über DGTs im Sediment bzw. Boden bestimmt wurde, für die Angabe der Endpunkte (NOEC, EC<sub>x</sub>) herangezogen werden (hier Chironomiden: OECD 219; Regenwürmer: OECD 222). Dies macht deutlich, dass für regulatorische Zwecke die Bezugsgröße eindeutig festgelegt werden muss.