

TEXTE

72/2014

Umweltgefährdung durch ausgewählte TiO_2 Nanomaterialien unter Beachtung relevanter Expositionsszenarien

Kurzfassung

TEXTE 72/2014

Umweltforschungsplan des
Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit

Forschungskennzahl 3710 65 413
UBA-FB 001981/E

Umweltgefährdung durch ausgewählte TiO₂ Nanomaterialien unter Beachtung relevanter Expositionsszenarien

Kurzfassung

von

Anne J. Wyrwoll, Hanna M. Maes, Henner Hollert, Andreas Schaeffer
RWTH-Aachen University, Institute for Environmental Research (Biology V),
Aachen

Anja Meister-Werner, Ralf Petto
Institute for Biological Analysis and Consulting IBACON GmbH, Rossdorf

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber:

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
info@umweltbundesamt.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

 /umweltbundesamt.de

 /umweltbundesamt

Durchführung der Studie:

RWTH-Aachen University, Institute for Environmental Research (Biology V)
Worringerweg 1
52074 Aachen

Abschlussdatum:

November 2013

Redaktion:

Fachgebiet IV 2.2 Pharmaceuticals, Washing and Cleaning Agents
Dr. Doris Völker

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/environmental-hazard-of-selected-tio2-nanomaterials>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, Oktober 2014

Das diesem Bericht zu Grunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit unter der Forschungskennzahl 3710 65 413 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

1 Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Im letzten Jahrzehnt hat sich die Produktion und die Anwendung von Nanomaterialien vervielfacht: So lag der Weltmarkt für Nanotechnologie 2009 bei 11.7 Milliarden US \$ und 2012 bei 20.7 Milliarden US \$ (McWilliams 2012). Ein weiterer Anstieg wird für die nächsten Jahre prognostiziert (48,9 Milliarden US \$ in 2017, McWilliams 2012). Die Europäische Kommission empfiehlt folgende Definition für Nanomaterialien: „Ein „Nanomaterial“ ist ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50% der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben“ (European-Commission 2011/696/EU). Aufgrund der nanoskaligen Dimension haben Nanomaterialien ein größeres Oberfläche-Volumen Verhältnis als ihre nicht nanoskaligen Gegenstücke. Dies bedingt eine größere Oberfläche für Reaktionen wie z.B. photokatalytische Reaktionen (z.B. Nano-Titandioxid, Wang et al. 2006) bzw. katalytische Reaktionen (z.B. Kohlenstoff-Nanoröhrchen, Lu & Wey 2007). Nanomaterialien werden in einer Vielzahl von Produkten und Anwendungen eingesetzt wie z.B. in Körperpflegeprodukten, Lebensmitteln, Getränken, Farben und Plastik, sowie für Abwasserbehandlung und Grundwasserremediation, als Oberflächenbeschichtungen oder als Katalysatoren (Aitken et al. 2006, Wang et al. 2009, Weir et al. 2012). Während der Produktion und Verwendung von Nanomaterialien können diese bewusst oder unbewusst in die Umwelt gelangen, z.B. wenn sie zur Grundwasserremediation eingesetzt werden, oder während des Duschens mit Körperpflegeprodukten, die Nanomaterialien enthalten. Im letzten Fall gelangen Nanomaterialien über das Abwasser in Kläranlagen und können somit potentiell in die aquatische Umwelt bzw. über das Ausbringen von Klärschlamm in die terrestrische Umwelt gelangen (Gottschalk et al. 2009). Trotz des exzessiven Anstiegs der Nanomaterialproduktion und dem damit verbundenen Eintrag in die Umwelt werden die spezifischen Eigenschaften von Nanomaterialien bisher noch nicht in der Umweltrisikobeurteilung beachtet. Erklärt werden kann dies zum einen durch das Fehlen von nanospezifischen Verpflichtungen innerhalb von Regulierungen und zum anderen dadurch, dass geprüfte und standardisierte Methoden (z.B. OECD Richtlinien) bis heute noch nicht ausreichend auf ihre Eignung für Nanomaterialien geprüft worden sind.

2006 realisierte die Organisation für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) die immer größer werdende Lücke zwischen der Verwendung von Nanomaterialien und den Kenntnissen zu ihrem potentiellen Umweltrisiko und gründete die Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN). Innerhalb dieses Förderprogrammes sammeln die Mitgliedsländer und Organisation der OECD WPMN Informationen zur Sicherheit von ausgewählten synthetischen Nanomaterialien. Diese Informationen umfassen Daten zu mehr als 50 Endpunkten u.a. auch zu ökotoxikologischen Endpunkten. Deutschland – als eins der Mitgliedsländer – ist innerhalb der OECD WPMN dafür verantwortlich, Daten über Umweltverhalten und -verbleib und die Ökotoxikologie von nanoskaligem TiO₂ zu erheben. Diese Daten sollen hauptsächlich über die Anwendung von standardisierten OECD Testrichtlinien ermittelt werden. Bis heute ist unklar, ob mit den jeweiligen Endpunkten, welche in diesen Richtlinien gefordert werden, ausreichend die möglichen Umweltauswirkungen synthetischer Nanomaterialien erfasst werden können. Für Nanomaterialien könnte es z.B. zusätzlich wichtig sein, relevante Expositionsszenarien wie Sonnenlicht (I), Mischungstoxizität (II) und embryonale Entwicklung (III), welche nicht alle in den OECD Richtlinien vorgeschrieben sind, während ihrer Testung zu beachten. Es ist wichtig, diesen Szenarien Beachtung zu schenken, da vorige Studien zeigen, dass manche Nanomaterialien wie TiO₂-NM ein phototoxisches

Potential besitzen, mit anderen Co-Kontaminanten interagieren oder einen Einfluss auf embryonale Entwicklungsstadien haben können (Asharani et al. 2011, Fan et al. 2011, Ma et al. 2012, Marcone et al. 2012).

Daher wurde in diesem Projekt das ökotoxikologische Gefährdungspotential von zwei verschiedenen großen TiO₂ Nanomaterialien (Hombikat UV 100 (NM 101), Anatas-Struktur, 7-10 nm und PC 105 (NM 102), Anatas-Struktur 15-25 nm) und einem nicht nanoskaligen TiO₂ Referenzmaterial (Tiona AT 1 (NM 100), Anatas-Struktur, 200-220 nm) für Organismen aus verschiedenen Umweltkompartimenten untersucht. Folgende standardisierte Tests (OECD Richtlinien) wurden dabei angewendet:

- Akuter Daphnien Immobilisationstest, Test Nr. 202 (OECD 2004a)
- Akuter Fischembryo Toxizitätstest, Test Nr. 236 (OECD 2013)
- Belebtschlamm Atmungshemmungstest, Test Nr. 209 (OECD 2010)
- Regenwurm, akuter Toxizitätstest, Test Nr. 207 (OECD 1984)
- Regenwurm, Reproduktionstest, Test Nr. 222 (OECD 2004b)

Die ausgewählten Testrichtlinien decken verschiedene Testorganismen (Daphnien, Fische, Bakterien und Regenwürmer) und Endpunkte ab (Atmung, Mortalität, Mobilität, Reproduktion und embryonale Entwicklung).

Wie weiter oben erklärt, lag der Hauptfokus des Projektes darauf, die TiO₂ Materialien unter relevanten Expositionsszenarien zu testen. Daher wurden (I) der akute Daphnien Immobilisationstest (OECD 2004a) und der Belebtschlamm Respirations Hemmungstest (OECD 2010) unter Bestrahlung mit simuliertem Sonnenlicht durchgeführt. Mischungsexperimente (II) mit TiO₂ und einem organischen Schadstoff (der antimikrobiellen Substanz Triclocarban, TCC) wurden mit dem akuten und chronischen Regenwurmtest (OECD 1984, 2004b) sowie dem Belebtschlamm Respirations Hemmungstest (OECD 2010) durchgeführt. Um einen geeigneten Schadstoff auszuwählen, fand eine ausführliche Literaturstudie statt. In akuten Fischembryo Toxizitätstests (OECD 2013) wurde untersucht, ob die TiO₂ Materialien die embryonale Entwicklung beeinflussen (III).

Ein weiterer Fokus des Projektes war zu überprüfen, ob die verwendeten OECD Richtlinien für die Testung von Nano-TiO₂ geeignet sind. Hierfür wurde ermittelt, ob das vorgeschriebene Testdesign, z.B. die Komposition des Mediums (OECD 2004a) für die Testung von Nano-TiO₂ geeignet ist. Weiterhin wurde untersucht, ob sich durch die Applikation einer TiO₂ Suspension auf Boden reproduzierbar homogene Konzentrationen im Boden herstellen lassen (OECD 1984, 2004b).

Alle TiO₂ Materialien wurden als Beitrag zur Forschung des Förderprogrammes der OECD WPMN bereitgestellt. Chargen der TiO₂ Materialien PC 105 und Tiona AT 1 wurden direkt durch den Hersteller Cristal Global zur Verfügung gestellt. Diese Chargen entsprechen den Nanomaterial Repository NM Serien NM 102 und NM 100 des Joint Research Centre (JRC). Hombikat UV 100 bzw. die NM-Serie NM 101 wurde direkt vom JRC erworben. Um die Lesbarkeit zu erleichtern, werden die TiO₂ Materialien im Folgenden nur noch mit ihren JRC NM Serien Namen NM 100, NM 101 und NM 102 bezeichnet.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 TiO₂ Materialien – Charakterisierung

NM 101 (Hombikat UV 100, primäre Partikelgröße (PP): 7-10 nm, 100% Anatas, Sachtleben), NM 102 (PC 105, PP: 15-25 nm, 100% Anatas, Cristal Global) und NM 100 (Tiona AT 1, PP: 200-220 nm, 100% Anatas, Cristal Global).

Die TiO₂ Pulver wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Röntgenbeugung (XRD) und mittels der Bunauer Emmett und Teller Methode (BET, Brunauer et al. 1938) analysiert.

1.2.2 Herstellung und Charakterisierung der Suspensionen

Generell wurden die TiO₂ Materialien als wässrige Suspensionen ins Testmedium eingebracht, indem eine definierte Menge des TiO₂ Materials in deionisiertem Wasser mit einem Ultraschallfinger suspendiert wurde (200 W, 0.2 s Puls und 0.8 s Pause, Sonopuls HD 2200, Bandelin, Berlin, Deutschland). Anschließend wurden ein Teil der Stamm-Suspension oder daraus mit deionisiertem Wasser hergestellte Verdünnungen (Arbeitssuspension) zum Testmedium gegeben. Der hydrodynamische Durchmesser (HD) und das Zeta Potential (ZP) der Partikel in den Stock- und Arbeitssuspensionen wurden mittels dynamischer und elektrophoretischer Lichtstreuung (DLS und ELS) gemessen (Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien).

1.2.3 Ökotoxizitätstests

Experimente mit Sonnenlicht (I) Akute Daphnien Immobilisationstests (OECD 2004a, 48 h) wurden unter Laborlicht (LL) und unter simuliertem Sonnenlicht (SSL, 280-1000 nm, UVA/UVB Bestrahlungsstärke: 2.5 mW/cm²) in 10-fach verdünntem ISO Medium durchgeführt. In einem zusätzlichen Experiment wurde die Ti-Konzentration im Überstand des ISO Medium gemessen. In diesem Versuch entsprach die nominale TiO₂ Konzentration der EC50 Konzentration (Konzentration bei welcher 50% des untersuchten Effektes im Testsystem auftritt) des jeweiligen TiO₂ Materials. Die Wasserproben (0 h und 48 h) wurden mittels induktiv gekoppeltem Plasma mit optischer Emissionsspektroskopie (ICP-OES) analysiert, nachdem sie mit Mikrowellen unterstütztem Säureaufschluss behandelt wurden. Um zu untersuchen, ob das Testmedium einen Einfluss auf die Ergebnisse der Ökotoxizitätstests der Nanomaterialien hat, wurden NM 101 und NM 102 zusätzlich in unverdünntem ISO Medium (ISO 1996) mit LL und SSR getestet. Zusätzlich zu den Daphnientests wurden auch der Belebtschlamm Atmungshemmungstest (OECD 2010) mit LL (10, 100, 1000 mg/L) und SSL (100 mg/L; 300-800 nm, irradiation UV: 5 mW/cm²) durchgeführt.

Experimente mit Mischungen (II) Mischungsexperimente mit nano-TiO₂ und einem organischen Biozid (Triclocarban, TCC) wurden in Anlehnung an folgende OECD Richtlinien angesetzt: Regenwurm akuter Toxizitätstest (OECD 207, 14 d; mit Exposition gegenüber 1000 mg/kg TiO₂ und TCC Konzentrationen zwischen 42-675 mg/kg), Regenwurm Reproduktionstest (OECD 222, 56 d; mit Exposition gegenüber 400 oder 1000 mg/kg TiO₂ und TCC Konzentrationen zwischen 42-675 mg/kg), sowie Belebtschlamm Atmungshemmungstest (OECD 209, 3 h; mit Exposition gegenüber 100 mg/L TiO₂ und 100 mg/L TCC). Im letzten Test wurden zusätzlich Mischungsexperimente mit nano-TiO₂ und 3,5-Dichlorophenol (mit Exposition gegenüber 100 mg/L TiO₂ und 3,5-DCP, 3.2 mg/L) durchgeführt, da gezeigt werden konnte, dass TCC die Respirationsrate von Mikroorganismen des Belebtschlammes nicht beeinträchtigte. 3,5-Dichlorophenol wurde daher als weitere, toxische Substanz verwendet. TCC wurde in

Bodenproben des Regenwurm Reproduktionstests (TCC und NM 101) mittels Flüssigkeits-Chromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert, nachdem die Bodenproben mit Aceton extrahiert wurden. Ti-Konzentrationen wurden mittels ICP-OES in Bodenproben des akuten Regenwurmtests vermessen. Zuvor wurden die Bodenproben mit Hilfe eines Mikrowellen unterstützten Säureaufschlusses behandelt. In jedem Ökotoxizitätstest wurde auch nicht behandeltes Kontrollmedium (TiO₂ und TCC 0 mg/kg) und Medium, welches nur mit den Einzelsubstanzen behandelt wurde, untersucht.

Embryonale Entwicklung (III) Effekte der TiO₂ Materialien auf die embryonale Entwicklung wurden nach der Richtlinie "Akuter Fischembryotoxizitätstest" untersucht (OECD 236, 96 h; Expositionskonzentration von TiO₂: 1, 10, 100 mg/L).

1.3 Ergebnisse und Diskussion

1.3.1 TiO₂ Material Charakterisierung

Die Charakterisierung der TiO₂ Pulver bestätigte die Herstellerangaben zur Partikelgröße, kristallinen Struktur und BET spezifischen Oberfläche. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse aus DLS (hydrodynamischer Durchmesser, HD, beschreibt das Agglomerationsverhalten der Partikel) und ELS (ZP, Zeta Potential, beschreibt die Stabilität der Partikel in der Suspension) Messungen, dass mit der verwendeten Ultraschallmethode die Partikel reproduzierbar in den Stamm-Suspensionen (1 g/L) verteilt werden konnten. Demzufolge kann diese Methode als Anweisung für die Herstellung von TiO₂ Stamm-Suspensionen für aquatische Ökotoxizitätstests verwendet werden. Obwohl die Verdünnung der Stamm-Suspensionen in den meisten Fällen zu einem vergleichbaren HD der Partikel führte, waren die absoluten Werte der ZP der Partikel in den Verdünnungen niedriger als die der Partikel in der Stocksuspension. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu überprüfen, ob die Nutzung von verdünnten Suspensionen in Bezug auf die Beibehaltung von identischer Stabilität und homogene Verteilung der Partikel zulässig ist, da beide Faktoren notwendig sind, um Nanomaterialtoxizität zu untersuchen. Die HD der Partikel in den Stamm-Suspensionen (1 g/L) sind am kleinsten für das größte Material NM 100 (261 nm), gefolgt von NM 101 (512 nm) und NM 102 (625 nm). Wir nehmen an, dass NM 100 Agglomerate schon während der DLS Messung sedimentieren, so dass nur die NM 100 Partikel in der Wasserphase verbleiben und gemessen werden. Die DLS Messung der NM 101 und NM 102 Suspensionen zeigen, dass sich in der Stocksuspension Agglomerate gebildet haben, deren HD viel größer waren als die zugehörigen primären Partikelgrößen.

1.3.2 Ökotoxizitätstests

In dieser Studie wurden nano- und nicht nanoskalige TiO₂ Materialien nach standardisierten OECD Tests und zusätzlich unter Beachtung von relevanten Expositionsszenarien wie simuliertem Sonnenlicht (SSL), Mischungstoxizität, sowie Effekte auf die embryonale Entwicklung getestet, um zu untersuchen, ob diese Expositionsszenarien einen Einfluss auf den Ausgang der Experimente haben. Um festzustellen, ob die Primärpartikelgröße einen Einfluss auf die potentiellen Effekte der TiO₂ Materialien hat bzw. es sich sogar um nanospezifische Effekte handelt, wurden verschieden große TiO₂ Nanomaterialien (NM 101, NM 102) und ein Nicht-Nano Referenz Material (NM 100) getestet. Von weiterem Interesse war, ob die standardisierten Testrichtlinien für die Testung von Nanomaterialien geeignet sind.

Die standardisierten OECD Tests, welche unter Laborlicht oder Dunkelheit (*D. rerio*) stattfanden, erbrachten folgende Ergebnisse: Außer NM 101 (NOEC 18.5 mg/L) im Daphnien Immobilisationstest wurde für alle Materialien NOEC Werte vom mindesten ≥ 50 mg/L bestimmt. Tabelle 1 fasst die ermittelten NOEC Werte zusammen:

Tab. 1: NOEC Werte der standardisierten OECD Tests (Laborlicht) mit NM 101, NM 102 und NM 100.

OECD Richtlinie	Organismus	Endpunkt (mg/L)	NOEC (mg/L)
OECD 202	<i>Daphnia magna</i>	Mobilität (48 h)	≥ 50 ^a
OECD 236	<i>Danio rerio</i>	Mortalität (96 h)	≥ 100
OECD 209	Belebtschlamm	Respirations Rate (3 h)	≥ 1000
OECD 207 OECD 222	<i>Eisenia fetida</i>	Mortalität(14 d) Reproduktion(56 d)	≥ 1000 ≥ 1000

^a außer für NM 101 (NOEC 18.5 mg/L)

Im Allgemeinen bestätigen Studien, in denen andere TiO₂ Nanomaterialien in ähnlichen Konzentrationen mit Regenwürmern (Heckmann et al. 2011, Hu et al. 2010, McShane et al. 2012, Whitfield Åslund et al. 2011), Fischembryonen (Chen et al. 2011, Zhu et al. 2008) und Belebtschlamm (Zheng et al. 2011) getestet wurden, die von uns gefundenen Ergebnisse. Wie in unserer Studie fanden auch andere Studien, welche Daphnien mit TiO₂ Nanomaterialien exponierten, widersprüchliche Ergebnisse. Manche Materialien beeinträchtigten die Mobilität der Daphnien im mg/L Bereich nicht (Dabrunz et al. 2011, Wiench et al. 2009, Zhu et al. 2010), wohingegen andere in diesem Konzentrationsbereich die Mobilität der Daphnien reduzierten (z.B. EC50 33.7 mg/L, Dalai et al. 2013).

Im Gegensatz zu Studien, welche nach standardisierten OECD Richtlinien durchgeführt wurden, wurden in manchen Studien toxische Effekte von TiO₂ Nanomaterialien beobachtet, wenn andere Endpunkte beobachtet wurden oder die Testdauer verlängert wurde (Chen et al. 2011, Dabrunz et al. 2011, Zhu et al. 2010): Das Schwimmverhalten, beschrieben durch die durchschnittliche und maximale Geschwindigkeit, sowie das Aktivitätsmaß von *D. rerio* Larven wurde von Nano-TiO₂ Konzentrationen zwischen 0,1-1 mg/L nach einer Exposition von 120 h signifikant reduziert (Chen et al. 2011). Zhu et al. und Dabrunz et al. (2010, 2011) zeigten beide, dass eine leicht verlängerte Expositionsdauer zu stärkeren Effekten von nano-TiO₂ auf *D. magna* führte. Die ermittelten EC50 Werte lagen nach 72 h und 96 h Exposition bei 1.62 mg/L (P25, 20% Rutil und 80% Anatas, 21 nm, Zhu et al. 2010) und 0.73 mg/L (A.100, Anatas, 6 nm, Dabrunz et al.). Hingegen lagen die EC50 Werte nach 48 h Exposition bei > 100 mg/L.

In unsere Studie zogen wir keine alternativen Endpunkte in Betracht und verlängerten die Expositionszeit nicht, sondern untersuchten, ob die Beachtung von relevanten Expositionsszenarien wie z.B. Sonnenlicht (I), Mischungstoxizität (II) oder embryonale Entwicklung (III) in standardisierten OECD Tests einen Einfluss auf das Ergebnis der Experimenten mit TiO₂ Materialien hat.

Sonnenlicht (I) Der Daphnien Immobilisationstest demonstrierte, dass SSL die Toxizität aller TiO₂ Materialien im Vergleich zu den Tests unter Laborlicht induzierte bzw. steigerte. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass dieser Effekt für die Nanomaterialien NM 101 und NM 102 (nominal: EC50 0.53 and 1.28 mg/L) stärker ausgeprägt war als für das Nicht-Nano Material NM 100 (nominal: EC50 3.88 mg/L).

Wird der EC50 Wert auf die analytisch gemessenen TiO₂ Konzentrationen bezogen, so liegt der EC50 Wert für z.B. NM 102 (90 µg/L) nah an der modellierten Nano-TiO₂ Konzentration für die aquatische Umwelt (µg/L Bereich, Gottschalk et al. 2009). Demzufolge könnte NM 102 zu Umweltschäden führen, vor allem, wenn beachtet wird, dass die Nano-TiO₂ Produktion in den nächsten Jahren weiter ansteigen wird. Jedoch ist noch unklar, ob die Anwesenheit von natürlichen Komponenten des Oberflächenwassers wie z.B. Humin- und Fulvinsäuren einen Einfluss auf Phototoxizität und ROS Bildung der TiO₂ Materialien hat. Des Weiteren bleibt zu untersuchen, ob die gemessene EC50 Konzentration, welche sich auf die TiO₂ Konzentration in der

obersten Wasserschicht bezieht, ein „worst case scenario“ repräsentiert oder nicht. Um Letzteres zu klären, ist es notwendig zu untersuchen, ob die Partikel in der oberen Wasserphase oder die am Boden sedimentierten Partikel die beobachtete Phototoxizität der TiO₂ Materialien bedingen. Letztendlich vermuten wir, dass die gefundene Phototoxizität der TiO₂ Materialien nicht nur abhängig von einem Faktor, wie z.B. der Photoaktivität (ROS Bildungs Potential) der Partikel ist, sondern zusätzlich von weiteren Faktoren, wie z.B. dem Agglomerationsgrad der Partikel und/oder dem Grad an Partikel/Daphnien Interaktion, abhängt.

Die gleichzeitige Exposition von Belebtschlamm gegenüber verschieden großen TiO₂ Materialien und SSL hatte keinen Effekt auf die Respirationsrate. Es kann angenommen werden, dass das gelöste und partikuläre organische Material des Belebtschlammes die meiste Strahlung absorbierte, welche für die Induktion der ROS Bildung durch die TiO₂ Materialien verantwortlich gewesen wäre. Dadurch kam es entweder zu keiner ROS Bildung, oder nur zu einer niedrigen ROS Bildung, welche keine negativen Effekte auf die Respirationsrate des Belebtschlammes hatte.

Mischungstoxizität (II) In den Mischungsexperimenten mit Belebtschlamm wurde kein Einfluss der verschieden großen TiO₂ Materialien auf die Toxizität des organischen Schadstoffes Triclocarban und des toxischen Referenzmaterials 3,5-Dichlorophenol (3,5-DCP) auf die Mikroorganismen des Belebtschlammes festgestellt.

Im Gegensatz zu den Belebtschlammtests änderten die verschieden großen TiO₂ Materialien die akute und chronische Toxizität von TCC auf den Regenwurm *E. fetida* in einigen der Tests: Im Allgemeinen wurde die Toxizität von TCC entweder nicht verändert, oder sie war niedriger in der Anwesenheit der TiO₂ Materialien als in den Experimenten, in denen Regenwürmer nur mit TCC exponiert wurden. Dies wird besonders deutlich in den akuten Mischungsexperimenten, in denen die Mortalität von *E. fetida* geringer war, wenn Regenwürmer gegenüber TCC und den beiden größeren TiO₂ Materialien exponiert wurde (NM 102 LC10 nicht berechenbar, oder NM 100 LC10 489 mg/kg TG (Trockengewicht) Boden) als wenn sie nur mit TCC exponiert wurden (LC10 243 mg/kg TG Boden). Chronische Regenwurm Mischungsexperimente der Testsequenz A (welche bei IBACON GmbH durchgeführt wurde) zeigten, dass die Reproduktion in Anwesenheit einer hohen NM 101 Konzentration (400 und 1000 mg/kg; EC50 308 und 384 mg/kg TG Boden) durch TCC weniger beeinträchtigt wurde als wenn die Würmer nur mit TCC exponiert wurden (EC50 243 mg/kg TG Boden). Die Ergebnisse der TCC Analytik der Bodenproben lassen darauf schließen, dass ein Abbau von TCC nicht für die beobachteten niedrigeren Effekte auf die Reproduktion in Anwesenheit von TCC und NM 101 verantwortlich war, da TCC innerhalb des Testzeitraumes von 56 Tagen in Anwesenheit von NM 101 nicht abgebaut wurde.

In der Testsequenz B (welche an der RWTH Aachen durchgeführt wurde) wurde die Reproduktion durch TCC weniger stark beeinträchtigt als es in dem TCC Test der Testsequenz A beobachtet wurde. Um sicherzustellen, dass die Regenwürmer dem Testboden ausgesetzt sind, werden die Testgefäße für 16 h pro Tag beleuchtet. Leichte Unterschiede in der Bestrahlungsintensität haben evtl. die Unterschiede in der TCC Toxizität zwischen den beiden Testsequenzen bedingt. Jedoch wurde in jeder Testsequenz eine Testreihe mit nur TCC angesetzt, so dass ein direkter Vergleich der Mischungsexperimente mit dem jeweiligen TCC Test möglich ist. Die Zugabe einer niedrigen NM 102 und NM 100 Konzentration (400 mg/kg TG Boden, EC50 nicht berechenbar bzw. 1031 mg/kg TG Boden) zu TCC behandeltem Boden führt zu einer geringeren Beeinträchtigung der Reproduktion, während die Zugabe einer höheren Konzentration (1000 mg/kg) zu einer ähnlichen Beeinträchtigung (EC50 692 bzw. 494 mg/kg TG Boden) wie bei Zugabe von TCC als Einzelsubstanz (EC50 956 mg/kg TG Boden). Diese Studie erklärt nicht die Mechanismen, welche zu den beobachteten geringeren Effekten von TCC in Anwesenheit der TiO₂ Materialien geführt hat. Wir nehmen an, dass TCC an die TiO₂ Materialien adsorbierte, welche anschließend entweder nicht durch die

Regenwürmer aufgenommen wurden, oder von welchen TCC im Darm der Würmer nicht remobilisiert und somit nicht aufgenommen wurde. TiO₂ Materialien alleine führten zu keiner Mortalität der Regenwürmer (Testdauer 14 d) und zu keiner Veränderung der Reproduktion (Testdauer 56 d) im Vergleich zu den Kontrollen.

Embryonale Entwicklung (III) Im akuten Fischembryo Toxizitätstest (OECD 236) wurden keine subletalen und letalen Effekte durch die verschiedenen großen TiO₂ Materialien auf die embryonale Entwicklung von *D. rerio* nach einer Exposition von 96 h (Vorversuch) und 72 h (Hauptversuch) festgestellt.

Im Allgemeinen zeigen die Experimente unserer Studie, dass relevante Expositionsszenarien einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse von Ökotoxizitätstest haben. Als besonders wichtig für die Umweltrisikobewertung von TiO₂ Materialien stellte sich die Berücksichtigung von Sonnenlicht heraus, das die Toxizität der TiO₂ Materialien auf *D. magna* drastisch erhöhte. Wird die Phototoxizität der TiO₂ Materialien vernachlässigt, wird das Umweltrisiko von TiO₂ Materialien unterschätzt.

Ein weiterer Fokus unserer Studie war die Untersuchung, ob potentielle Effekte der getesteten TiO₂ Materialien von der Partikelgröße bzw. von nanospezifischen Eigenschaften abhängen. Da toxische Effekte der getesteten TiO₂ Materialien nur im Daphnien Immobilisationstest mit SSL beobachtet wurden, können Aussagen darüber nur für dieses Testsystem getroffen werden: SSL induzierte nicht nur die Toxizität der TiO₂ Nanomaterialien NM 101 und NM 102, sondern auch die des Nicht-Nano Referenz Materials NM 100. Dies verdeutlicht, dass die Toxizität nicht nur auf nanospezifischen Eigenschaften beruht sondern auf den Eigenschaften der TiO₂ Materialien selbst (Photoaktivität). Es ist bekannt, dass nicht nanoskalige TiO₂ Materialien auch photoaktiv sind (Almquist & Biswas 2002). Aus den Ergebnissen unserer Studie lässt sich schlussfolgern, dass die Phototoxizität der TiO₂ Materialien zwar von der Partikelgröße abhängt, jedoch nicht nanospezifisch ist. Des Weiteren lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass es für eine adäquate Umweltrisikoprüfung nanoskaliger und nicht nanoskaliger TiO₂ Materialien notwendig ist, zu prüfen, ob die Materialien photoaktiv sind, z.B. indem die Materialien auf Photoaktivität untersucht werden. Bei positivem Befund empfehlen wir, dass Ökotoxizitätstests mit Sonnenlicht durchgeführt werden, wenn ein solches Expositionsszenarium relevant für den jeweiligen Test ist.

Zusätzlich haben wir untersucht, ob die standardisierten OECD Richtlinien für TiO₂ Materialien anwendbar sind:

Aufgrund starker Agglomeration der TiO₂ Nanomaterialien war es nicht möglich, eine konstante Expositionskonzentration in den aquatischen Tests zu gewährleisten. Demzufolge nehmen wir an, dass sich innerhalb der Testgefäße rasch ein Konzentrationsgradient ausbildet mit niedrigen Konzentrationen in der oberen Wasserphase und hohen Konzentrationen am Boden des Testgefäßes (Sedimentation). Bedenkt man, dass unbekannt ist, ob die Partikel in der oberen Wasserphase oder die Partikel am Boden des Testgefäßes die beobachteten toxischen Effekte bedingen, stellt sich die Frage, auf welche Konzentration die Effekte bezogen werden sollen. Des Weiteren muss angenommen werden, dass die Probenahme-Methode einen Einfluss auf die gemessenen TiO₂ Konzentrationen hat, z.B. durch Variation der Eintauchtiefe von Messpipetten in der Suspension. Um die Vergleichbarkeit zwischen Studien zu gewährleisten, ist es notwendig, die Probenahme-Methode sowie die Suspensionsherstellung der TiO₂ Materialien zu standardisieren. Für letzteres ist es dringend notwendig, standardisierte Verfahren zu entwickeln.

Wir möchten an dieser Stelle noch einmal die Notwendigkeit betonen, Nanomaterialien auf ihr ROS Bildungspotential zu testen sowie eine Anleitung zu verfassen, die es ermöglicht, den Einfluss von

Sonnenlicht in standardisierten OECD Tests zu beachten, um photoaktive Chemikalien und Nanomaterialien unter Sonnenlicht zu testen.

Im Daphnien Immobilisationstest (OECD 2004a) haben wir zusätzlich den Einfluss der Testmediumzusammensetzung auf das Ausmaß der TiO₂ Nanomaterialtoxizität untersucht, indem wir Tests mit den Nanomaterialien NM 101 und NM 102 sowohl in ISO als auch in 10fach verdünntem ISO Medium durchgeführt haben. Hierbei stellten wir fest, dass besonders für NM 102 die Toxizität in verdünntem ISO Medium (EC50 0.5 mg/L) stärker ausgeprägt war als in ISO Medium (EC50 1.1 mg/L). Dies kann mit der DLVO Theorie erklärt werden, welche besagt, dass bei niedriger Ionenstärke (verdünntes ISO Medium) Partikel weniger stark agglomerieren als Partikel in Medium mit einer höheren Ionenstärke (ISO Medium). Aufgrund der niedrigeren Agglomeration ist anzunehmen, dass die Partikel im verdünnten ISO Medium besser bioverfügbar sind und somit stärker mit Daphnien in Wechselwirkung treten als Partikel im ISO Medium. Auf der anderen Seite war die Variabilität der beobachteten Effekte in verdünntem ISO Medium ausgeprägter als in ISO Medium. Weil jedoch die beobachtete Toxizität bei Verwendung der beiden Medien keine großen Unterschiede zeigten, empfehlen wir für TiO₂ Materialien weiterhin in ISO Medium zu testen.

Im Fischembryo Toxizitätstest (OECD 2013) bedingt die Agglomeration der TiO₂ Materialien nicht nur eine sich ändernde Expositionskonzentration, sondern birgt auch das Problem, dass es nicht möglich ist, den Test wie in der Richtlinie beschrieben durchzuführen, da keine Vorexposition durchgeführt werden kann. Der Grund hierfür ist, dass Partikel schon während der Auswahlphase der Fischeier agglomerieren würden; es entsteht ein Konzentrationsgradient. Werden die Eier in einem Teil der Vorexposition ins tatsächliche Testmedium überführt, kann sich hierdurch die Konzentration im tatsächlichen Testmedium verändern. Deshalb ist es notwendig, ältere Zell Stadien (8-64; nach der Eiauswahl) in das Testmedium direkt zu überführen, anstatt die Eier zuerst in eine Vorexposition zu überführen.

Die Ergebnisse der TiO₂ Analytik in den Bodenproben des Regenwurmtests zeigen, dass in den Regenwurmtests trotz rascher Agglomerationstendenz die TiO₂ Partikel homogen und reproduzierbar in den Boden eingebracht werden konnten. Dies bestätigt, dass die verwendete Methode der Suspensions-Applikation verwendet werden kann, um TiO₂ Nanomaterialien auf natürliche Böden zu applizieren. Demzufolge sind der akute und chronische Regenwurm OECD Test (OECD 1984, 2004b) für die Testung von TiO₂ Materialien geeignet, sofern Empfehlungen für die Herstellung und Applikation der TiO₂ Nanomaterialien auf Boden in den Richtlinien gegeben werden.

Die Belebtschlamm Atmungshemmung OECD Richtlinie (OECD 2010) ist für die Testung von TiO₂ Nanomaterialien geeignet, obwohl die TiO₂ Materialien in wässriger Suspension verwendet werden, weil in diesen Tests eine konstante Mischung und Belüftung des Testmediums vorgeschrieben ist. Dieses gewährleistet eine konstante Durchmischung der Partikel und des Testmedium und verhindert somit das Absedimentieren agglomerierter Partikel und sichert somit eine konstante Expositionskonzentration.

1.4 Fazit

In unserer Studie bestätigten wir die vom Hersteller angegebenen Partikelgrößen, BET spezifischer Oberflächen und Kristallstruktur der verwendeten TiO₂ Testmaterialien. Wurden standardisierte OECD Tests unter Laborlicht oder Dunkelheit durchgeführt, wurden keine toxischen Effekte auf die Testorganismen festgestellt bis auf NM 101, welches in hohen Konzentrationen, die weit höher lagen als die zu erwartende Umweltkonzentration, einen negativen Effekt auf die Mobilität von *D. magna* hatte. Tests, die unter Beachtung von relevanten Expositionsszenarien wie Sonnenlicht, Mischungstoxizität und embryonaler Entwicklung stattfanden, zeigten, dass insbesondere die Beachtung von Sonnenlicht einen starken Einfluss

auf die Toxizität von nano- als auch nichtnanoskaligen TiO₂ Materialien hatte. SSL im Daphnien Immobilisationstest (OECD 2004a) induzierte die Toxizität der TiO₂ Materialien: Effektkonzentrationen lagen im niedrigen mg/L Bereich, wenn sie auf die nominalen Konzentrationen bezogen wurden bzw. im µg/L Bereich, wenn die analytisch verifizierten Konzentrationen zugrunde gelegt werden. Die Mischungsexperimente mit Regenwürmern und Belebtschlamm zeigen, dass in keinem der durchgeführten Tests die Toxizität des organischen Schadstoffes in der Anwesenheit der TiO₂ Materialien erhöht wurde. Offensichtlich wurde die Toxizität des organischen Biozids in der Anwesenheit der TiO₂ Materialien entweder verringert oder nicht verändert. Die akuten Fisch Embryo Toxizitätstests zeigten, dass keines der TiO₂ Materialien die embryonale Entwicklung von *D. rerio* unter den getesteten Bedingungen (in Dunkelheit) beeinflusste.

Die Tests mit Sonnenlicht demonstrieren des Weiteren, dass SSL nicht nur die Toxizität der Nanomaterialien, sondern auch die des Nicht-Nano Materials erhöhte. Dennoch zeigt die Studie, dass die SSL induzierte Toxizität abhängig von der Partikelgröße war, da die EC50 Werte der Nanomaterialien niedriger waren als die der Nichtnanoreferenz. Wir vermuten, dass die festgestellte Phototoxizität nicht nur von einem Faktor wie der Photoaktivität (ROS Bildungspotential) der Partikel abhängt, sondern auch von anderen Faktoren, wie z.B. dem Agglomerationsgrad der Partikel und der Interaktionsfläche zwischen Partikeln und Daphnien.

Es kann zusammengefasst werden, dass der akute Regenwurmtest (OECD 1984), der Regenwurm Reproduktionstest (OECD 2004b) und der Belebtschlamm Respirations Inhibitionstest (OECD 2010) für die Testung von TiO₂ Nanomaterialien geeignet sind, da eine homogene Verteilung der TiO₂ Materialien im Testmedium gewährleistet werden kann. Für die Regenwurmtests konnte bestätigt werden, dass die angewendete Applikationsmethode zu einer homogenen und reproduzierbaren Applikation der TiO₂ Materialien auf Boden führte, während für den Belebtschlammtest eine homogene Verteilung der Partikel im Medium auf Grund ständiger Durchmischung der Partikel mit dem Testmedium angenommen werden kann. Jedoch bedingt in wässrigen Suspensionen die Neigung der Partikel zur Agglomeration und zur anschließenden Sedimentation Probleme für die Testung der TiO₂ Partikel im Daphnien Immobilisationstest (OECD 2004a) und im Fischembryo Toxizitätstest (OECD 2013), da eine konstante TiO₂ Konzentration nicht gewährleistet werden kann. Dieses hat auch zur Folge, dass es nicht möglich ist, die exakte Expositionskonzentration zu bestimmen, und es zeigt die Notwendigkeit, die Wasserprobenahme-Methode zu optimieren, um die Vergleichbarkeit zwischen Studien zu gewährleisten. Wir empfehlen die Entwicklung von modifizierten Anleitungen für aquatische Ökotoxizitätsmessungen, Kriterien für die Stabilität von Partikeln in der Stammlösung und in den Testmedien definiert werden. ISO Medium kann für die Testung von TiO₂ Nanomaterialien im Daphnien Immobilisationstest (OECD 2004a) empfohlen werden.

Diese Studie zeigt die Notwendigkeit, die Phototoxizität von nano- und nicht nanoskaligen TiO₂ Materialien während ihrer Umweltrisikobeurteilung zu beachten, z.B. indem Ökotoxizitätstests unter Bestrahlung mit Sonnenlicht durchgeführt werden. Wird der Einfluss von Sonnenlicht vernachlässigt, so wird das Umweltrisiko von TiO₂ Materialien unterschätzt. Es sollte verpflichtend sein, das ROS Bildungspotential von Nanomaterialien zu untersuchen, bevor diese in Ökotoxizitätstests untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es notwendig ist, relevante Expositionsszenarien zu beachten, um das potentielle Umweltrisiko von TiO₂ Materialien genau zu erfassen.

1.5 Ausblick

Eine der Hauptaussagen dieser Studie ist, dass es notwendig ist, Ökotoxizitätstest photoaktiver Materialien unter Sonnenlicht durchzuführen. Dies scheint besonders wichtig für den Fischembryo Toxizitätstest mit TiO₂ Materialien.

Die Daphnien Immobilisationstests haben gezeigt, dass es weiterhin notwendig ist zu untersuchen, ob die beobachtete Toxizität von der TiO₂ Konzentration am Boden der Testgefäße oder im überliegenden Wasser abhängt. Diese Ergebnisse würden Hinweise geben, auf welche Konzentration die Effekte basiert werden sollten. Des Weiteren wäre es interessant, nicht nur in ISO Medium zu testen, sondern zusätzlich in Wasser mit natürlichen organischen Substanzen (z.B. Huminstoffe), um deren möglichen Einfluss auf die Photoxizität der TiO₂ Materialien zu berücksichtigen.

Es bleibt noch zu klären, welche Mechanismen für die geringeren Effekte von TCC in den akuten und chronischen Regenwurmtests in Anwesenheit der TiO₂ Materialien verantwortlich war: dazu sollten Adsorptionsmessungen von TCC an die TiO₂ Materialien durchgeführt werden.

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass SSL die Toxizität der verschiedenen großen TiO₂ Materialien unterschiedlich stark induzierte. Dies deutet auf die Notwendigkeit hin, jedes verschieden große TiO₂ Material einzeln zu testen, bis man sich auf eine Vorgehensweise geeinigt hat, wie Nanomaterialien zu kategorisieren sind. Bedenkt man die hohe Diversität an TiO₂ Materialien und die noch größere Diversität von Nanomaterialien im Allgemeinen, empfehlen wir, eine praktikable Methode zur Bestimmung der Photoaktivität von Substanzen/Nanomaterialien zu entwickeln.

An dieser Stelle soll noch einmal betont werden, dass das Nicht-Nano Material (NM 100) unter SSL ebenfalls toxische Effekte auf *D. magna* ausübte. Daher sollten nanoskalige und auch größere TiO₂ Materialien unter SSL in Ökotoxizitätstests getestet werden.

2 Literatur

- Aitken RJ, Chaudhry MQ, Boxall ABA, Hull M (2006): Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occup Med-Oxford* 56, 300-306
- Almquist CB, Biswas P (2002): Role of synthesis method and particle size of nanostructured TiO₂ on its photoactivity. *Journal of Catalysis* 212, 145-156
- Asharani PV, Yi LW, Gong ZY, Valiyaveetil S (2011): Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology* 5, 43-54
- Brunauer S, Emmett PH, Teller E (1938): Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society* 60, 309-319
- Chen TH, Lin CY, Tseng MC (2011): Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). *Marine Pollution Bulletin* 63, 303-308
- Dabrunz A, Duester L, Prasse C, Seitz F, Rosenfeldt R, Schilde C, Schaumann GE, Schulz R (2011): Biological Surface Coating and Molting Inhibition as Mechanisms of TiO₂ Nanoparticle Toxicity in *Daphnia magna*. *Plos One* 6
- Dalai S, Pakrashi S, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2013): Acute Toxicity of TiO₂ Nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under Visible Light and Dark Conditions in a Freshwater System. *PloS one* 8, e62970
- European-Commission (2011/696/EU): Commission Recommendation on the definition of nanomaterials. Official Journal of the EU L 275/38. 20.10.2011
- Fan WH, Cui MM, Liu H, Wang CA, Shi ZW, Tan C, Yang XP (2011): Nano-TiO₂ enhances the toxicity of copper in natural water to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 159, 729-734
- Gottschalk F, Sonderer T, Scholz RW, Nowack B (2009): Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environmental Science & Technology* 43, 9216-9222
- Heckmann L-H, Hovgaard MB, Sutherland DS, Autrup H, Besenbacher F, Scott-Fordsmand JJ (2011): Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology* 20, 226-233
- Hu C, Li M, Cui Y, Li D, Chen J, Yang L (2010): Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 586-591
- ISO (1996): Water quality -- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] -- Part 1: Static method ISO 7346-1:1996. ISO
- Lu CY, Wey MY (2007): The performance of CNT as catalyst support on CO oxidation at low temperature. *Fuel* 86, 1153-1161
- Ma H, Brennan A, Diamond SA (2012): Photocatalytic reactive oxygen species production and phototoxicity of titanium dioxide nanoparticles are dependent on the solar ultraviolet radiation spectrum. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2099-2107
- Marcone GPS, Oliveira AC, Almeida G, Umbuzeiro GA, Jardim WF (2012): Ecotoxicity of TiO₂ to *Daphnia similis* under irradiation. *Journal of Hazardous Materials* 211, 436-442
- McShane H, Sarrazin M, Whalen JK, Hendershot WH, Sunahara GI (2012): Reproductive and behavioral responses of earthworms exposed to nano-sized titanium dioxide in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 184-193
- McWilliams A (2012): Nanotechnology: A Realistic Market Assessment. Accessed 15.01.2014. BCC Research, <http://www.reportlinker.com/p096617-summary/Nanotechnology-A-Realistic-Market-Assessment.html>
- OECD (1984): Earthworm, Acute Toxicity Tests, Test Guideline No. 207. Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris
- OECD (2004a): *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test, Test Guideline No. 202. Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris
- OECD (2004b): Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*), Test Guideline No. 222. Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris
- OECD (2010): Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation), Test Guideline No. 209. Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris
- OECD (2013): Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, Test Guideline No. 236. Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris
- Wang N, Zhao CL, Shi ZX, Shao YW, Li HW, Gao N (2009): Co-incorporation of MMT and MCM-41 nanomaterials used as fillers in PP composite. *Mater Sci Eng B-Adv* 157, 44-47

- Wang XH, Li JG, Kamiyama H, Moriyoshi Y, Ishigaki T (2006): Wavelength-sensitive photocatalytic degradation of methyl orange in aqueous suspension over iron(III)-doped TiO₂ nanopowders under UV and visible light irradiation. *J Phys Chem B* 110, 6804-6809
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N (2012): Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environmental Science & Technology* 46, 2242-2250
- Whitfield Åslund ML, McShane H, Simpson MJ, Simpson AJ, Whalen JK, Hendershot WH, Sunahara GI (2011): Earthworm sublethal responses to titanium dioxide nanomaterial in soil detected by 1H NMR metabolomics. *Environmental science & technology* 46, 1111-1118
- Wiench K, Wohlleben W, Hisgen V, Radke K, Salinas E, Zok S, Landsiedel R (2009): Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76, 1356-1365
- Zheng X, Chen Y, Wu R (2011): Long-Term Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Nitrogen and Phosphorus Removal from Wastewater and Bacterial Community Shift in Activated Sludge. *Environmental Science & Technology*, null-null
- Zhu X, Chang Y, Chen Y (2010): Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 78, 209-215
- Zhu XS, Zhu L, Duan ZH, Qi RQ, Li Y, Lang YP (2008): Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *J Environ Sci Heal A* 43, 278-284