

**Effekte von Titandioxidnanopartikeln auf den Nematoden *Caenorhabditis elegans*
unter besonderer Berücksichtigung von UV-Strahlung**

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

von
Dipl. Biol. Judith Angelstorf

aus Bonn

2013

1. Gutachter: PD. Dr. rer. nat. Wolfgang Ahlf
Technische Universität Hamburg Harburg
Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft
Eißendorfer Str. 40
21073 Hamburg

2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Heise
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Gefahrenstoffe und Umwelttoxikologie
Lohbrügger Kirchstr. 65
21033 Hamburg

Tag der mündlichen Prüfung: 30. August 2013

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen, die mich auf unterschiedlichste Weise bei dieser Arbeit unterstützt haben, ganz besonders bei

Prof. Dr. Susanne Heise für die gute Betreuung dieser Arbeit, ihre stete Unterstützung und Begeisterung für meine Arbeit und einen beeindruckenden Ideenreichtum. Ich bin froh über die schöne Zeit in ihrer tollen Arbeitsgruppe, über viele wichtige Erfahrungen und schöne gemeinsame Probenahmen im Watt und auf der Elbe. Vielen Dank für das große Vertrauen.

Dr. habil Wolfgang Ahlf für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine Offenheit für einen neuen Themenbereich und für all die wichtigen Diskussionen, die meinen Blick immer wieder auf das übergeordnete Ziel gerichtet haben.

Prof. Dr. Dr. hc Frerich Keil für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und seine erheiternde und auflockernde Ansprache vor der Prüfung.

Meiner Arbeitsgruppe an der HAW, besonders Maximilia Kottwitz, Dr. Pei-Chi Hsu, Nadine Heuer, Silvia Materu und Henning Hermann für ihre Hilfe und Unterstützung im Labor und im Feld, für viel Spaß im Schlamm und auf dem Schlauchboot, für ihr großes Verständnis für alle Nano- und Nematoden-Krisen, aufbauende Kaffee- und Muffinpausen und vieles mehr.

Kari Moshenberg für ihre unerschöpfliche Bereitschaft zur Korrektur von „awkward language“ aller Art und für ihre positive, erfrischende Art bei all ihren AG-Meetings-Besuchen.

Prof. Dr. Gesine Witt und ihrer Arbeitsgruppe, besonders Susann Lang, Katharina Schmidt, Robin Ernst und Tanja Prüfer für die Unterstützung bei chemischen Analysen, für die besten Kaffeepausen und schöne Tage in Bergedorf, Sevilla, Mailand und Glasgow.

Allen MitarbeiterInnen der HAW Hamburg, die mich bei meiner Arbeit technisch, inhaltlich und moralisch unterstützt haben, ganz besonders Prof. Dr. Carolin Flöter und Stephan Schmücker für biologischen Support aller Art und Sakher Abdo, der immer ein Ultraschallbad, einen Kaffee und ein offenes Ohr für mich übrig hatte.

Den Studierenden, die mich im Labor unterstützt haben, besonders Gesche Bergmann und Martina Nielsen.

Allen KollegInnen vom Institut für Umwelttechnik und Energiewirtschaft, ganz besonders Silke Hardtke und Birte Hegemann für die Einführung in die Biotests und die Genexpressionsanalyse und Iris Gutiérrez für alle aufbauenden Worte und eine neue Freundschaft.

Jens Timmermann für die Einführung in die Elektronenmikroskopie und sein Engagement bei der Lösung aller aufkommenden Problemstellungen.

Dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Moritz am Institut für Technische und Makromolekulare Chemie der Uni Hamburg, insbesondere Michael Gröger für die Unterstützung bei der Partikelgrößenanalyse.

Dr. Frank von der Kammer vom Department of Environmental Geosciences der Uni Wien für die Einführung in die Eigenheiten der Nanowissenschaften zu Beginn dieser Arbeit.

Dr. Anne Angelstorf für die ausführliche Durchsicht dieser Arbeit und ihren Rat in vielen chemischen Fragen.

Der OECD für die Möglichkeit der Teilnahme am "*Sponsorship Programme for Testing of Manufactured Nanomaterials*" und die Bereitstellung der Testmaterialien, sowie Dr. Kathrin Schwirn und Dr. Doris Völker vom Umweltbundesamt für die gute Zusammenarbeit und den wertvollen inhaltlichen Austausch.

Pro Exzellenzia für die finanzielle Förderung dieser Arbeit und das gute Trainingprogramm.

Allen Freundinnen und Freunden für viel Verständnis, Geduld und all die schönen und wichtigen Ablenkungen, die ihr mir bereitet habt. Ganz besonders danke ich Kerstin und Mareike.

Meinen lieben Eltern und Brüdern für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihren festen Glauben an mich und viele schöne gemeinsame Erholungspausen von Texel über Bad Harzburg bis nach Tarifa.

Und ganz besonders danke ich Dir Matthieu, dafür dass Du einfach immer da bist.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	III
Summary	IV
1 Einleitung	1
2 Hintergrund	4
2.1 Nanopartikel in der Umwelt	4
2.2 Titandioxid-Nanopartikel: Eigenschaften und Verwendung	4
2.3 Schadwirkung von Titandioxid-Nanopartikeln	7
2.3.1 Genotoxizität von nano-TiO ₂	8
2.3.2 Nanopartikel als potentielle Carrier für Co-Kontaminanten	8
2.4 Phenanthren als Co-Kontaminant	9
2.5 Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	11
2.5.1 Eigenschaften und Lebensweise	11
2.5.2 Reproduktion	12
2.5.3 Nahrungsaufnahme und Defäkation	13
2.5.4 Besondere Eignung von <i>C. elegans</i> als Testorganismus	
für die Untersuchung von Nanomaterialien	13
2.6 Indikatoren für oxidativen Stress durch nTiO ₂	14
2.6.1 Molekulare Antworten: Funktion und Induktion von Superoxiddismutasen	14
2.7 <i>cyp-35C1</i> -Expression als Biomarker für PAK-Verfügbarkeit	16
2.8 Toxikologische Untersuchung von Nanomaterialien:	
Relevanz der Partikel-Charakterisierung	17
2.9 Ziele der Arbeit	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Nematodentest	21
3.1.1 Kultivierung von <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
3.1.2 Kultivierung von <i>Escherichia Coli</i>	21
3.1.3 Durchführung	22

3.1.4	Toxikologische Endpunkte	23
3.2	TiO ₂ -Testmaterialien	24
3.3	Herstellung der TiO ₂ -Testsuspensionen	25
3.4	Charakterisierung der TiO ₂ -Partikel	26
3.4.1	Dynamische Lichtstreuung	27
3.4.2	Rasterelektronenmikroskopie	28
3.4.3	Zetapotentiale	30
3.4.4	Konzentrationsbestimmung	31
3.4.5	Agglomeration der TiO ₂ -Partikel mit <i>E. coli</i>	31
3.4.6	Bestimmung der photokatalytische Aktivität	31
3.5	Simulierte Sonnenstrahlung	32
3.6	Kombinationseffekt von nTiO ₂ und Phenanthren	36
3.7	Bestimmung der Phenanthrenkonzentrationen im Testsystem	36
3.7.1	Phenanthren in den Testlösungen	36
3.7.2	Sorption von Phenanthren an nTiO ₂	37
3.8	Genexpressionsanalysen	38
3.8.1	Schadstoffinkubation und Vorbereitung der Proben	38
3.8.2	RNA Isolation	39
3.8.3	Reverse Transkription	40
3.8.4	Quantitative Real-Time-PCR	40
3.9	<i>gfp:sod-3</i> : transgene <i>C. elegans</i> als Indikatoren der <i>sod-3</i> Expression	43
3.10	Intestinale Autofluoreszenz als Indikator für oxidativen Stress	44
3.11	Bestimmung der Ingestion und Defäkation der TiO ₂ -Partikel durch <i>C. elegans</i>	44
3.11.1	Stereomikroskopie	45
3.11.2	Lichtmikroskopie	45
3.11.3	Energiedispersive Röntgenspektrometrie	45
3.11.4	Hemmung der Nahrungsaufnahme	47
3.12	Experimentelles Design	47
3.12.1	Einfluss von primärer und sekundärer Partikelgröße auf den Effekt von TiO ₂	47

3.12.2	Co-Kontamination: Wirkung von nTiO ₂ auf die Toxizität von PAKs	48
3.12.3	Einfluss simulierter Sonnenstrahlung auf die Effekte von TiO ₂ Partikeln.....	49
3.12.4	Effekte photoaktivierter TiO ₂ -Nanopartikeln auf die Toxizität von.....	
	Phenanthren	49
3.13	Statistische Auswertung der Ergebnisse	51
3.14	Chemikalien	51
3.15	Medien	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Charakterisierung der Partikel im Testsystem	53
4.1.1	Sekundäre Partikelgrößen nach DLS Messung.....	53
4.1.2	Sekundäre Partikelgrößen nach REM-Messung	58
4.1.3	Zetapotentiale der Partikel.....	62
4.1.4	TiO ₂ -Konzentrationen	63
4.1.5	Agglomeration der TiO ₂ -Partikel mit <i>E. coli</i>	64
4.2	Einfluss der primären und sekundären Partikelgröße auf die	
	Effekte von TiO ₂ -Partikeln.....	66
4.2.1	Toxikologische Effekte von bTiO ₂ und nTiO ₂	66
4.2.2	Ingestion der Partikel durch <i>C. elegans</i>	69
4.2.3	Hemmung der Nahrungsaufnahme	72
4.3	Co-Kontaminanten: Wirkung von nTiO ₂ auf die Toxizität von PAKs	74
4.3.1	Verhalten von Phenanthren im Testsystem.....	75
4.3.2	Sorption von Phenanthren an nTiO ₂	76
4.3.3	Toxizität von nTiO ₂ und Phenanthren bei kombinierter Exposition.....	76
4.3.4	<i>Cyp-35C1</i> -Expression als Biomarker für die Verfügbarkeit	
	polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe	78
4.4	Photoaktivierte Effekte von TiO ₂ gegenüber <i>C. elegans</i> : Chronische	
	Toxizität und akute molekularbiologische Antworten	81
4.4.1	Vorversuche zur SSR-Toleranz von <i>C. elegans</i>	81
4.4.2	Photokatalytische Aktivität der TiO ₂ -Materialien.....	84
4.4.3	Einfluss simulierter Sonnenstrahlung auf die toxischen Effekte von	
	nTiO ₂ und bTiO ₂	85

4.4.4	sod-3-Expression	88
4.4.5	Instestinale Autofluoreszenz	89
4.5	Einfluss von nTiO ₂ auf die Phototoxizität von Phenanthren in kombinierter Exposition	90
4.6	Tabellarische Zusammenfassung der Testparameter und Ergebnisse	94
5	Diskussion	96
5.1	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel-Suspensionen	96
5.1.1	Methodentwicklung und Einordnung der sekundären Partikelgrößen nach DLS	96
5.1.2	Bedeutung der sekundären Partikelgrößen für den Modellorganismus <i>C. elegans</i>	99
5.1.3	Zusammenhang zwischen Zetapotentialen und dem Agglomerationsverhalten der Partikel im Testsystem	101
5.2	Effekte von TiO ₂ -Partikeln in Abhängigkeit ihrer primären und sekundären Partikelgröße	103
5.2.1	Toxizität der TiO ₂ -Materialien gegenüber <i>C. elegans</i>	104
5.2.2	Bedeutung der Ingestion und Akkumulation der Partikel für ihre Toxizität	105
5.2.3	Einfluss der TiO ₂ -Partikel auf die Nahrungsaufnahme von <i>C. elegans</i>	105
5.2.4	Mögliche Wirkmechanismen der nTiO ₂ -Partikel	108
5.3	Einfluss von TiO ₂ -Nanopartikeln auf die Toxizität von PAKs als Co-Kontaminanten	112
5.4	Effekte der TiO ₂ -Partikeln unter Einfluss simulierter Sonnenstrahlung	115
5.4.1	Effekte intrazellulärer ROS-Bildung	117
5.4.2	Superoxiddismutasen als Indikator für intrazelluläre ROS-Bildung	118
5.4.3	Effekte extrazelluläre ROS-Bildung	120
5.4.4	Erhöhung der Effekte durch photoinduzierte Disaggregation der Partikel	123
5.5	Effekte photoaktivierter TiO ₂ -Partikeln auf die Toxizität von Phenanthren	124
5.6	Umweltrelevanz	128
6	Zusammenfassung und Ausblick	130
7	Referenzen	132
8	Anhang	144

Tabellenverzeichnis	150
Abbildungsverzeichnis	152

Abkürzungsverzeichnis

<i>act-1</i>	Actin 1 (Gen)
ASTM	American Society for Testing and Materials
BSI	British Standards Institution
bTiO ₂	nicht nanopartikuläres (bulk) Titandioxid
bulk-TiO ₂	nicht nanopartikuläres (bulk) Titandioxid
BUND	Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CAT	Katalase (Catalase)
CCC	Kritische Koagulationskonzentration (Critical Coagulation Concentration)
cDNA	Copy-DNA (Einzelstrang)
<i>cyp</i>	Cytochrom P450 -abhängige Monoxygenase (Gen)
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monoxygenase (Protein)
<i>cyp-35C1</i>	Cytochrom P450 -abhängige Monoxygenase 35C1(Gen)
DLS	Dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₂₀	Effect concentration (20 %)
EC ₅₀	Effect concentration (50 %)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENPs	Engineered nanoparticles
FLA	Fluoranthen
GC-MS	Gaschromatograph-Massenspektrometrie
HPLC	High Pressure Liquide Chromatography
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
ICP-OES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
ISO	International Standard Organization
KTP	Kritisch Punkt Trocknung
L1-L4	Juvenilstadien von <i>C. elegans</i>

LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
LC ₅₀	Lethal concentration (50 %)
Log Kow	log Octanol/ Wasser Partitions-Koeffizient
Mb	Methylenblau
min	Minuten
MoA	Mode of Action
nano-TiO ₂	nanopartikuläres Titandioxid
NPs	Nanopartikel
NRDC	Natural Resources Defense Council
nTiO ₂	nanopartikuläres Titandioxid
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PC-Filter	Polycarbonat-Filter
PCR	Polymerase chain reaction
PDI	Polydispersitätsindex
PHE	Phenanthren
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
RT	Raumtemperatur
<i>sod-3</i>	Superoxiddismutase 3 (Gen)
SOD-3	Superoxiddismutase 3 (Protein)
SSR	simulated solar radiation
STABW	Standardabweichung
U/min	Umdrehungen pro Minute

Zusammenfassung

Der vielseitige Einsatz industriell gefertigter Nanopartikel in nahezu allen Industriezweigen wird zu einem zunehmenden Eintrag der Materialien in die Umwelt führen. Modellierungen der Emission von nanoskaligem Titandioxid ($n\text{TiO}_2$) prognostizieren einen Konzentrationsanstieg in aquatischen Sedimenten um bis zu 1,4 mg/kg jährlich, wobei das ökologische Risiko der Materialien zurzeit nicht absehbar ist. Für ein ökotoxikologisches Gefährdungspotenzial der nanoskaligen Titandioxidpartikel im Vergleich zu den Bulkmaterialien ($b\text{TiO}_2$) kommen insbesondere drei Eigenschaften in Frage: (1) Mit einem Durchmesser von < 100 nm können die Partikel potenziell in Organismen und Zellen eindringen und mit zellulären Prozessen interagieren. (2) Aufgrund ihrer stark vergrößerten Oberfläche können Wechselwirkungen mit anderen Umweltschadstoffen verstärkt werden, die deren Bioverfügbarkeit und Toxizität beeinflussen. Ergänzend zu diesen, für Nanomaterialien typischen Eigenschaften zeigen TiO_2 -Nanopartikel (3) eine erhöhte photokatalytische Aktivität, die durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induziert wird und organisches Material - wie organische Co-Kontaminanten und Zellbestandteile - verändern kann.

Zur Beurteilung der nanospezifischen Effekte und der Auswirkung variierender Umweltbedingungen untersucht diese Studie folgende Aspekte:

- 1) Welchen Einfluss hat die Primärpartikelgröße auf die Toxizität von TiO_2 ?
- 2) Welchen Einfluss hat UV-Strahlung auf die Toxizität der photokatalytischen TiO_2 -Partikel?
- 3) Interagiert $n\text{TiO}_2$ mit Phenanthren als verbreitetem aquatischem Kontaminanten?
- 4) Wie wirken photoaktivierte $n\text{TiO}_2$ -Partikel auf die Toxizität von Phenanthren?

Zur Bestimmung der chronischen Toxizität von TiO_2 wurde der Nematode *Caenorhabditis elegans* eingesetzt. Bei vergleichbarer Agglomeratgröße von 300 bis 1500 nm hemmte $n\text{TiO}_2$ ($P25$, 21 nm) die Reproduktion von *C. elegans* signifikant mit einem LOEC von 10 mg/l und einem $\text{EC}_{50} > 100$ mg/l, während das $b\text{TiO}_2$ (NM100 , ~160 nm) keine toxischen Effekte zeigte. Durch Mikroskopie und energie-dispersive Röntgenspektrometrie wurde gezeigt, dass beide Materialien in den intestinalen Trakt des Testorganismus aufgenommen wurden. Eine Agglomeration der ingestierten Partikel im Darmlumen störte die Defäkation der Organismen so stark, dass die Nahrungsaufnahme, simuliert durch die Aufnahme fluoreszierender Mikropartikel, signifikant gehemmt wurde.

Eine Exposition der TiO_2 -exponierten Testorganismen gegenüber simulierter Sonnenstrahlung erhöhte die Toxizität von $n\text{TiO}_2$ zu einem EC_{50} von 53 mg/l, während die Wirkung von $b\text{TiO}_2$ nicht beeinflusst wurde. Diese Effekte korrelierten mit der photokatalytischen Aktivität der Materialien, die durch die Photodegradation von Methyleneblau nachgewiesen wurde und für $n\text{TiO}_2$ deutlich höher lag als für $b\text{TiO}_2$. Die photoaktivierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies an der Partikeloberfläche kann in exponierten Organismen oxidativen Stress induzieren und damit die beobachtete Phototoxizität von $n\text{TiO}_2$ hervorrufen. Da $n\text{TiO}_2$ keine Änderung der *sod-3*-Expression - als Indikator für oxidativen Stress - induzierte, wird angenommen, dass die ingestierten $n\text{TiO}_2$ -Partikel ausschließliche extrazellulär über die oxidative Schädigung der Membranen der Darmepithelzellen von *C. elegans* wirken.

$n\text{TiO}_2$ zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Toxizität und die interne Verfügbarkeit von Phenanthren, die durch die Genexpressionsanalyse von *cyp-35C1* durch Real-Time-PCR untersucht wurde. Unter Einwirkung simulierter Sonnenstrahlung führte die Anwesenheit des Nanomaterials jedoch zu einer Minderung der phototoxischen Wirkung von Phenanthren.

Die Ergebnisse dieser Studie heben die Bedeutung der Primärpartikelgröße auf die Toxizität von TiO_2 -Materialien hervor: Eine chronische Schädigung induzierte nur das nanoskalige TiO_2 . Der fehlende Nachweis einer intrazellulären Wirkung des photokatalytischen Nanomaterials lässt vermuten, dass sich die toxischen Effekte an der Membran des Gastrointestinaltraktes manifestieren. Diese Schlussfolgerung ist im Einklang mit den Ergebnissen der Co-Kontamination: $n\text{TiO}_2$ erleichterte nicht den Transport der Schadstoffe in die Zellen, blockierte jedoch vermutlich rein physikalisch eine Photosensitivierung. Die potentielle Veränderung der Toxizität von nanoskaligem TiO_2 durch physikalisch-chemische Parameter bekräftigt die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen der ökotoxikologischen Effekte unter variierenden Umweltbedingungen.

Effects of titanium dioxide nanoparticles on the nematode *Caenorhabditis elegans*

Summary

Engineered nanoparticles (ENPs) are increasingly used in a variety of industrial and consumer products and will inevitably enter the aquatic environment. Modelling environmental emissions of nanoscale titanium dioxide (nTiO₂) resulted in predicted sediments accumulation rates up to 1.4 mg/kg*year. Potential effects of ENPs on human health and the environment are still poorly understood.

In comparison to their bulk scale counterparts, nanoparticles pose a higher risk to the environment for several reasons. First, their small size (< 100 nm) enables them to penetrate organisms and cells, where they can interfere with cellular processes. Also, due to their large surface area, nanoparticles have the potential to affect bioavailability and toxicity of co-existing contaminants like heavy metals or PAHs by acting as a carrier. For TiO₂-particles, photocatalytic activity increases with increasing surface area, as this property depends strongly on the accessibility of the particles' surface to the environment.

In order to assess the nanoscale specific effects and the potential impacts of varying environmental conditions, this study addresses the following questions:

- 1) Does particle size affect the toxicity of TiO₂ particles?
- 2) How does sunlight impact the toxicity of photocatalytically active nanoparticles?
- 3) Does nTiO₂ interact with phenanthren as a common co-contaminant in sediments?
- 4) How does nTiO₂ impact phenanthren as co-contaminant exposed to sunlight?

The nematode *Caenorhabditis elegans* was used to determine the chronic toxicity of two different TiO₂-materials: A 21 nm, nanoscale TiO₂ (P25) and a 90 to 230 nm, bulk-scale TiO₂ (bTiO₂: NM100). While agglomerating to a comparable secondary particle size of 300 to 1500 nm, only nTiO₂ inhibited reproduction of *C. elegans* significantly with a LOEC of 10 mg/l and an EC₅₀ > 100 mg/l, while no effects were observed for bTiO₂. Results of Microscopy and 'Energy Dispersive X-Ray-analysis' indicate that both materials are taken up by the intestinal tract of *C. elegans*. Further examination of the agglomeration of TiO₂-particles in the gut of *C. elegans* showed that both materials caused a dysfunction of the defecation process by inhibiting feeding efficiency.

Exposition to simulated solar radiation increased toxicity of nTiO₂ to an EC₅₀ of 53 mg/l, while no phototoxicity has been observed for bTiO₂. Since nTiO₂ produces more reactive oxygen species (ROS) than bTiO₂, when measured as photo-degradation of methylene blue, the observed photoactivated effects of nTiO₂ are likely due to oxidative stress. To test for a corresponding genetic response, expression of *sod-3* was analyzed on mRNA and enzymatic level by using real-time PCR and a *sod-3:gfp* transgenic strain, respectively. Independent of the applied light conditions, nTiO₂ did not impact *sod-3* expression, suggesting that no ROS-production occurred within *C. elegans* cells. Therefore it was concluded that the nanoparticles did not enter the cells and the observed phototoxicity was evoked by oxidative damage at the outer apical membrane of the intestinal cells, due to modes of action such as lipid and protein peroxidation.

nTiO₂ was not found to have a significant effect on the toxicity or bioavailability of phenanthrene, when measured as gene expression of *cyp-35C1*. In combined exposure with radiation, nTiO₂ appears to block the impact of UV-light on the photo-sensitive PAH and decreases photo-toxicity.

The results of this study highlight the importance of primary particle size and environmental parameters on the toxicity of TiO₂ materials. Even though bTiO₂ and nTiO₂ agglomerate to the same secondary particle size in the test system, only nano-TiO₂ is toxic to *C. elegans*. Missing evidence for cell internal effects of the photocatalytically active nTiO₂ suggests that nanoparticles act extracellularly by inducing oxidative damage of the epithelial membranes in the gut. Potential enhancement of nano-TiO₂ toxicity by physico-chemical parameters stresses the necessity of further investigations into their ecotoxicological effects under different environmental conditions.

1 Einleitung

Chancen und Risiken der Nanotechnologie

Die Nanotechnologie umfasst die Entwicklung und Herstellung von Produkten im Nanometerbereich und gilt als Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts. Rasante Entwicklungen der aufstrebenden Branche ermöglichen schon heute die kontrollierte Herstellung hochspezifischer Produkte in diesem Größenbereich, die bereits in einer sehr breiten Produktpalette Anwendung finden. Die Woodrow Wilson Datenbank katalogisiert derzeitige Anwendungen von Nanomaterialien und macht sie für Verbraucher verfügbar (<http://www.nanotechproject.org>). Eine Recherche macht schnell deutlich, dass die Nanotechnologie bereits viele Alltagsprodukte - von Autolacken bis hin zu Kosmetikprodukten – erreicht hat und auch vor der Lebensmittelindustrie nicht Halt macht. Visionen aktueller Forschungsaktivitäten der Nanotechnologie reichen deutlich weiter: Katalytischen Nanomotoren, die sich an natürlichen Biomotoren orientieren, sollen beispielsweise in Zukunft komplexe Operationen in diversen Umgebungen durchführen sollen, wobei auch medizinische Anwendungen angestrebt werden (Wang, 2009).

Cushen et al. (2012) bieten einen umfassenden Überblick über den Einsatz der Nanotechnologie in Lebensmittelprodukten. Wie viele weitere Studien, z.B. Sharifi et al. (2012), macht auch diese deutlich, dass der derzeitige Kenntnisstand über das Verhalten und die Effekte von Nanomaterialien völlig unzureichend ist, um potentielle Risiken dieser neuartigen Kontaminanten für die Gesundheit des Menschen zu bewerten. Noch viel lückenhafter ist das Verständnis der Wirkungen der Nanomaterialien in der Umwelt, wobei viele Studien auf eine starke Abhängigkeit der Effekte von den herrschenden physikalisch-chemischen Bedingungen hinweisen (Handy et al., 2008). Mangels verlässlicher Daten über das Umweltverhalten und die Ökotoxizität der potentiellen Schadstoffe ist eine umfassende Risikoabschätzung bis heute nicht möglich (Kahru and Dubourguier, 2010, Kahru and Ivask, 2012). Internationale und nationale Umweltorganisationen, wie das Natural Resources Defense Council (NRDC), USA, oder der Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland (BUND) fordern deshalb ein vorläufiges Verbot der Anwendung von Nanomaterialien und unterstützen eine umfassende Bewertung ihrer Ökobilanz und ihres Gefährdungspotenzials für die Umwelt und die Gesundheit des Menschen (Sass, 2007, BUND, 2008).

Mit einem Durchmesser von unter 100 nm in allen drei räumlichen Dimensionen (ASTM, 2006, BSI, 2007) fallen Nanopartikel in das Größenspektrum biologischer Makromoleküle, wie beispielsweise der Erbsubstanz DNA (siehe Abb. 1.1). Sie können damit durch biologische Membranen diffundieren (Kim et al., 2006) oder über Endozytose in Zellen aufgenommen werden und sich in den Geweben exponierter Organismen verteilen. Auch die

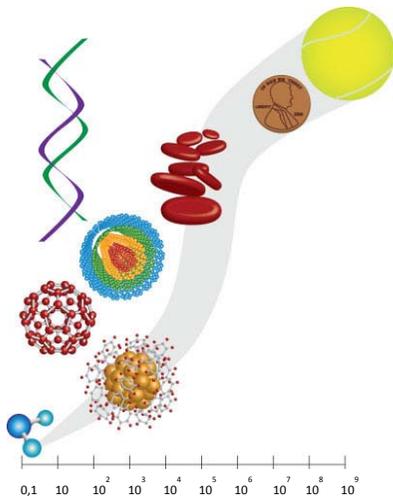


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der relativen Größe von Nanomaterialien. Von links: Wassermolekül, Zitrat-stabilisierte Gold NPs, Buckminster Fullerene (C60), Kohlenstoff Nanotube, rote Blutzellen, Penny, Tennisball aus Klaine et al. (2012).

Blut-Hirn-Schranke von Vertebraten stellt dabei keine Barriere für die Partikel dar (Lin et al., 2006, Chen et al., 2011).

Mit einer geschätzten globalen Produktion von 44.400 Tonnen jährlich kommt nano-Titandioxid derzeit neben Silber- und Kohlenstoff-Nanopartikeln am häufigsten zur Anwendung, wobei Prognosen auf Anstiege der jährlichen Produktionsvolumen von nanopartikulären Titandioxid (nano-TiO₂) bis auf 2,5 Millionen Tonnen im Jahr 2025 hindeuten (Robichaud et al., 2009). Geht man nach Colvin (2003) von einer linearen Korrelation der Emissionen dieser Kontaminanten mit ihrem Produktionsvolumen aus, so sind enorme Akkumulationen in der Umwelt zu erwarten.

Gottschalk et al. (2009) modellierten basierend auf aktuellen Kenntnissen über Produktion und Umweltverhalten der Materialien erwartete Umweltkonzentrationen (Predicted Environmental Concentrations, PEC) von nanopartikulärem Titandioxid, Zinkoxid und Silber, sowie

sowie von Kohlenstoff-Nanoröhren und Fullerenen. Sie identifizierten aquatische Sedimente als Hauptsenke der Kontaminanten in der Umwelt und berechneten für nano-TiO₂ Akkumulationsraten in europäischen Sedimenten von bis zu 1,4 mg/kg jährlich. Die vorhergesagten Belastungen mit nano-TiO₂ liegen damit mit einem Faktor von etwa 10³ weit über den Belastungen der übrigen Nanomaterialien und bergen besonders hohe Risiken für aquatische Ökosysteme. Mangelnde Erkenntnisse der ökotoxikologischen Wirkung dieser Kontaminanten - besonders in dem am stärksten belasteten Kompartiment der Sedimente - erfordern hier umfassende Untersuchungen zu dem Verhalten und der Toxizität der Materialien in aquatischen Ökosystemen.

In der vorliegenden Studie werden deshalb die Effekte von nanopartikulärem Titandioxid im Vergleich zu einem herkömmlichen Bulkmaterial am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* untersucht. Der ökotoxikologische Modellorganismus kann für die Bestimmung der chronischen Toxizität von Kontaminanten in allen drei Kompartimenten – Boden, Wasser und Sediment - eingesetzt werden (ISO-10872, 2010) und bietet zudem als wichtiger Modellorganismus der Molekularbiologie die Möglichkeit der Untersuchung molekularer Antworten auf die Exposition der TiO₂-Partikel.

Folgende Schwerpunkte werden im Rahmen dieser Arbeit eingehend untersucht:

1. Einfluss der Partikelgröße von Titandioxidmaterialien auf ihre Toxizität

Aufgrund der verminderten Partikelgröße können Nanopartikel potentiell tiefer in Zellen und Gewebe eindringen als herkömmliche Bulkmaterialien und dort mit ihrer vergrößerten Oberfläche verstärkt in physiologischen Prozessen interagieren.

2. Die Auswirkung von UV-Strahlung auf die Effekte der photokatalytisch aktiven Titandioxid-Materialien

Aufgrund der stark vergrößerten Oberfläche von Nanopartikeln ist ihre photokatalytische Aktivität gegenüber den Bulkmaterialien enorm erhöht. Eine verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch nanopartikuläres TiO_2 bedeutet gleichzeitig auch ein erhöhtes Risiko für exponierte Organismen. Aus diesem Grund wird untersucht, ob das Nanomaterial hier auch eine erhöhte photokatalytische Toxizität aufweist.

3. Die Wechselwirkung von Titandioxid-Nanopartikeln mit dem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff Phenanthren als Co-Kontaminant im Testsystem.

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe werden bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe freigesetzt und über die Atmosphäre in Oberflächengewässer eingetragen. Dort akkumulieren sie in aquatischen Sedimenten und damit in dem Kompartiment, das auch als Hauptsenke für nanopartikuläre Kontamination eingeordnet wird. Wechselwirkungen der ubiquitären PAKs mit zunehmend eingetragenen Nanopartikeln könnten daher einen starken Einfluss auf die Effekte der Kontaminanten in der Umwelt haben.

2 Hintergrund

2.1 Nanopartikel in der Umwelt

Nanopartikel werden seit Urzeiten auch durch natürliche Prozesse in der Umwelt gebildet. In terrestrischen Lebensräumen entstehen nanoskalige Partikel beispielsweise durch Bodenerosion, in aquatischen Systemen durch Kolloidbildung und in der Atmosphäre liegen vulkanische Stäube im Nanometerbereich vor (Handy et al., 2008). Seit Beginn der Industrialisierung werden zudem anthropogen erzeugte Nanopartikel in Form von Neben- oder Abfallprodukten in die Umwelt eingetragen. So sind nach Shi et al. (2001) in der urbanen Atmosphäre in der Nähe von Straßen heutzutage beispielsweise 36 bis 44 % der vorliegenden Partikel nanopartikulär (< 10 nm).

Im Unterschied zu diesen natürlichen oder unkontrolliert freigesetzten Nanomaterialien werden synthetische Nanomaterialien jedoch für spezielle Anforderungen und Funktionen konstruiert und entwickelt. So können sie beispielsweise durch gezielte Oberflächenmodifikation deutlich höhere oder neuartige physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen. Eine Emission dieser hochtechnischen Materialien in die Umwelt birgt daher Risiken, die mit dem heutigen Kenntnisstand nicht abschätzbar sind.

Der Nachweis industriell gefertigter Nanopartikel in der Umwelt erwies sich in den letzten Jahren als höchst komplex, da zunächst eine Trennung der synthetischen Partikel von der natürlichen Partikelmatrix erforderlich ist. Tiede et al. (2009) entwickelten ein sehr aufwendiges Verfahren, das diese Herausforderung durch eine extensive Auftrennung der Partikelgrößen durch hydrodynamische Chromatographie bewerkstelligt, die der chemischen Analytik durch ICP-MS vorgeschaltet ist. Diese und vergleichbare Entwicklungen bringen vielversprechende Verfahren hervor, die ein flächendeckendes Monitoring von Nano-Emissionen in die Umwelt in Zukunft möglich machen könnten. Ein Nachweis der erwarteten Umwelteinträge gelang jedoch bereits vor einigen Jahren am Beispiel synthetischer Titandioxid-Nanopartikel (nano-TiO₂). Durch elektronen-mikroskopische Auswertung konnten Kaegi et al. (2008) den Eintrag der Partikel über den Regenwasserabfluss einer Außenfassade in die aquatische Umwelt belegen.

2.2 Titandioxid-Nanopartikel: Eigenschaften und Verwendung

Die Anwendungen von Titandioxid basieren auf zwei charakteristischen Eigenschaften des Materials: Auf der einen Seite wird Titandioxid bereits seit Jahrzehnten als Weißpigment in Farben genutzt. Aufgrund seines enorm hohen Brechungsindex von 2,7 reflektiert TiO₂ das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts. In der nanopartikulären Form erscheint

Titandioxid dabei optisch transparent und kann so heute extensiv als UV-Blocker in Sonnencreme, Kosmetikprodukten und Beschichtungen von Verpackungen eingesetzt werden. Auf der anderen Seite wirkt der Halbleiter photokatalytisch und kann unter Einwirkung von Strahlung im UV-Bereich die Oxidation organischer Verbindungen anregen. Die starke Oberflächenvergrößerung bei nanopartikulärem Titandioxid führt zu einer enormen Steigerung dieser katalytischen Effekte im Vergleich zu den Bulkmaterialien, wodurch nano-TiO₂ heute sehr vielseitig und innovativ als Photokatalysator eingesetzt wird, wie beispielsweise in Solarzellen, photokatalytisch wirksamen Farben oder Oberflächenbeschichtungen (Klaine et al., 2008). Eine Darstellung der Fraunhofer-Gesellschaft fasst die möglichen Anwendungsbereiche photokatalytischer Oberflächenbeschichtungen zusammen (Abb. 2.1).

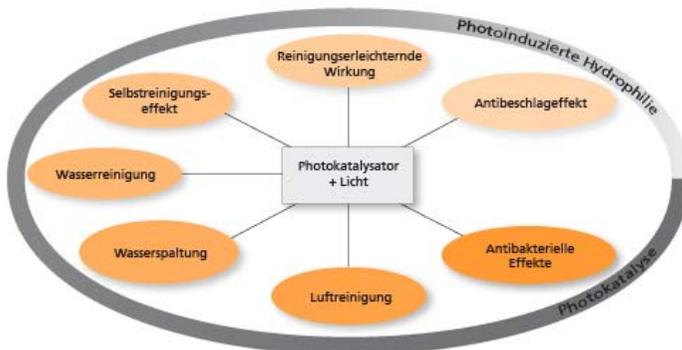


Abb. 2.1 Anwendungsmöglichkeiten photokatalytischer Oberflächen aus nano-TiO₂. Quelle Fraunhofer-Allianz Photokatalyse.

Die photokatalytische Wirkung von Titandioxid wird durch die Anregung der Valenzelektronen des Halbleiters hervorgerufen und führt zu einer Ausbildung reaktiver Paare von Elektronen und Elektronenlücken. Die benötigte Anregungsenergie hängt dabei von der Kristallform des Materials ab. Rutil und Anatas sind die Kristallformen, die am weitesten verbreitet sind und werden bei einer Energie von 3,23 eV bzw. 3,06 eV angeregt. Das entspricht der Energie der Strahlen des oberen Spektralbereichs des ultravioletten Lichts (UV-Licht) mit Wellenlängen von 385 nm für Rutil und 400 nm für Anatas. Wie in Abb. 2.2 schematisch dargestellt, werden durch die Anregung Elektronen vom Valenzband über die Bandlücke auf das Leitungsband angehoben. Es entstehen freie Elektronen (e⁻) sowie Elektronenlücken (h⁺), die hochreaktiv sind und in Anwesenheit von Sauerstoff oder Wasser

zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen (Bickley et al., 1991, Bar-Ilan et al., 2013).

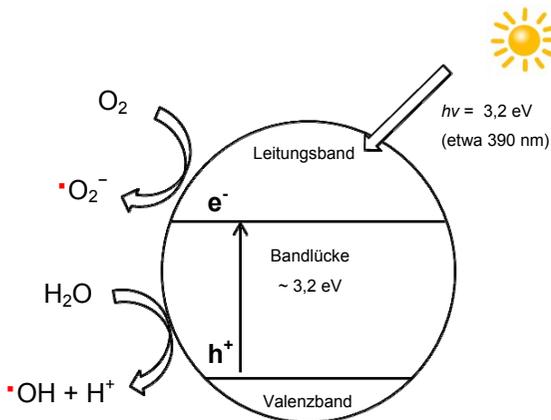
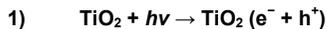
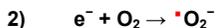


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Photokatalyse an Titandioxidpartikeln. In Anlehnung an Huang et al. (2012). h^+ : positive Elektronenlücke; e^- : freies Elektron, $h\nu$: Strahlungsenergie in eV.

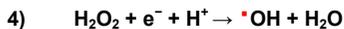
Die Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge löst folgende Reaktionen aus:



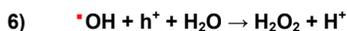
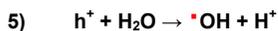
Das freigesetzte Elektron führt zur Reduktion von Sauerstoff in unmittelbarer Umgebung, Superoxid wird gebildet:



In Folgereaktionen bilden sich Wasserstoffperoxid sowie Hydroxidradikale:



Das Elektronen-Loch muss aufgefüllt werden, es kommt zur Oxidation umgebender Verbindungen, wie z.B. H_2O :



Über diese Mechanismen sind TiO₂-Nanopartikel in der Lage, auch andere Verbindungen in ihrer Umwelt zu photooxidieren (Minelli and Tantra, 2012). Diese Eigenschaften werden beispielsweise in selbstreinigenden Oberflächenbeschichtungen genutzt: Unter Sonneneinstrahlung wird organischer Schmutz oder auch mikrobielle Verunreinigung photooxidiert, wodurch die Verbindungen wasserlöslich werden und mit dem Regen abgespült werden können. Über diesen UV-induzierten Mechanismus degradieren TiO₂-Nanopartikeln auch organische Schadstoffe wie beispielsweise ‚Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe‘ (PAKs) und sollen deshalb für die Sanierung belasteter Abwässer oder Böden eingesetzt werden (Wen et al., 2002, Dong et al., 2010). Mögliche Auswirkungen dieser photokatalytischen Reaktionen auf die Umwelt werden im folgenden Kapitel erläutert.

2.3 Schädwirkung von Titandioxid-Nanopartikeln

Sowohl das Verhalten der Nanopartikel in exponierten Organismen, als auch deren toxische Wirkung variiert stark mit der Partikelart auf der einen, und den gewählten Testsystemen und -bedingungen auf der anderen Seite. Die mittleren EC₅₀-Werte liegen dabei meist im höheren mg/l-Bereich, womit nano-TiO₂ als schädliche Substanz eingeordnet werden muss (Baun et al., 2008, Kharu and Dubourguier, 2009). Ein Großteil der bisher gewonnenen Daten zur Toxizität von Nanomaterialien wurde in aquatischen Testsystemen erhoben, wobei der Flohkrebs *Daphnia magna* am häufigsten als Testorganismus Verwendung findet. Besonders der Einsatz benthischer Organismen zur Bestimmung toxikologischer Effekte von nano-TiO₂ wurde bisher stark vernachlässigt. Angesichts des Agglomerations- und Sedimentationsverhaltens von Nanomaterialien in aquatischen Systemen wird eine intensive Untersuchung ihrer Wirkung speziell in diesem voraussichtlich stark belasteten Lebensraum heute nachdrücklich gefordert (Handy et al., 2012).

Ein bedeutender Parameter für die Toxizität von TiO₂-Materialien ist - wie aufgrund ihrer photokatalytischen Aktivität erwartet - die Einwirkung von UV-Strahlung auf die Partikel. Untersuchungen an *Escherichia coli* konnten schon frühzeitig zeigen, dass die antibakterielle Wirkung von TiO₂ unter Bestrahlung durch die photokatalytische Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verstärkt wird (Maness et al., 1999).

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen in Organismen ist ein natürlich auftretender Prozess, der beispielsweise durch freie Elektronen an der inneren Membran der Mitochondrien auftritt. Gezielte Abwehrmechanismen machen die reaktiven Verbindungen in Organismen unter normalen Bedingungen unschädlich. Erhöhter oxidativer Stress führt jedoch schnell zu einer Überlastung dieser Abwehrmechanismen, woraufhin ROS in exponierten Zellen akkumulieren und eine oxidative Schädigung der Zellstrukturen hervorrufen können. Sie regen dabei zudem verschiedene zelluläre Signaltransduktionen - wie beispielsweise die

Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren – an, die Entzündungsreaktionen zufolge haben (Schmid et al., 2009). Die starke Oberflächenvergrößerung bei nanopartikulärem Titandioxid führt im Vergleich zu Bulkmaterialien zu einer enormen Steigerung der beschriebenen photokatalytischen Aktivität, die mit einer gesteigerten Generation reaktiver Sauerstoffspezies einhergeht. Eine erhöhte Toxizität der Nanomaterialien unter Einwirkung von Bestrahlung ist deshalb durchaus zu erwarten.

2.3.1 Genotoxizität von nano-TiO₂

Über die mutagene und teratogene Wirkung von Nanomaterialien ist bisher wenig bekannt. Landsiedel et al. (2009) fassen die bereits gewonnenen Erkenntnisse in einem ausführlichen Review zusammen. Die meisten Daten der aufgeführten Studien – 19 von insgesamt 26 - wurden dabei mit dem Comet-Assay gewonnen, der DNA-Schädigungen an eukaryotischen Zellen elektrophoretisch nachweisen kann. Getestete TiO₂-Nanopartikel zeigten dabei in einigen Untersuchungen signifikante genotoxische Effekte. Für Anatas-Partikel einer Größe von 10 und 20 nm wurden im Comet-Assay an menschlichen Epithelzellen der Bronchien beispielsweise Strangbrüche und Schädigungen der Basen nachgewiesen, die durch oxidative DNA-Schädigung im Dunkeln, also in Abwesenheit photokatalytischer Prozesse induziert wurden (Gurr et al., 2005). Nakagawa et al. (1997) konnte für P25 – das Material, das auch in der vorliegenden Studie untersucht wurde, - an Lymphomzellen der Maus hingegen im Dunkeln keine genotoxischen Effekte nachweisen. Eine Exposition gegenüber simulierter Sonnenstrahlung über 50 Minuten induzierte jedoch DNA-Schädigung durch nTiO₂, die mit zunehmender UV-Energie anstieg. Auch für menschliche Fibroblasten konnte durch simulierte Sonnenstrahlung (SSR) eine genotoxische Wirkung von Titandioxid-Nanopartikeln induziert werden, die in Dunkelheit nicht eintrat (Dunford et al., 1997). Die Intensität entsprach dabei der Energiemenge, die auch unter natürlichen Bedingungen unter der oberen Hautschicht (*Stratum corneum*) auftritt. Durch einen Test mit Plasmiden mit ringförmiger DNA (supercoiled DNA) konnten die Autoren zudem Strangbrüche durch die Behandlung mit nano-TiO₂ und SSR nachweisen. Auch eine neu entwickelte elektrochemische Methode von Chen et al. (2007) legt nahe, dass nTiO₂ unter Einfluss von UV-Strahlung ROS bildet, die die DNA oxidativ schädigen können. Eine aktuellere Studie von Bar-Ilan et al. (2013) belegt die Bildung von DNA-Addukten durch bestrahlte nTiO₂-Partikel bei Zebrafischen.

2.3.2 Nanopartikel als potentielle Carrier für Co-Kontaminanten

Nanopartikel haben in Bezug auf ihre Masse sehr große, und damit sehr reaktive Oberflächen. Basierend auf Wechselwirkungen wie elektrostatischer Anziehungen und Van-der-Waals-Kräften interagieren sie mit anorganischen und organischen Substanzen ihrer

Umgebung. Ihre Größe ermöglicht ihnen zudem das Eindringen in bakterielle aber auch tierische und pflanzliche Zellen und macht sie damit zu potentiellen Transportvehikeln für adsorbierte Co-Kontaminanten in Organismen. Die Anzahl von Studien zu Mischtoxizitäten konventioneller Schadstoffe mit Nanopartikeln ist bisher sehr gering und so fordern beispielsweise Hartmann and Baun (2010) eine verstärkte Untersuchung eben dieser sogenannten „Nano-Cocktail“ Effekte.

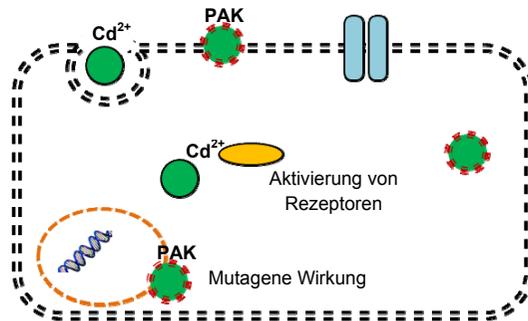


Abb. 2.3 Schematische Darstellung möglicher Carriereffekte von Nanopartikeln durch zelluläre Aufnahme schadstoffbeladener Partikel über Endocytose oder Diffusion durch die Membran.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Baun wiesen bereits nach, dass C_{60} die Toxizität von Phenanthren gegenüber der Grünalge *Pseudokircheriella subcapitata*, und dem Flohkrebs *Daphnia magna* erhöht. 85 % des vorliegenden Phenanthren sorbierte dabei an die C_{60} Aggregate, konnte durch die exponierten Organismen jedoch trotzdem aufgenommen werden (Baun et al., 2008). Die Nanopartikel fungieren hier offenbar als Träger der sorbierten Co-Kontaminanten.

2.4 Phenanthren als Co-Kontaminant

Die Schadstoffgruppe der polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs) bildet die Klasse partikulär gebundener, mutagener und karzinogener Substanzen, die in der Umwelt am stärksten verbreitet ist (Yan et al., 2004). Als Vertreter der PAKs wurde Phenanthren (PHE) zur Untersuchung der Wechselwirkungen mit nano- TiO_2 ausgewählt:

Phenanthren

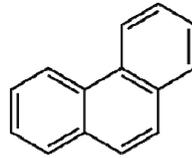
Summenformel: C₁₄H₁₀

Molekulargewicht: 178,23 g/mol

Löslichkeit: 0,0011 g/l bei 25°C

Dampfdruck: 0,022 Pa bei 25°C

Wassergefährdungsklasse: 2



Phenanthren ist in der aquatischen Umwelt stark verbreitet und steht auf der Liste prioritärer Schadstoffe der ‚United States Environmental Protection Agency‘, US EPA (OFR, 1982). Als lipophile Substanz wirkt Phenanthren narkotisch (Mode of Action 1) und stört die Zellfunktionen durch Einlagerung in die Membran belasteter Organismen.

Bisherige Studien zur Mischtoxizität von TiO₂-Nanopartikeln wurden ausschließlich mit hydrophilen Co-Kontaminanten wie z.B. Cadmium (Zhang et al., 2007) durchgeführt. Untersuchungen zum photokatalytischen Abbau von Phenanthren durch nTiO₂ weisen jedoch auf starke Wechselwirkungen der beiden Kontaminanten hin (Wen et al., 2002, Dong et al., 2010). Eine Sorption von Phenanthren an die Oberfläche der Nanopartikel könnte bei Aufnahme der mit Schadstoff beladenen Partikel durch *C. elegans* zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit des lipophilen Schadstoffs führen. Eine ähnliche Wirkung konnte Offermann et al. (2009) für die Verfügbarkeit von Cadmium nachweisen, das an Polystyrenpartikel sorbierte. Um eine Änderung der Verfügbarkeit des PAKs nachzuweisen, untersucht die vorliegende Studie die Expression der Monooxygenase *cyp-35C1*, die durch Xenobiotika wie PAKs induziert wird (siehe Kapitel 2.7). Ein Einfluss des Nanomaterials auf die Toxizität von Phenanthren wird mit Hilfe eines chronischen Biotests mit *Caenorhabditis elegans* durchgeführt.

Die Bestrahlung mit Wellenlängen im UV-Bereich kann die Toxizität von PAKs erhöhen: Das aromatische Ringsystem von PAKs absorbiert Strahlung und geht dabei in einen reaktiveren Zustand über, der toxische Effekte auslöst. Dieser Mechanismus wird als Phototoxizität bezeichnet und wird beispielsweise durch Yan et al. (2004) beschrieben. Wie belegt werden konnte, wirkt auch Phenanthren phototoxisch: Eine simultane Bestrahlung exponierter Daphnien senkte den EC₅₀-Wertes von über 1024 µg/l auf 378 µg/l (Wernersson, 2003). Die Anwesenheit photoaktivierter TiO₂-Nanopartikel könnte die phototoxische Wirkung von Phenanthren durch Übertragung oder Entzug von Elektronen noch verstärken. Die vorliegende Studie untersucht deshalb den Einfluss simulierter Sonnenstrahlung auf die Wechselwirkung der Kontaminanten an *Caenorhabditis elegans* als boden- und sedimentlebenden Organismus. Eine Veränderung der toxischen Effekte der weltweit verbreiteten Schadstoffgruppe der PAKs durch TiO₂-Nanopartikel hätte langfristige Folgen für belastete Ökosysteme.

2.5 Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

2.5.1 Eigenschaften und Lebensweise

Caenorhabditis elegans ist ein freilebender Nematode (Fadenwurm), der besonders in humusreichen Böden der gemäßigten Zonen verbreitet ist. Als Nematode repräsentiert er die artenreichste und häufigste Metazoengruppe in Sedimenten und Böden (Traunspurger et al., 1995), die eine sehr bedeutende Rolle in benthischen und terrestrischen Nahrungsnetzen einnimmt (Yeates et al., 1993, Traunspurger, 1997). *Caenorhabditis elegans* ernährt sich von Mikroorganismen, vorwiegend von Bakterien, und ist vereinzelt auch in aquatischen Sedimenten zu finden (Hirschmann, 1952, Zullini, 1988). Bereits seit den 1970er Jahren ist *C. elegans* ein beliebter Modellorganismus der Molekular- und Entwicklungsbiologie (Brenner, 1994). Die frühe Entschlüsselung seines gesamten Genoms 1998 steigerte seine Attraktivität als Forschungsobjekt in vielen Disziplinen (Hope, 1999). Aufgrund seiner endobenthischen Lebensweise eignet sich *C. elegans* für die ökotoxikologische Bewertung belasteter Böden und Sedimente (Traunspurger, 1997).

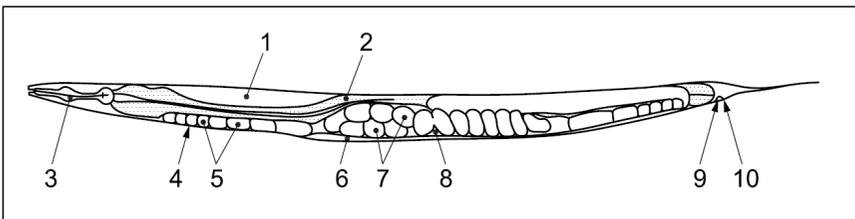


Abb. 2.4 Schematische Darstellung der Anatomie eines adulten Hermaphroditen mit (1) Ovar, (2) Intestinaltrakt, (3) Pharynx, (4) Ovidukt, (5) Oozyten, (6) Uterus, (7) Eiern, (8) Vulva, (9) Rektum und (10) Anus; aus ISO 10872.

Im Jahre 2010 wurde ein Nematodenkontakttest isonormiert (ISO 10872), der *C. elegans* als Testorganismus zur Erfassung der chronischen Toxizität von festen und flüssigen Substraten einsetzt. *C. elegans* ist transparent und hat, ähnlich wie andere Nematoden, einen wurmförmigen, unsegmentierten Körper. Im adulten Stadium erreicht er eine Länge von bis zu 1,5 mm bei einer konstanten Zellzahl von 959 Zellen. *C. elegans* bildet einfache Gewebe und Organe aus, die in Struktur und Funktion mit denen höherer Organismen vergleichbar sind: Wie in Abb. 2.4 dargestellt besitzt er neben einem Gastrointestinaltrakt, der sich in einen muskulären Pharynx, Mittel- und Enddarm gliedert, Gonaden, die aus Ovar, Ovidukt, Oozyten, Uterus und Vulva aufgebaut sind. *C. elegans* zeichnet sich zudem durch ein exkretorisches Organ, ein einfaches Nervensystem und Muskelgewebe aus (Altun and Hall, 2009).

2.5.2 Reproduktion

Bei *C. elegans* werden zwei Geschlechter unterschieden: Ein hermaphroditisches Geschlecht (XX), das sich durch Selbstbefruchtung fortpflanzen kann, und ein männliches Geschlecht (XY), das sich durch Kopulation mit einem Hermaphroditen geschlechtlich fortpflanzt. Im Falle der ungeschlechtlichen Fortpflanzung der Hermaphroditen ist die Rekombination des Genoms sehr gering, was *C. elegans* für die Nutzung als ökotoxikologischen Testorganismus interessant macht.

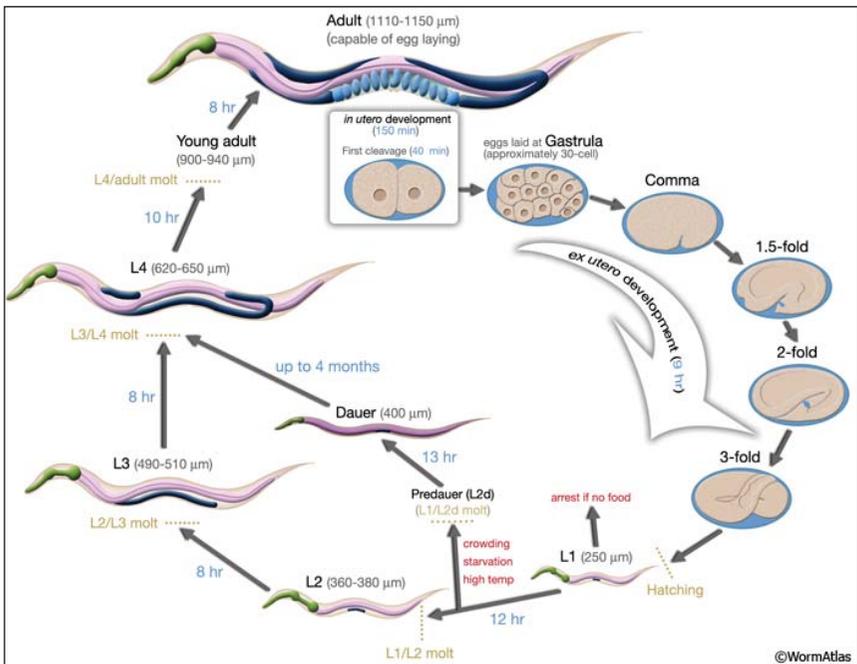


Abb. 2.5 Reproduktionszyklus von *C. elegans*. Quelle Altun and Hall (2009), www.wormatlas.org

Die gesamte Generationszeit von *C. elegans* beträgt in Abhängigkeit von der Temperatur 3 bis 5 Tage. Bei 20°C ist der Reproduktionszyklus, ausgehend vom abgelegten Ei bis zur maximalen Eiproduktion der Nachkommen innerhalb von 96 Stunden abgeschlossen. Wie in Abb. 2.5 dargestellt durchläuft *C. elegans* bei seiner Entwicklung vier Juvenilstadien, bevor er das adulte Stadium erreicht: L1 bis L4. Sind die Umweltbedingungen beim Übergang in das zweite Juvenilstadiums L2 unvorteilhaft für weiteres Wachstum, z.B. durch Nahrungsmangel, hohe Temperaturen oder überhöhte Populationsdichte, kann *C. elegans* in

ein Dauerlarvenstadium übergehen. In diesem Dauerstadium kann *C. elegans* unter genannten Stressbedingungen bis zu 4 Monate überdauern, ohne dass Alterungsprozesse eintreten. Sobald günstigere Umweltbedingungen herrschen, tritt der Organismus wieder in den Reproduktionszyklus ein und kann sich uneingeschränkt fortpflanzen (Altun and Hall, 2009).

2.5.3 Nahrungsaufnahme und Defäkation

Caenorhabditis elegans ist ein Filtrierer und ernährt sich von Bakterien in Flüssigsuspensionen, wie Porenwasser. Durch eine Kontraktion im vorderen Teil des Pharynx erweitert er dessen Lumen und saugt Partikel bis zu einer Größe von 3 µm ein (Fang-Yen et al., 2009). Durch weitere Muskelkontraktionen werden die Nahrungspartikel in den terminalen Bulbus transportiert, wo sie akkumuliert und durch Mahlzähne mechanisch aufgebrochen werden. Die aufgenommene Flüssigkeit kann hier über Exkretionskanäle ausgeschieden werden. Anschließend wird der akkumulierte Nahrungsbrei in den gastrointestinalen Trakt von *C. elegans* befördert, wo die Verdauung eintritt. Avery and Shtonda (2003) konnten zeigen, dass Partikel mit einer Größe von 500 nm und kleiner mit der Flüssigkeit durch die Exkretionskanäle ausgeschieden werden können. Eine Aufnahme von Nanopartikeln in den Pharynx von *C. elegans* ist also möglich, wobei auch eine Exkretion der Partikel vor der Ingestion in den Verdauungstrakt erfolgen kann.

Etwa alle 45 – 50 Sekunden findet bei *C. elegans* eine vollständige Defäkation statt, die durch ein kontrolliertes Muskelkontraktionsprogramm gesteuert wird. Sie beginnt mit der sogenannten pBoc-Phase (posterior body muscle contraction) und wird durch die anteriore Kontraktion (aBoc) gefolgt von der „Gesamt Muskelkontraktion“ (EMC-Phase = enteric muscle contraction) abgeschlossen (Avery and Thomas, 1997).

2.5.4 Besondere Eignung von *C. elegans* als Testorganismus für die Untersuchung von Nanomaterialien

Die Wirkung synthetischer Nanomaterialien in Böden und Sediment ist bisher nahezu unbekannt, obwohl besonders für diese Lebensräume eine starke Akkumulation der Kontaminanten erwartet wird (Gottschalk et al., 2009). Eine Charakterisierung der Nanomaterialien wird durch die Anwesenheit einer partikulären Matrix im Testsystem allerdings enorm erschwert. Kenntnisse über den Zustand der Nanomaterialien im Testsystem sind jedoch Voraussetzung für die Interpretation der Daten und die Anwendung alternativer Dosierungsmetriken wie Partikelanzahl oder Gesamtoberfläche der Partikel. Der Nematodentest mit dem Bodenorganismus *C. elegans* kann sowohl als Boden- oder Sedimenttest durchgeführt werden, er erlaubt gleichzeitig die Durchführung im Flüssigmedium (ISO-10872, 2010). Eine entsprechende Testdurchführung ermöglicht damit

die Nutzung eines Bodenorganismus und eine ausführliche Partikel-Charakterisierung zugleich, weshalb Handy et al. (2012) ein derartiges Vorgehen empfehlen. Des Weiteren schlagen Handy und seine Coautoren die Nutzung von *C. elegans* für die Untersuchung von Nanomaterialien als Ersatz für häufig verwendete Bodenorganismen, wie beispielsweise Regenwürmer vor. Durch eine schnelle Generationszeit von 72 bis 96 Stunden kann die Testdauer von Langzeitexperimenten durch den Einsatz von *C. elegans* deutlich herabgesetzt werden, was angesichts der problematischen Unterhaltung der Testkonditionen bei Nanomaterialien (siehe 2.8) ein enormer Vorteil ist.

Hinzu kommt, dass *C. elegans* transparent ist und Organe wie der Pharynx und der gastrointestinale Trakt mikroskopisch gut erkennbar sind. Angesichts der schnellen Defäkationszyklen von *C. elegans* lässt sich die Aufnahme und Ausscheidung partikulärer Substrate daher mikroskopisch beobachten. Diese Gegebenheiten machen den Nematoden zu einem idealen Testorganismus für die Untersuchung des Verhaltens der Nanopartikel in exponierten Invertebraten.

2.6 Indikatoren für oxidativen Stress durch nTiO₂

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie Hydroxyl-Radikale (OH[·]), Superoxid (O₂^{·-}) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Organismen führt zu oxidativem Stress, der bei unzureichenden Abwehrmechanismen zu starken Zellschädigungen bis hin zur Dysfunktion der Zellen führen kann (Cabiscol et al., 2000, Imlay, 2003). Basierend auf ihrer photokatalytischen Aktivität können Titandioxid-Nanopartikel besonders unter Einwirkung von UV-Strahlung die Generation dieser zellschädigenden Verbindungen induzieren. Um derartige Wirkmechanismen nachzuweisen, können zum einen molekulare biologische Antworten untersucht werden, zum anderen können biologische Abbauprodukte oxidativer Prozesse nachgewiesen werden.

2.6.1 Molekulare Antworten: Funktion und Induktion von Superoxiddismutasen

Superoxiddismutasen (SOD) bilden die einzige eukaryotische Enzymgruppe, die in der Lage ist, den Abbau von Superoxid-Radikalen zu katalysieren. Superoxid reagiert dabei unter Einwirkung von SOD zu Wasserstoffperoxid, das in der Folgereaktion durch Catalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden kann. *C. elegans* hat fünf SOD-Enzyme: SOD-1 und -5 liegen in der Zelle vornehmlich cytoplasmatisch vor, SOD-4 ist extrazellulär lokalisiert, während SOD-2 und SOD-3 in den Mitochondrien auftreten (Johnston and Ebert, 2012).

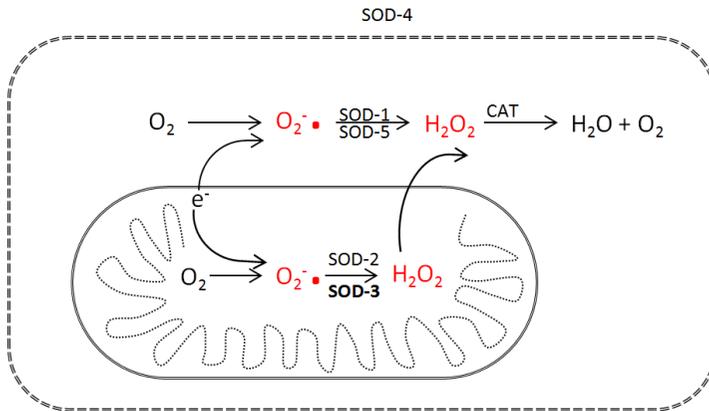


Abb. 2.6 Schematische Darstellung der ROS Produktion und ihrer Detoxifikation in einer *C. elegans* Zelle frei nach Johnston and Ebert (2012). Superoxiddismutasen (SOD) katalysieren die Bildung von H_2O_2 aus $O_2^{\cdot-}$, Katalasen (CAT) bauen H_2O_2 ab zu H_2O und O_2 . SOD-1 und SOD-5 liegen im Cytosol der Zelle vor, SOD-2 und -3 im Mitochondrium, SOD- 4 liegt extrazellulär vor.

Van Raamsdonck und Hekimi konnten 2012 zeigen, dass *C. elegans* Knock-out Mutanten, die keine Sod-Aktivität mehr zeigen, zwar eine normale Lebensdauer aufweisen, jedoch erheblich sensitiver auf multiple Stressoren reagieren. Die Autoren nutzten die Superoxid-Generatoren Paraquat und Juglon, um diese Sensitivität aufzuzeigen: *C. elegans* erreichte unter Paraquat-Einwirkung nur das L1 Stadium, während Juglon eine erhebliche Mortalität induzierte. Auf eine H_2O_2 Exposition reagierte die *sod-12345* Mutante jedoch nicht empfindlicher als der Wildtyp. Diese Beobachtung belegt, dass die ausgeschalteten Superoxiddismutasen bei der Abwehr von Superoxid eine Rolle spielen, während Wasserstoffperoxid durch andere Enzyme unschädlich gemacht wird. Vorhergehende Untersuchungen konnten zeigen, dass der Verlust eines der 5 Sod-Gene durch eine verstärkte Expression der übrigen SOD-Gene kompensiert werden kann (Van Raamsdonk and Hekimi, 2012). SOD dient demnach sehr spezifisch der Abwehr von Superoxid, wobei die fünf *sod*-Gene in *C. elegans* offenbar alternativ wirken können und nach Bedarf induziert werden können.

In dieser Arbeit soll die Genexpression von *sod-3* unter Einfluss von $nTiO_2$ auf mRNA-Ebene durch Real-Time-PCR untersucht werden. Durch die Nutzung eines SOD-3:GFP transgenen *C. elegans* Stamms (CF1553) soll zudem die Enzymkonzentration der Superoxiddismutase beobachtet werden.

2.7 *cyp-35C1*-Expression als Biomarker für PAK-Verfügbarkeit

CYP-35C1 gehört zur Superfamilie der streng konservativen Cytochrom P₄₅₀-abhängigen Monooxygenasen (CYPs), die bei fast allen Organismen zu finden ist. CYPs enthalten Häm als prosthetische Gruppe und katalysieren den oxidativen Metabolismus vieler endogener und exogener Verbindungen. Für viele Proteine dieser Familie konnte eine Beteiligung an der Biometabolisierung lipophiler Xenobiotika nachgewiesen werden (Rendic, 2002). Das Genom von *C. elegans* enthält etwa 80 *cyp*-Gene (nach Dr. David Nelson; <http://drnelson.utmem.edu/elegans.html>). Eine Beteiligung dieser CYPs an der Biometabolisierung von lipophilen Fremdstoffen analog zu den Mechanismen der Vertebratenzellen liegt nahe, ein eindeutiger Beweis wurde bisher jedoch nicht erbracht. Eine systematische Genexpressionanalyse der CYP Gene in *C. elegans* durch Menzel et al. (2001) zeigte jedoch, dass besonders die Unterfamilie *cyp-35* durch eine Vielzahl von Xenobiotika induzierbar ist, wie z.B. durch Fluoranthren und Benzo(a)pyren aus der Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs). Die Induktoren bilden dabei in der Zelle mit entsprechenden ligandengesteuerten Rezeptoren einen Ligand-Rezeptor-Komplex aus, der in den Zellkern wandert und die Transkription der *cyp-35*-Gene induziert. Aufgrund der Homologie der funktionellen Regionen von Phenanthren, als Modellsubstanz der vorliegenden Studie, mit Fluoranthren und Benzo(a)pyren (siehe Abb. 2.7) wird erwartet, dass auch Phenanthren die Genexpression der CYPs induziert. Dieser Wirkmechanismus wurde bisher für Phenanthren noch nicht nachgewiesen, weshalb zunächst die Eignung dieses Biomarkers als Indikator der Phenanthrenverfügbarkeit bestimmt werden muss. Anschließend wird die Expression von *cyp-35C1* als molekularer Biomarker zur Untersuchung des Einflusses von nTiO₂ auf die Aufnahme von Phenanthren als Co-Kontaminant bestimmt.

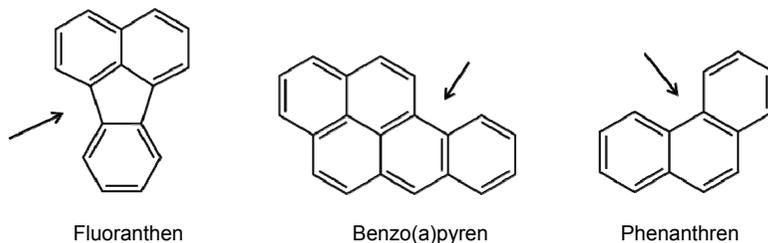


Abb. 2.7 Strukturformeln der PAKs Fluoranthren, Benzo(a)pyren und Phenanthren mit ihren funktionellen Bereichen (Bay-regions).

2.8 Toxikologische Untersuchung von Nanomaterialien: Relevanz der Partikel-Charakterisierung

Die Anzahl der Studien zur Toxizität von Nanopartikeln steigt in den letzten Jahren ungebremst: Nach Caballero-Díaz et al. (2013) verzehnfachte sich die Zahl der Veröffentlichung von 347 aus den Jahren 2000 bis 2004 auf 3071 Publikationen aus den Jahren 2010 bis 2012 (genutzte Quelle SciFinder). Nach Kahru and Ivask (2012) lag der Anteil der Studien zu Nanoökotoxikologie 2011 mit insgesamt 204 Publikationen im Verhältnis zur Nanotoxikologie mit 5669 Publikationen bei etwa einem Zwanzigstel (Quelle ISI WoS). Die Übereinstimmung der erhobenen toxikologischen Daten ist dabei jedoch sehr gering: Die beobachteten Effekte sind höchst variabel oder sogar widersprüchlich. So stellt Klaine et al. (2008) in seinem Review etwa die Variation der Effekte von Fulleren gegenüber *Daphnia magna* dar, die in Abhängigkeit der Präparation der Suspensionen von LC₅₀-Werten von 460 µg/l (Oberdörster et al., 2006) bis über 35 mg/l reichen (Lovern and Klaper, 2006).

Zurückgeführt werden die großen Abweichungen auf die starke Abhängigkeit der Effekte der Nanopartikel von den physikalisch-chemischen Bedingungen im Testsystem und auf einen Mangel spezifischer Standards zur Untersuchung toxikologischer und ökotoxikologischer Effekte von Nanomaterialien, insbesondere in Bezug auf Herstellung und Charakterisierung der Testmaterialien (z.B. Kato et al. (2009)). Die Nutzung bestehender Testnormen, die für konventionelle Schadstoffe entwickelt wurden, ist problematisch, besonders in Bezug auf die Sicherstellung einer gleichmäßigen Exposition gegenüber den Nanomaterialien. Anders als konventionelle, lösliche Schadstoffe liegen Nanopartikel in den Testsystemen partikulär vor. Ihr Zustand und Verhalten im Testsystem wird durch eine Vielzahl von Parametern beeinflusst: So hängt die Oberflächenladung, die eng mit dem Aggregationsverhalten der Partikel verknüpft ist, stark von dem pH-Wert des Mediums und ihrer Ionenstärke ab. Unterschiede in den Partikelgrößen können sich wiederum stark auf die Effekte der Materialien auswirken (Handy et al., 2012). Schon 2005 diskutierten Oberdörster et al. (2005) den Einfluss des physikalischen Zustands von Nanomaterialien auf ihre Effekte. Heute bekräftigen viele Autoren, wie beispielsweise Klaine et al. (2008) und Handy et al. (2008) die Bedeutung einer ausführlichen Charakterisierung der Nanomaterialien bezüglich ihrer Materialeigenschaften und ihres physikalischen Zustands in den toxikologischen Testsystemen. Sie fordern einstimmig die Etablierung standardisierter Testmethoden für Nanomaterialien. Auch gezielte Fallstudien an nTiO₂ und Fullerenen untermauern diese dringende Notwendigkeit (Valsami-Jones et al., 2008, Spohn et al., 2009).

Nicht zuletzt die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) hat es sich deshalb zur Aufgabe gemacht, konventionelle Testnormen zu validieren und nötige Anpassungen für die Untersuchung von Nanomaterialien zu identifizieren. Dazu

wurde 2007 das „*Sponsorship Programme for Testing of Manufactured Nanomaterials*“ ins Leben gerufen, das 13 industriell gefertigte Nanomaterialien eingehend in Bezug auf ihre Toxizität und ihr Verhalten in der Umwelt untersucht. Bisher gibt die OECD vorläufige Empfehlungen für die Vorbereitung und Dosierung für die Untersuchung industriell gefertigter Nanomaterialien (ENV/JM/MONO (2010) 25. OECD).

Die vorliegende Studie beteiligt sich an dem erwähnten OECD Programm und setzt kontrollierte Batch-Materialien der OECD als Testmaterialien ein.

Grundlegendes Anliegen der vorliegenden Arbeit war, aufgrund der bisherigen Erkenntnisse eine reproduzierbare Methode zur Herstellung der Testsuspensionen und eine möglichst ausführliche Charakterisierung der Partikel im Testsystem zu entwickeln, basierend auf den entsprechenden Empfehlungen der OECD und aktueller Publikationen zur Testung von Nanomaterialien, im Besonderen nach Handy et al. (2008) und Klaine et al. (2008). Von Bedeutung waren dabei folgende Parameter:

1. Primärpartikelgröße

Die Größe der Einzelpartikel ist maßgeblich für die Oberfläche und die Reaktivität der Partikel. Viele Studien konnten bereits einen Einfluss der Primärpartikelgröße auf die Effekte der Materialien feststellen, wie z.B. Roh et al. (2010). Die Primärpartikelgröße ist zudem der entscheidende Parameter für die Klassifizierung der Materialien als Nano- oder Bulkmaterialien.

2. Sekundäre Partikelgröße

Nanopartikel agglomerieren in Abhängigkeit der Testmedien und ihrer Oberflächenladung im Testsystem und bilden sogenannte sekundäre Partikel aus, die in zwei Ausprägungen auftreten können und nach ISO folgendermaßen differenziert werden:

Agglomerate: Ansammlung schwach gebundener Partikel oder Aggregate, deren Oberfläche etwa der Summe der Oberflächen der Einzelkomponenten entspricht. Agglomerate werden durch schwache Kräfte, wie zum Beispiel van der Waals Kräfte, zusammengehalten (ISO TS27687 2008).

Aggregate: Stark gebundene oder fusionierte Partikel, deren äußere Oberfläche signifikant kleiner sein kann, als die Summe der Oberflächen der individuellen Komponenten. Aggregate werden durch starke Kräfte, wie zum Beispiel kovalente Bindungen bzw. starke Ionenbindungen, zusammengehalten (ISO TS28687 2008).

Nach weitläufigem Verständnis hat die sekundäre Partikelgröße einen signifikanten Einfluss auf die Effekte der Nanomaterialien.

3. Zetapotential

Das Zetapotential eines Partikels gibt die Ladung an der Abscherschicht der Partikel an. Es wird neben der Oberflächenladung der Partikel selbst von den Ionen des Umgebungsmediums beeinflusst. Wird die Ionenstärke des Mediums erhöht, wird in der Regel auch das Zetapotential verändert: Negativ geladene Partikel binden dann mehr Kationen und erhöhen damit die Anzahl positiv geladener Teilchen in der Grenzschicht um den Partikel, wodurch die Netto-Ladung selbst abnimmt. Die Ladung an der Abscherschicht hat wiederum einen starken Einfluss auf die Agglomeration der Partikel: Je näher das Zetapotential am isoelektrischen Punkt, das heißt bei 0 mV, liegt, desto stärker agglomerieren die Partikel untereinander. Bei stärker geladenen Partikeln kommt es zu Abstoßungseffekten und die Partikelsuspensionen sind stabiler (Handy et al., 2008). Die Zetapotentiale haben demnach einen maßgeblich steuernden Einfluss auf das Verhalten der Partikel im Testsystem. Zudem beeinflusst das Zetapotential die Bindungskapazität für andere Stoffe im System, beispielsweise Co-Kontaminanten. Die Bestimmung der Zetapotentiale spielt deshalb eine zentrale Rolle bei der Interpretation der toxikologischen Daten.

2.9 Ziele der Arbeit

Der zunehmende Eintrag industriell gefertigter Nanomaterialien in die Umwelt macht eine Risikoabschätzung des Gefährdungspotentials der Kontaminanten unerlässlich. Bisherige Ergebnisse sind hoch variabel und verdeutlichen den Bedarf nach verstärkter Standardisierung der toxikologischen und ökotoxikologischen Untersuchungsmethoden. Die Umweltrelevanz der neuen Kontaminanten wird daher bis heute sehr kontrovers diskutiert. Besonders in terrestrischen und benthischen Lebensräumen, die als Hauptsenke für emittierte Nanomaterialien identifiziert wurden, sind die Erkenntnisse sehr lückenhaft, da eine hinreichende Charakterisierung der Nanomaterialien in partikulären Testsystemen derzeit noch nicht umsetzbar ist.

Ziel dieser Arbeit ist deshalb, die Effekte von nanopartikulärem Titandioxid an einem Modellorganismus zu bestimmen, der die Untersuchung in allen drei Kompartimenten – Wasser, Boden und Sedimenten – ermöglicht. Mit der Untersuchung der Effekte auf *Caenorhabditis elegans* in der Flüssigphase kann die Anforderung an die Charakterisierung der Materialien gewährleistet werden und zugleich ein Bodenorganismus als Testorganismus eingesetzt werden. Somit wird ein grundlegendes Verständnis geschaffen für die Toxizität und das Verhalten der Nanopartikel gegenüber einer der größten und artenreichsten Metazoengruppen in Sedimenten und Böden, der Nematoda (Traunspurger et al., 1995).

Folgenden Fragestellungen wurde dabei im Besonderen nachgegangen:

- 1) Gibt es Unterschiede in den Effekten von Titandioxid-Nanopartikeln auf *C. elegans* im Vergleich zu einem Bulkmaterial? Welche Rolle spielen dabei primäre und sekundäre Partikelgrößen?
- 2) Welchen Einfluss haben Titandioxid-Nanopartikel auf die Verfügbarkeit und Toxizität von Phenanthren als lipophilen Co-Kontaminanten? Gibt es Carrier-Effekte (*cyp-35C1*-Expression)?
- 3) Wie beeinflusst simulierte Sonnenstrahlung die Effekte von nTiO₂ im Vergleich zu bTiO₂? Sind photoaktivierte Effekte auf oxidativen Stress zurückzuführen?
- 4) Welchen Einfluss haben photoaktivierte nTiO₂ Partikel auf die Toxizität von Phenanthren als Co-Kontaminanten?

3 Material und Methoden

3.1 Nematodentest

3.1.1 Kultivierung von *Caenorhabditis elegans*

Als Testorganismus im Nematodentest dient der Wildtyp „*Maupus, N2 var. Bristol*“, der über das *Caenorhabditis Genetics Center (CGC)* bezogen wurde. *C. elegans* wird bei 20°C auf NGM-Agarplatten kultiviert. Als Futter dient ein Bakterienrasen aus *Escherichia coli* Bakterien, der durch Ausstreichen von 700 µl einer Übernachtskultur mit einer FAU > 200 (siehe Kapitel 3.1.2) auf die Agarplatten aufgetragen wurde. Die Dauerlarvenbildung von *C. elegans* (siehe Kapitel 2.5) ist für die Kultivierung der Organismen im Labor von Vorteil und kann für die Haltung von Dauerkulturen und zur Synchronisierung der Testorganismen genutzt werden. Nach etwa 21 Tagen setzt auf den Agarplatten Nahrungsmangel ein, die Würmer hungern und bilden Dauerlarven aus. Die so hergestellten Dauerkulturen können bis zu 2 Monate verwendet werden. Alle 21 Tage wurden die Dauerkulturen durch Überimpfung zweier etwa 1 cm² großer Stücke auf frische Agarplatten erneuert. Zur Herstellung der Testplatten, werden ebenfalls 1 cm² großer Stücke einer mindestens 21 Tage alten Platten auf frische Platten überführt und über 72 Stunden bei 20°C inkubiert. Die Würmer gehen dann zeitgleich nach etwa 12 bis 14 Stunden aus dem Dauerlarvenstadium in das L4 Stadium über und erreichen anschließend die Geschlechtsreife. Die Würmer werden so synchronisiert, alle Nachkommen der ursprünglichen Dauerlarven befinden sich nach 72-stündiger Kultivierung etwa im L1 Stadium.

3.1.2 Kultivierung von *Escherichia Coli*

Als Futter für die *C. elegans* -Kulturen dient der nicht pathogene *Escherichia Coli* Stamm OP₅₀, der ebenfalls über das *CGC* bezogen wurde. Zur Herstellung der Stammkulturen wurden die *E. coli*-Bakterien von der gelieferten Agarplatte in 50 ml LB-Medium überführt und dort über 17 Stunden bei 37°C und 160 U/min geschüttelt. In einem Volumen von 1ml wurden die Stocks in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 20%igen Glycerin bei-20°C gelagert und bis zu 6 Monate verwendet.

Für die Herstellung von Übernachtskulturen, die für die Kultivierung von *C. elegans* und die Durchführung des Nematodentests eingesetzt werden, wurden 20µl eines Stocks in 50 ml LB-Medium überführt und über 17 Stunden bei 37°C unter Schütteln bei 160 U/min inkubiert.

3.1.3 Durchführung

Zur Bestimmung der Toxizität der TiO₂-Partikel wurde der Nematodenkontakttest mit *Caenorhabditis elegans* nach ISO Norm 10872 durchgeführt. Der angewandte Test ist ein chronischer Biotest. Im Gegensatz zu akuten Tests wird der Organismus dabei der Belastung über einen längeren Zeitraum - unter Umständen bis zur gesamten Lebensdauer des Organismus – ausgesetzt um chronische Schadwirkungen zu bestimmen (Fent, 2007). Im Nematodentest erstreckt sich die Exposition bei 20 °C über 96 Stunden und deckt damit den gesamten Reproduktionszyklus des Testorganismus ab (siehe Abb. 2.5). Für die Durchführung des Tests werden die Testorganismen zunächst wie unter Kapitel 3.1.1 beschrieben auf Testplatten synchronisiert. Anschließend werden die Würmer mit M9-Medium von den Testplatten gespült und über eine Gaze mit einer Porenweite von 5 µm filtriert. Das Filtrat enthält dann vorwiegend juvenile Würmer. Mit Hilfe einer Mikropipette – einer ausgezogenen Glaspasteurpipette - werden dann für jede Probe 10 agile Juvenile des L1 Stadiums mit einer Länge von etwa 250 bis 300 µm aufgenommen und in die Testansätze überführt. Anschließend erfolgt die Exposition der Würmer gegenüber der Testsubstanz über einen Zeitraum von 96 Stunden bei 20 °C. Zum Zeitpunkt des Teststarts wird zusätzlich eine Gruppe von 30 Juvenilen zur Bestimmung der mittleren Ausgangslänge der Testorganismen entnommen und unmittelbar durch Hitze abgetötet.

Abb. 3.1 stellt die die Durchführung des Nematodentests schematisch dar.

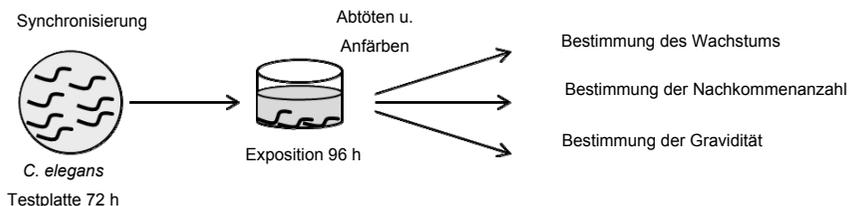


Abb. 3.1. Schematische Darstellung der Durchführung des Nematodentests nach ISO10872

Als Testgefäße dienen im Rahmen dieser Arbeit abweichend zur ISO-Norm Kristallisierschalen aus Quarzglas mit einem Gesamtvolumen von 20 ml. Das Testvolumen wurde entsprechend des Oberflächen/Volumenverhältnisses der ISO-Norm auf 2,5 ml angepasst. Es setzte sich zusammen aus 50 % Testsubstanz (TiO₂ Suspension bzw. Phenanthrenlösung) und 50 % Futtermedium. Als Futtermedium dient eine *E. coli* Suspension, die aus einer *E. coli*-Übernachtskultur (siehe Kapitel 3.1.2) hergestellt wurde. Die Bakterien werden dazu in M9 Medium mit einem Volumenanteil von 0,2 % Cholesterol

überführt. Die Bakteriendichte wurde mit Hilfe eines FAU-kalibrierten Photometers über die optische Dichte auf $1000 \text{ FAU} \pm 50$ eingestellt. Für alle Tests wurde stets eine Negativkontrolle (Reinstwasser und Futtermedium) mitgeführt. Die Proben wurden mit Parafilm verschlossen und bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Nach 96 Stunden wurde der Test durch Abtöten der Würmer durch Hitze (80°C über 20 Minuten) abgebrochen. Durch vorhergehendes Zufügen von 1,25 ml Bengalrosa-Lösung wurden die Würmer dabei gleichzeitig angefärbt.

3.1.4 Toxikologische Endpunkte

Als toxikologische Endpunkte wurden im Rahmen dieser Arbeit Wachstum, Fertilität und Reproduktion der exponierten Testorganismen nach 96-stündiger Exposition untersucht. Die Parameter wurden wie folgt bestimmt:

Bestimmung der Reproduktion

Zur Erfassung der Reproduktion wurde die Anzahl der Nachkommen der adulten Testorganismen bestimmt. Dazu wurde die gesamte Probe in eine linierte Petrischale überführt, die Anzahl der Nachkommen wurde manuell bei 15-facher Vergrößerung am Binokular bestimmt. Juvenile ab einer Größe von $250 \mu\text{m}$ konnten dabei problemlos identifiziert werden. Die durchschnittliche Anzahl der Nachkommen pro Wurm berechnet sich in Relation zur Anzahl der fertilen Hermaphroditen:

$$\text{Nachkommen pro Wurm (Probe}_i\text{)} = \frac{\text{Anzahl der Nachkommen (Probe}_i\text{)}}{\text{Anzahl der fertilen Adulten (Probe}_i\text{)}}$$

Bestimmung des Wachstums

Alle Adulten wurden mit Hilfe einer Mikropipette aus der Petrischale entnommen und auf einen Objektträger überführt. An einem Mikroskop konnte bei einer 40-fachen Vergrößerung die Länge der Würmer mit Hilfe eines Messokulars bestimmt werden. Das Wachstum berechnete sich dann aus der Länge der Adulten nach 96 Stunden, abzüglich der durchschnittlichen Länge der Kontrollgruppe von 30 Würmern, die zum Startzeitpunkt des Tests bestimmt wurde.

$$\text{Wachstum (Wurm)}_i = \text{Länge von Wurm}_i (t_{96}) - \text{mittlere Länge der Würmer } (t_0)$$

Bestimmung der Fertilität

Bei 100-facher Vergrößerung wurde zunächst das Geschlecht der Adulten bestimmt. Die adulten Hermaphroditen wurden anschließend auf die Anwesenheit von Eiern überprüft. Konnten Eier beobachtet werden, wurde der Wurm als fertil eingeordnet. Abb. 3.4 zeigt, wie deutlich die Eier und Embryonen in adulten Hermaphroditen zu erkennen sind. Der Parameter Fertilität gibt demnach die Gravidität der Würmer wieder.



Abb. 3.2. Adulter Hermaphrodit, mikroskopische Aufnahme bei 100-facher Vergrößerung

Auswertung

Insgesamt wurden für jede Probe vier Replikate angesetzt. Als Parameter zur Bestimmung der chronischen Schadwirkung der Testmaterialien wurden die Hemmungen der drei Endpunkte herangezogen. Sie berechneten sich aus den entsprechenden Mittelwerten nach folgender Formel:

$$\text{Hemmung (Parameter}_i\text{) in \%} = 100 - \frac{\text{Parameter}_i\text{ (Probe)}}{\text{Parameter}_i\text{ (Kontrolle)}} * 100$$

Als Fehlerindikator wurde die jeweilige Standardabweichung der vier Replikate berechnet.

3.2 TiO₂-Testmaterialien

Die Testsubstanz dieser Studie ist *Titanium Dioxide P 25 AEROXIDE®* von **Evonik Degussa**. P25 ist ein photokatalytisch aktives Titandioxid-Nanomaterial mit einer Primärpartikelgröße von 21 nm. Es besteht zu 86 % aus Anatas und zu 14 % aus Rutil und ist unbeschichtet. P25 wird im Folgenden als nano-TiO₂ oder abgekürzt nTiO₂ bezeichnet.

Als nicht nanoskalige Referenzsubstanz wurde *Titanium Dioxide NM100* von **Millenium Inorganic Chemicals** untersucht. NM100, im Folgenden als bulk-TiO₂ oder abgekürzt bTiO₂ bezeichnet, hat eine mittlere Primärpartikelgröße von 90 bis 230 nm und besteht zu 98 % aus Anatas. Wie P25 ist auch NM100 unbeschichtet und wirkt photokatalytisch. Beide verwendeten Materialien sind „Batch-Materialien“ des „Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials“ der OECD. Die verwendeten Materialien wurden vom Joint Research Center (JRC) der European Commission gestellt. Tab. 3.1 fasst die Eigenschaften der untersuchten Testmaterialien zusammen.

Tab. 3.1. Eigenschaften der verwendeten TiO_2 Materialien P25 und NM100 Informationen aus (*) Kuhlbusch et al., 2012, (+) Materialdatenblatt des Herstellers (Millenium Inorganic Chemicals), (-) eigene Datenerhebung: Auswertung der REM-Bilder.

	P25 (nTiO₂)⁺	NM100 (bTiO₂)⁺
Kristallform	Anatas 86%; Rutil 14%	98% Anatas ⁺
Partikelform	sphärisch	hauptsächlich sphärisch ⁻
Dichte	4,13 g/cm ³	k.A.
Coating	ohne	ohne
Primärpartikelgröße (Verteilung)	21 nm	90-230 nm ⁻
Oberfläche (BET)	50 ± 15 m ² /g	k.A.
Brechungsindex	2,7	2,49
Absorption	0,01	0,08
Verwendung	Photokatalysator, Kosmetika	Pigment für Farben, Papier, Keramik

3.3 Herstellung der TiO_2 -Testsuspensionen

Hintergrund

Aufgrund starker elektrostatischer Anziehungskräfte bilden unbeschichtete Titandioxidpartikel häufig Aggregate und Agglomerate aus (z.B. Bennett et al., 2012). Die stark vergrößerte Oberfläche von Nanopartikeln verstärkt die Aggregatbildung. Die Größenverteilung der Partikel in Suspension wird von den Eigenschaften des Mediums beeinflusst und dabei vorwiegend durch die Parameter pH-Wert und Ionenstärke bestimmt. Um eine gleichmäßige Dosierung der Partikel in den Testansätzen zu erreichen, ist zunächst die Herstellung möglichst homogener Suspensionen von Bedeutung. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Standardprozedur (*Standard Operation Procedure* - SOP) etabliert, die im Folgenden für jede Anwendung verfolgt wurde.

SOP zur Herstellung der TiO_2 -Suspensionen

Die TiO_2 -Materialien wurden bis zu ihrer Verwendung in abgedunkelten Glasbehältern aufbewahrt. Die Suspendierung der Partikel erfolgte in Glasgefäßen, wobei ausschließlich Reinstwasser der Anlage „arium@pro UV“ von Satorius stedim biotech verwendet wurde. Der pH-Wert wurde für jeden Testansatz überprüft und lag gleichmäßig bei pH 6,75. Die Leitfähigkeit des Reinstwassers betrug kontinuierlich 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, der TOC-Gehalt lag unter 10 ppb.

Für die Stocksuspension mit einer Konzentration von 400 mg/l wurden 4 mg TiO_2 in ein Schnapdeckelgläschen (Volumen 20 ml) eingewogen und mit 10 ml Reinstwasser versetzt. Die Suspendierung erfolgte mit Hilfe eines Magnetrührers über 1 Minute bei 900 U/min,

gefolgt von einer 5-minütigen Ultraschallbadbehandlung bei einer Leistung von 320 W (Bandelin Sonorex Digitex, Typ DT 100 H). Die Gläschen wurden dabei mit Hilfe von Bleigewichten beschwert und hatten Bodenkontakt. Die Füllhöhe des Ultraschallbads wurde konstant bei 3,2 cm gehalten. Die Testsuspensionen, die anschließend in das Testsystem eingebracht wurden, wurden 10 Minuten nach Suspendierung der Stocksuspensionen durch Verdünnen mit Reinstwasser hergestellt und erneut 5 Minuten im Ultraschallbad suspendiert. Methodisch bedingt wurden für verschiedene Tests unterschiedlich dosierte Suspensionen angesetzt: Für die Nematodentests ohne Phenanthren und für alle DLS Messungen waren die Testsuspensionen gegenüber der Endkonzentration zweifach aufkonzentriert, für die Nematodentests mit Phenanthren waren sie vierfach aufkonzentriert.

Sowohl Stock- als auch Testsuspensionen wurden für jeden Test neu hergestellt. Die Einbringung in das Testsystem erfolgte jeweils 10 Minuten nach der Ultraschallbehandlung.

3.4 Charakterisierung der TiO₂-Partikel

Die Interpretation der Ergebnisse toxikologischer Untersuchungen von Nanopartikeln erfordert eine möglichst genaue Kenntnis des physikalischen Zustands und Verhaltens der Partikel in den entsprechenden Testsystemen. Sowohl die Größenverteilung der Partikel im Testsystem, als auch deren Oberflächenladung können einen starken Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und die toxikologische Wirkung der Partikel haben.

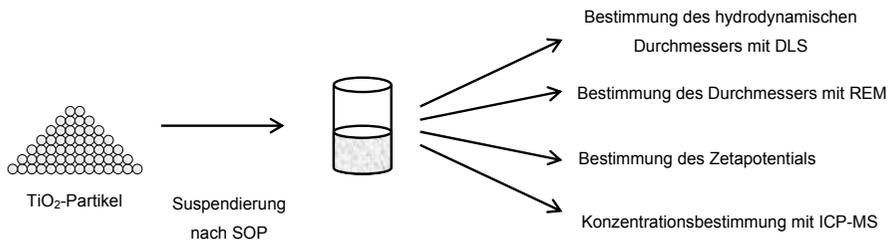


Abb. 3.3. Schematische Darstellung der Charakterisierung der TiO₂-Materialien

Zur Bestimmung der Größenverteilung der TiO₂-Suspensionen wurden zwei Methoden kombiniert:

1. Dynamische Lichtstreuung (DLS) zur quantitativen Bestimmung der Partikelgrößen
2. Rasterelektronen-Mikroskopie (REM) als visuelles Verfahren zur qualitativen Bestimmung der Partikelgrößen.

Zur Bestimmung der Oberflächenladung der Partikel wurde zudem das Zetapotential der Partikel in Suspension gemessen. Die Validierung der SOP beinhaltete auch die

Bestimmung der in den Test eingebrachten Konzentrationen und deren Abweichungen mittels ICP-OES.

Alle drei Methoden konnten nicht vor Ort für jeden einzelnen Test durchgeführt werden. Sie wurden daher zu Beginn der Studie genutzt, um die SOP zu entwickeln und zu optimieren. In den folgenden Kapiteln werden alle aufgeführten Methoden genauer erläutert.

3.4.1 Dynamische Lichtstreuung

Hintergrund

Die Methode der ‚Dynamischen Lichtstreuung‘ wird zur Bestimmung der Größe und Größenverteilung von Partikeln oder Makromolekülen in Suspensionen eingesetzt. Die Messung erfolgt anhand der detektierten Rückstreuung eines Laserstrahls an den Partikeln, die sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell bewegen. Die Brownsche Molekularbewegung von Partikeln in Flüssigkeiten wird angetrieben durch die thermisch induzierte Bewegung der Moleküle und Atome der umgebenden Flüssigkeit, die die Partikel permanent anstoßen. Anhand der Fluktuation der reflektierten Lichtintensität kann über die Stokes-Einstein Beziehung der hydrodynamische Radius der Partikel berechnet werden:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

$d(H)$ = hydrodynamischer Durchmesser

D = translationaler Diffusionskoeffizient

k = Boltzmann's Konstante

T = absolute Temperatur

η = Viskosität

Quelle: DLS technical note MRK656-01, Malvern.com

DLS Messungen bestimmen den hydrodynamischen Durchmesser von Partikeln in einer Suspension. Der hydrodynamische Durchmesser entspricht dem Durchmesser der Sphäre um den Partikel, die denselben translationalen Diffusionskoeffizienten aufweist, wie der Partikel selbst. Er beschreibt also den Durchmesser der Sphäre, die mit der gleichen Geschwindigkeit diffundiert, wie auch der Partikel im Kern der Sphäre. Der hydrodynamische Durchmesser liegt damit etwas über dem eigentlichen Durchmesser des Partikels. Zudem ist der hydrodynamische Durchmesser von der Oberflächenstruktur und -ladung der Partikel, sowie von der Ionenstärke des Umgebungsmediums abhängig.

Durchführung

Die DLS-Messungen erfolgten am **Zetasizer Nano ZS** von **Malvern**. In einer systematischen Messreihe wurden die Partikelgrößen der hergestellten TiO₂ Suspensionen für alle Testkonzentrationen bestimmt. Dazu wurden für nTiO₂ jeweils 6, für bTiO₂ jeweils 3 separat dispergierte Suspensionen angesetzt, deren mittlere Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung in jeweils 10 Messwiederholungen durch DLS bestimmt wurden. Mittlere Partikelgrößen (als Mittelwert der „mean intensities“) sowie deren Standardabweichungen (STABW) wurden für jede Konzentration berechnet ($n = 6 \times 10 = 60$ für nTiO₂ bzw. $n = 3 \times 10 = 30$ für bTiO₂).

Zudem wurde im Rahmen einer Testsimulation die Entwicklung der Partikelgröße über einen Testzeitraum von 96 Stunden gemessen. Dazu wurden - analog zu den durchgeführten Nematodentests - Proben ohne Würmer und Futtermedium, also ausschließlich TiO₂-Suspensionen in Wasser und M9-Medium angesetzt und über einen Zeitraum von 96 Stunden alle 24 Stunden gemessen. Für die Messung wurden die sedimentierten Partikel durch zweifaches auf- und abpipettieren resuspendiert.

Das genaue Messprotokoll der DLS Messungen findet sich im Anhang. Folgende Parameter wurden entsprechend Tab. 3.1 für die Messung eingestellt:

nTiO₂ (P25)

Brechungsindex (RI) = 2,7

Absorption = 0,01

bTiO₂ (NM100)

RI = 2,49

Adsorption = 0,08

Dispergiermittel: Wasser

Temperatur = 25°C

Viskosität = 0,8872

RI = 1,33

3.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Hintergrund

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird die Oberfläche eines Objektes mit Hilfe eines feingebündelten Elektronenstrahls im Vakuum nach einem definierten Muster abgefahren. Die reflektierten Elektronen sowie die freigesetzten Sekundärelektronen können dann mit Hilfe verschiedener Detektoren aufgenommen werden und die Oberfläche des Objektes vergrößert abbilden. Um das Vakuum nicht zu verunreinigen, müssen die Proben gegebenenfalls dehydriert werden. Da eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung eine hohe Leitfähigkeit der Oberflächen voraussetzt, werden die Proben häufig mit einem leitenden Material, wie z.B. Gold, beschichtet.

Durchführung der Partikelgrößenanalyse

Im Rahmen der Validierung der angewandten SOP wurden je 3 unabhängig hergestellte Suspensionen der relevanten Testkonzentrationen von $n\text{TiO}_2$ und $b\text{TiO}_2$ elektronenmikroskopisch untersucht, um die mittleren Partikelgrößen zu bestimmen. Hierfür wurde das Rasterelektronenmikroskop **Leo Gemini 1530** der Betriebseinheit für Elektronenmikroskopie an der Technischen Universität Hamburg-Harburg genutzt.

Vorbereitung und Bearbeitung der REM Proben

- 1) 10 Minuten nach Abschluss der Suspendierung der TiO_2 -Partikel (zeitgleich mit der DLS Messung) wurde 1 ml der Suspension mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Endvakuum 230 mbar) und einer Glasfiltriereinheit (**Satorius stedim biotech**, 30 ml, 25 mm) über einen Nucleoporfiter der Firma **Track Etch** (25 mm Durchmesser) gefiltert. Für $n\text{TiO}_2$ -Suspensionen wurden Filter einer Porengröße von $0,03 \mu\text{m}$ verwendet, für $b\text{TiO}_2$ -Suspensionen Filter einer Porengröße von $0,1 \mu\text{m}$. Nach der Filtrierung der M9-Suspension wurden die Filter jeweils mit 1 ml Reinstwasser nachgespült, um die Kristallisation von Salzen auf der Membran zu vermeiden.
- 2) Die Filter wurden in Petrischalen überführt und über Nacht im Exsikkator getrocknet.
- 3) Mit einem Skalpell wurden Ausschnitte von etwa $7\text{mm} \times 7\text{mm}$ aus dem Filter ausgeschnitten. Dabei wurde immer ein Bereich von der Mitte bis zum Rand der Filter ausgewählt.
- 4) Die Ausschnitte wurden auf Kohlenstoff-Leittabs auf Aluminiumprobenhaltern überführt und bei 40 mA über 20 Sekunden mit einer etwa 6nm Gold beschichtet.
- 5) Die Membranausschnitte wurden mit Leitsilber umrandet.
- 6) Die Proben wurden im Hochvakuum (etwa 10^{-7} mbar) am Rasterelektronenmikroskop bei einem Arbeitsabstand von etwa 7 mm mit dem In Lense Detektor gerastert. Abhängig von der Verteilung der Partikel auf der Membran wurden pro Membranausschnitt 6 bis 12 Ausschnitte bei einer Vergrößerung von 20.000 aufgenommen.

Auswertung der REM Bilder

Die Größenverteilungen der Partikel auf den Membranausschnitten wurden mit der Software **Scandium** der Firma **Zeiss** ausgewertet. Dazu wurde zunächst der Schwellenwert der zu detektierenden Phase manuell eingestellt. Über die Funktion ‚Partikel detektieren‘ wurden dann alle Partikel ab einer Größe von 20 Pixeln automatisch ‚erkannt und vermessen. Im Anschluss wurde jedes Bild manuell nachbearbeitet, wobei falsch oder nicht detektierte Partikel gelöscht bzw. hinzugefügt wurden. Die Ergebnisse der Partikeldetektion wurden in Excel Tabellen überführt und ausgewertet.

3.4.3 Zetapotentiale

Hintergrund

Die Oberflächenladung von Partikeln in Suspension hat einen starken Einfluss auf deren Aggregationsverhalten sowie die Bindungskapazität gegenüber Ionen und Molekülen des Umgebungsmediums. Mit Hilfe des **Zetasizer Nano ZS (Malvern)** wurde das Zetapotential der hergestellten Suspensionen bestimmt. Wie in Abb. 3.4 dargestellt beschreibt das Zetapotential nicht die Ladung der Oberfläche des Partikels, sondern das elektrische Potential an der Abscherschicht eines Partikels in Suspension. Am isoelektrischen Punkt (Zetapotential von 0 mV) ist die Partikelladung durch die Ladung der umgebenden Ionen ausgeglichen.

Die Bestimmung des Zetapotentials erfolgt in speziellen Messzellen des Herstellers. Mit Hilfe von zwei Elektroden wird dabei eine elektrische Spannung an die Suspension angelegt. Negativ oder positiv polarisierte Partikel wandern entsprechend ihrer Ladung zur Kathode oder zur Anode, die Geschwindigkeit dieser Bewegung beschreibt die Partikelmobilität im Medium. Mithilfe der Viskosität des Mediums kann diese Geschwindigkeit basierend auf die Smoluchowski oder Huckel-Theorie umgerechnet werden in das Zetapotential.

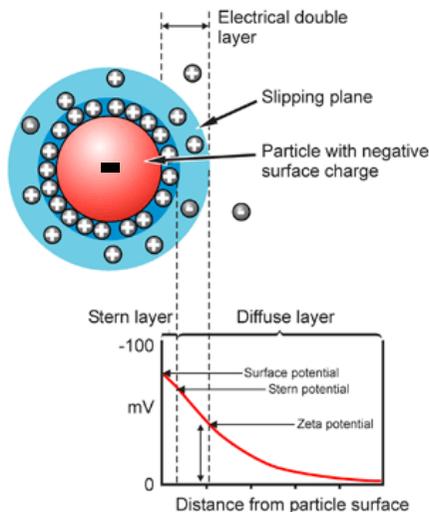


Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Abscherschicht eines Partikels in einem ionenhaltigen Medium und der Ausbildung des Zetapotentials (bearbeitet nach www.malvern.de)

Durchführung

Im Anschluss an die DLS Messungen wurden die Zetapotentiale der TiO₂-Suspensionen bestimmt. Pro Suspension wurden 3 Replikate gemessen, für jede Messung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Form von Mittelwerten und Standardabweichungen dargestellt.

3.4.4 Konzentrationsbestimmung

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Suspendierung der Partikel wurden die Konzentrationen von Titan in den Testansätzen bestimmt. Je Testkonzentration und Material wurden 3 Testsuspensionen separat nach SOP hergestellt und in die Testgefäße eingebracht. Aus den Testansätzen wurden unmittelbar nach dem Ansetzen Aliquotes von 1 ml entnommen und in gereinigte, staubfreie 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zur Bestimmung des Titangehaltes wurden zwei Aufbereitungsmethoden angewandt. Im ersten Ansatz wurde nach erneuter Dispergierung der Suspension im Reaktionsgefäß durch Schütteln ein Anteil des Aliquots entnommen und direkt als Suspension in die ICP-OES eingespritzt. Im zweiten Ansatz wurde das gesamte Probenvolumen mit einem HNO₃/HF/H₂O Gemisch in der Mikrowelle aufgeschlossen, der Titangehalt wurde mittels ICP-OES (**PE-Optima 7000 DV OES mit ICP**) bestimmt. Beide Messverfahren wurden am Zentrallabor der Technischen Universität Hamburg-Harburg durchgeführt.

3.4.5 Agglomeration der TiO₂-Partikel mit *E. coli*

Zur Untersuchung des Einflusses der *E. coli*-Bakterien auf die Agglomeration der Partikel in den Testansätzen wurden TiO₂-Suspensionen einer Konzentration von 10 mg/l mit *E. coli* in simulierten Testansätzen entsprechend den Ansätzen im Nematodentest (vgl. Kapitel 3.1.3) über 2 bis 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen entsprechend Kapitel 3.4.2 auf Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 0,1 µm filtriert, im Exsikkator über 24 Stunden getrocknet und am Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Proben wurden dazu mit 6 nm Gold beschichtet und mit Leitsilber umrandet. Die REM-Aufnahmen erfolgten mit dem ‚In-Lens-Detektor‘ mit einer Spannung von 5 keV.

3.4.6 Bestimmung der photokatalytische Aktivität

Hintergrund

Zum direkten Vergleich der photokatalytischen Aktivitäten der Testmaterialien nTiO₂ und bTiO₂ unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurde der Abbau von Methylenblau durch die Partikel als Indikator für die Bildung radikaler Sauerstoffspezies bestimmt. Bei der Photodegradation von Methylenblau durch TiO₂ kommt es zu hypsochromen Effekten, auch als Blauverschiebung bezeichnet. Dabei verschiebt sich das Absorptionsspektrum von

Methylenblau durch N-Demethylierung der Dimethylaminogruppe in den kurzwelligeren Bereich (Zhang et al., 2001), was zu einer Abnahme der Absorption bei der Wellenlänge des ursprünglichen Absorptionsmaximums führt.

Durchführung

Die TiO₂-Partikel wurden nach SOP suspendiert und in 10 ml Ansätzen in Kristallisierschalen mit einer wässrigen Methylenblaulösung versetzt. Die Endkonzentration von Methylenblau entsprach 12,5 mg/l. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 2 Stunden bei einer Intensität von 231 W/m² bestrahlt, die Temperatur wurde konstant bei 20°C ±2 gehalten. Zur Bestimmung der Absorption der Proben wurde vorab das Absorptionsmaximum der Methylenblau-TiO₂-Ansätze bestimmt. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei der entsprechenden Wellenlänge von 663 nm - dem Absorptionsmaximum - nach 0, 30, 60 und 120 Minuten gemessen. Parallel dazu wurden Proben der entsprechenden Konzentrationen im Dunkeln inkubiert und gemessen. Als Blindwert diente ein Methylenblauansatz derselben Konzentration ohne Zusatz von TiO₂-Partikeln, sowohl in Form einer Dunkel- Kontrolle, als auch in Form einer SSR- Kontrolle. Anschließend konnte der prozentuale Abbau der Absorption über die Zeit als Indikator für die photokatalytische Aktivität der Partikel wie folgt bestimmt werden:

$$\text{Abbau (MB) in \%} = \frac{\text{Absorption}(t_i)}{\text{Absorption}(t_0)} * 100$$

MB = Methylenblau

t₀ = Startzeitpunkt der Inkubation

t_i = Messzeitpunkte nach 30, 60 und 120 Minuten Inkubation

3.5 Simulierte Sonnenstrahlung

Zur Untersuchung der photokatalytischen Effekten der TiO₂-Materialien wurden die Proben unter kontrollierten Bedingungen mit simuliertem Sonnenlicht bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte im Bewitterungsgerät **Q-Sun Xe - 1-B** mit Chiller der Firma **Q-Labs Deutschland**. Die Filterausstattung **Daylight Q** erzeugt ein Spektrum, dass das Spektrum des natürlichen Sonnenlichts möglichst naturgetreu abbilden soll. Die Strahlungsintensitäten werden am Bewitterungsgerät Q-Sun bei einer Wellenlänge von 340 nm eingestellt und reguliert. Die Strahlungsintensität kann anschließend - beruhend auf Intensitätsverteilungsmessungen des

Herstellers - auf die Gesamtintensität bei 300 bis 800 nm umgerechnet werden. Bei 340 nm kann die Strahlungsintensität von $0,2 \text{ W/m}^2$ bis $0,68 \text{ W/m}^2$ reguliert werden, das entspricht einer Gesamtintensität von 231 W/m^2 bis 784 W/m^2 . Die Strahlungsintensität wird durch einen fest installierten Sensor reguliert und muss durch ein externes Kalibrierradiometer für die jeweilige Probenposition im Probenraum kalibriert werden. Durch ein angeschlossenes Kühlaggregat kann die Kammerlufttemperatur des Gerätes über einen Kühlluftstrom mit Hilfe eines internen Temperatursensors reguliert werden. Um die Verdunstung der Testmedien während der Bestrahlung zu vermeiden, mussten die Proben abgedeckt werden. Die Abdeckung erfolgte mit Hilfe einer Quarzglasscheibe (EN08), $350 \times 220 \times 3 \pm 0,3 \text{ mm}$ der Firma **Aachener Quarz - Glas Technologie Heinrich**. Aufgrund der hohen Reinheit verfügt dieses Glas über Transmissionen bis in den UV-C Bereich (200-280 nm), und ist damit durchlässig für die Anregungsstrahlung von TiO_2 , die mit 390 nm bereits knapp über dem UV-Bereich liegt.

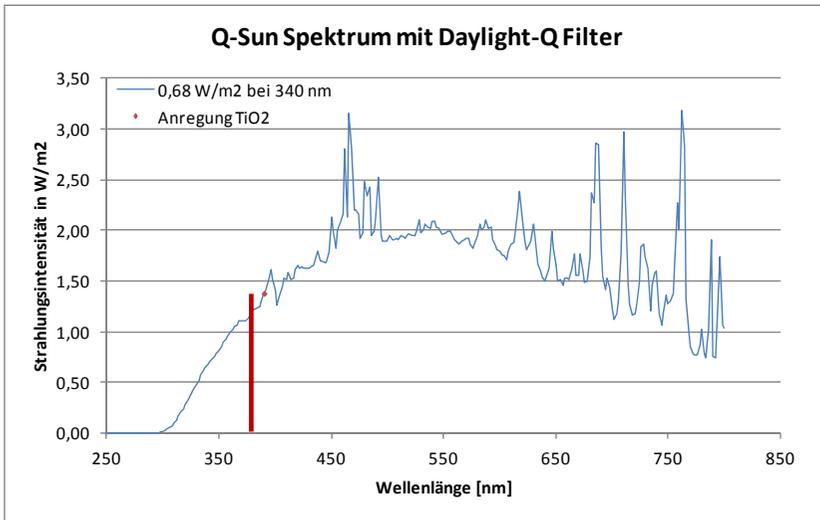


Abb. 3.5. Spektrum der Strahlungsintensitäten des simulierten Sonnenlichts im Q-Sun Xe-1-B mit Daylight Q Filterausstattung bei einer eingestellten Intensität von $0,68 \text{ W/m}^2$ bei 340 nm. Roter Balken: Anregungsbereich von TiO_2 bei 390 nm.

Um die Abdichtung der Probengefäße durch die Glasplatte zu ermöglichen, wurde ein entsprechendes Probentablett mit integrierter Schraubzwinde angefertigt. Die Proben stehen dabei auf 1 cm hohen Schaumstoffrechtecken, die auf einem Stahlblech befestigt sind, und werden über zwei Leisten auf der Glasplatte mit Hilfe des Schraubmechanismus hinunter gedrückt. Die Verdunstung kann mit Hilfe dieses Probentabletts von ursprünglich $5,3 \% \pm 2,3$ auf $2,1 \% \pm 0,7$ ($n = 12$) eingeschränkt werden.

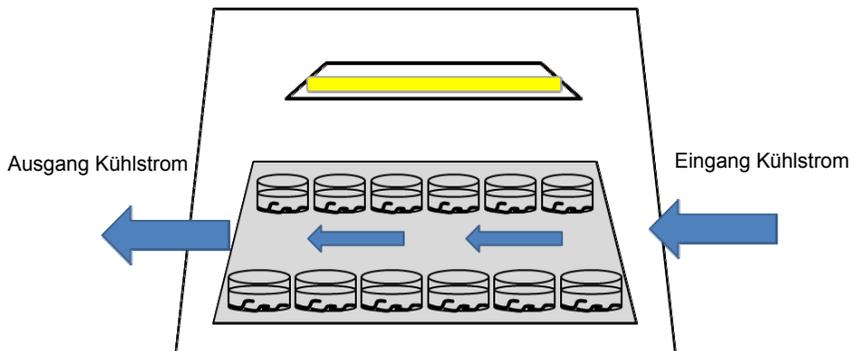


Abb. 3.6 Schematische Darstellung des Q-Sun Aufbaus mit Xenonbogenlampe, Probenraum und Kühlluftstrom.

Temperaturverteilung im Probenraum

Der Temperatursensor wurde entsprechend der Probenposition unter der Glasplatte positioniert. Aufgrund der Abdeckung kommt es zu einer Erwärmung der Proben während der Bestrahlung, die auch nach Anpassungsmaßnahmen im Probenraum, z.B. durch Umleitung des Kühlstrahls unter die Glasplatte, nicht ausreichend reguliert werden konnte. Aus diesem Grund wurde ein zweites Probenblech aus Lochblech angefertigt.

Tab. 3.2 Temperaturabweichungen von der eingestellten Solltemperatur von 20 °C im Probenraum des Q-Sun auf 24 Probenpositionen in °C. Oben: Probenblech 1 aus Stahlblech; unten: Probenblech 2 aus Lochblech. Extremwerte farblich gekennzeichnet.

Temperaturabweichungen vom Soll [°C] Stahlblech					
6,3	5,8	6,1	6,2	3,9	-0,2
10,7	6,8	6,4	6	2,7	-0,5
9,4	6,9	6,8	7,1	3,1	-0,3
8,8	10	9,1	7,8	5,5	1,8

Temperaturabweichungen vom Soll [°C] Lochblech					
-0,4	0,6	1,3	-0,8	-1,5	-2,5
0,2	-0,6	-0,8	-1,0	-1,6	-3,2
0,2	-0,4	-0,6	-1,0	-1,8	-3,3
0,9	2,5	1,5	-0,1	-1,9	-3,8

Tab. 3.2 stellt die Temperaturabweichungen an den 24 Probenpositionen des Probenblech 1 im Q-Sun bei einer eingestellten Solltemperatur von 20 °C dar. Die Temperaturen wurden

unmittelbar nach Bestrahlung durch ein Infrarot-Thermometer von AGT™ aufgenommen. Diese Tabellen veranschaulichen die verbesserte Temperaturregulierung in der Probenkammer durch die Modifikation des Probenbrettchens: Durch eine Konstruktion aus Lochblech kann der Kühlluftstrom im Probenraum besser verteilt werden, die Erwärmung unter der Quarzglasplatte kann besser kompensiert werden. Die Proben können nach dieser Anpassung bei $19,2^{\circ}\text{C} \pm 1,6$ gehalten werden (vgl. Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Vergleich der Temperaturverteilung im Probenraum auf 24 Probenpositionen in °C bei einer Solltemperatur von 20 °C in Abhängigkeit vom Probenbrettchen.

	Stahlblech	Lochblech
Solltemperatur [°C]	20	20
Min. Temperatur [°C]	19,5	16,2
Max. Temperatur [°C]	30,7	22,5
Mittlere Temperatur [°C]	25,7	19,2
Temperaturgradient [°C]	11,2	6,3
Variationskoeffizient	12,4 %	8,1 %

Strahlungsverteilung im Probenraum

Entgegen der Angaben des Herstellers weicht die Strahlungsintensität auf dem Probenbrettchen bei einer Intensität von $0,68 \text{ W/m}^2$ um bis zu 41 % vom Sollwert ab. Aus diesem Grund konnten nicht alle 24 Probenpositionen des Probenbrettchens genutzt werden. Wie Tab. 3.4 zeigt, weicht die Strahlungsintensität besonders im mittleren Bereich des Probenbrettchens nach unten ab. Die Intensitäten der Randpositionen, hier grau unterlegt, sind deutlich stabiler und weichen nur um 2,23 % vom Kalibrierwert ab (siehe Tab. 3.5). Die maximale Abweichung liegt an diesen Positionen bei 4,76 %. Aus diesem Grund wurden für alle durchgeführten Experimente nur die Randpositionen des Probenraums entsprechend der schematischen Darstellung in Abb. 3.6 besetzt.

Tab. 3.4 Strahlungsverteilung auf dem Probenbrettchen im Q-Sun bei einer eingestellten Intensität von $0,2 \text{ W/m}^2$ bei 340 nm. Grau hinterlegt: genutzte Randpositionen, lachsfarben hinterlegt: Kalibrierpunkt.

Strahlungsverteilung auf Probenbrettchen [W/m^2]					
0,2	0,2	0,21	0,21	0,21	0,2
0,15	0,15	0,2	0,2	0,19	0,17
0,15	0,17	0,17	0,16	0,16	0,15
0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Nach einer Reihe von Voruntersuchungen zur Strahlungstoleranz von *C. elegans* (siehe Kapitel 814.4.1) wurden Strahlungsintensität und –dauer, sowie der Bestrahlungszeitpunkt im Testverlauf festgelegt. Alle nicht abweichend gekennzeichneten Testansätze wurden 4 Stunden nach Teststart für 30 Minuten bei einer Intensität von 231 W/m^2 (bei 300 bis 800

nm) bestrahlt. Die Strahlungsintensität wurde vor jedem Test mit Hilfe eines Kalibrierradiometers kalibriert.

Tab. 3.5 Abweichung der Strahlungsintensitäten vom Sollwert in W/m^2 , Variationskoeffizient und maximale Abweichung in %.

	Alle Positionen	Randpositionen
Min. Intensität [W/m^2]	0,15	0,2
Max. Intensität [W/m^2]	0,21	0,21
Mittlere Intensität [W/m^2]	0,19	0,20
CV	11,90%	2,23%
Max. Abweichung [%]	28,57%	4,76%

3.6 Kombinationseffekt von $nTiO_2$ und Phenanthren

Zur Untersuchung des Einflusses von $nTiO_2$ auf die Toxizität von Phenanthren als Co-Kontaminant wurde *C. elegans* einem Gemisch der beiden Kontaminanten ausgesetzt. Dazu wurde $nTiO_2$ wie unter Kapitel 3.3 beschrieben nach SOP suspendiert und in die Testgefäße vorgelegt. Phenanthren wurde in 100 %igem DMSO gelöst und mit einem Endvolumen von 0,3 % DMSO als Lösevermittler in die Testgefäße eingebracht. Als Medium der Negativkontrollgruppe diente für alle Tests mit Phenanthren eine 0,3 %ige DMSO-Lösung. Auch die TiO_2 Proben wurden mit entsprechender DMSO-Konzentration versetzt. Um eine Adsorption des hydrophoben Phenanthrens an die Gefäßwände zu vermeiden, wurde ausschließlich mit Glasgefäßen gearbeitet. Um Verluste durch Adsorption oder Verdunstung von Phenanthren einzuschränken, wurden die Stammlösungen unmittelbar vor Teststart angesetzt. Die Durchführung des Nematodentests mit dem Schadstoffgemisch erfolgte entsprechend der Beschreibung des Tests unter Kapitel 3.1.3.

3.7 Bestimmung der Phenanthrenkonzentrationen im Testsystem

3.7.1 Phenanthren in den Testlösungen

Zur Überprüfung der Effizienz der Einbringung und des Verhaltens von Phenanthren im Testsystem wurden die Phenanthrenkonzentrationen in simulierten Testansätzen mit Hilfe von der UV-HPLC (high performance liquid chromatography) bestimmt. Da die Anwesenheit von Salzen des Nährmediums die Auswertung der Chromatogramme im niedrigen Konzentrationsbereich erschwerte, wurden die Testsimulationen ausschließlich in Wasser angesetzt. Ein Einfluss von M9-Medium auf das physikalisch-chemische Verhalten von Phenanthren im Testsystem wurde in den Voruntersuchungen nicht festgestellt.

Für die Testsimulation wurde Phenanthren entsprechend der Beschreibung unter 3.6 unmittelbar vor dem Start der ersten Messung in die Kristallisierschalen eingebracht und mit

H₂O versetzt. Die Ansätze wurden nach der ersten Messung zum Zeitpunkt t_0 mit Parafilm verschlossen und wie die Nematodentestansätze bei 20°C im Brutschrank im Dunkeln inkubiert. Weitere Messungen wurden nach 6, 24 und 48 Stunden durchgeführt, die Messzeitpunkte werden folgendermaßen bezeichnet: t_0 , t_6 , t_{24} und t_{48} . Für jede Testkonzentration wurden drei Replikate angesetzt und gemessen. Analog zu den Inkubationen für die Genexpressionsanalyse wurden neben 2,5 ml Ansätzen auch 10 ml Ansätze untersucht. 2,5 ml Ansätze entsprechen dem Volumen des Nematodentests, 10 ml Ansätze entsprechen dem Volumen der Schadstoffinkubation für die Genexpressionsanalysen (siehe Kapitel 3.8).

Die Messungen erfolgten durch UV-HPLC (Merck Hatichi; Pumpe: L-7100, Interface D-7000, UV-Detektor L-7400) nach folgender Methode:

Fließmittel: 95% Acetonitril, 5% Wasser

Flussrate: 0,5 ml pro Minute

Druck: 13-15 bar

Säule: LiChroCart 125-4, Lichrosphere® 100, RP-18 (5µm),

Injektionsvolumen: 20 µL

Laufzeit: 5 min

Retentionszeit: etwa 3,94 min.

Detektions-Wellenlänge: 254 nm

3.7.2 Sorption von Phenanthren an nTiO₂

Zur Interpretation der toxikologischen Effekte durch nTiO₂ und Phenanthren in kombinierter Exposition wurde die Sorption von Phenanthren an die TiO₂ Nanopartikel untersucht. Dazu wurden die nach SOP hergestellten Testansätze mit nTiO₂ und Phenanthren zunächst 30 Minuten in Kristallisierschalen unter Testbedingungen bei 20 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen über 0,1 µm Polycarbonatfilter abfiltriert, um die beladenen TiO₂-Partikel als Filtrerrückstand zu gewinnen. Um Rückstände der Phenanthrenlösung auf den Filtern zu entfernen, wurden die Filter nach der Filtration zunächst mit 2,5 ml H₂O gespült. Daraufhin wurden die Filter in braune Schraubdeckelgläschen mit einem Volumen von 10 ml überführt, mit 5 ml Reinstwasser bedeckt und 30 Sekunden geschüttelt. Nach 10 Minuten wurden die Filter erneut 30 Sekunden geschüttelt, die Partikel konnten so in die wässrige Phase übergehen. Anschließend wurden die Filter aus der Suspension entfernt. Die wässrigen Proben wurden in 50 ml Scheidetrichter überführt und 3 Mal jeweils 5 Minuten mit 15 ml Hexan ausgeschüttelt. Die Hexanphase wurde in 50 ml Nasenkolben aufgefangen und im Rotationverdampfer bei 30°C, 150 U/min und 180-200 mbar auf ein Volumen von etwa 500 µL eingengt. Die Phenanthrenkonzentration der Extrakte konnte nun mittels GC-MS bestimmt werden. Als Negativkontrolle diente eine ebenfalls abfiltrierte Phenanthrenlösung

der entsprechenden Konzentration ohne TiO₂-Partikel. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde eine Phenanthrenlösung entsprechend der Testansätze angesetzt, die nicht abfiltriert sondern unmittelbar mit Hexan ausgeschüttelt wurde.

3.8 Genexpressionsanalysen

Zur Untersuchung der Effekte von nTiO₂ auf *C. elegans* wurden neben den chronischen toxikologischen Effekten auch molekularbiologische Antworten einbezogen. Als Indikator für die Verfügbarkeit von Phenanthren unter Einfluss von nTiO₂ wurde die Genexpression einer Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase (*cyp-35C1*) untersucht. Die Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase ist vermutlich beteiligt an der Detoxifikation von Fremdstoffen und wird nachweislich durch PAKs wie Fluoranthren induziert (Menzel et al., 2001). Als Biomarker für das Auftreten von oxidativem Stress durch nTiO₂ in Abhängigkeit der Bestrahlung wurde die Expression eines Superoxiddismutase-Gens (*sod-3*) bestimmt. Superoxiddismutasen (SOD) bilden die einzige Enzymgruppe in *C. elegans*, die die sehr reaktive und schädliche Sauerstoffspezies Superoxid (O₂^{·-}) abbauen kann. Für die Genexpressionanalysen wurden die Testorganismen zunächst gegenüber den Schadstoffen inkubiert. Nach einer Reinigung der Proben wurde die RNA der Würmer isoliert. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte dann mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR.

3.8.1 Schadstoffinkubation und Vorbereitung der Proben

Schadstoffinkubation für *cyp-35C1* Expression

Für die Schadstoffinkubation wurden je Probe Würmer von insgesamt vier Platten zunächst mit Saccharose Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Würmer den Schadstoffgemischen in einem Gesamtvolumen von 10 ml in Kristallisierschalen exponiert. Die Exposition erfolgt in Nährmedium mit *E. coli*-Bakterien als Futter, die Bakteriendichte wurde entsprechend der ISO 10872 auf 1000 FAU +/- 50 eingestellt. Die Inkubationszeit wurde auf 6 Stunden festgelegt, da für diese Expositionszeit die höchste Induktion von *cyp-35C1* durch Fluoranthren beobachtet wurde (Matthäi, 2009). Nach Ablauf der Inkubationszeit bei 20°C im Brutschrank wurden die Würmer erneut mit Saccharose-Lösung gewaschen, anschließend in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und bei -70°C tiefgefroren.

Für jede Probe wurden insgesamt drei Replikate angesetzt.

Schadstoffinkubation für *sod-3* Expression

Abweichend zur Schadstoffinkubation für die *cyp-35C1*-Expression, wurden die Testorganismen den nTiO₂-Suspensionen in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml exponiert. Die Gesamtinkubationszeit betrug 4,75 Stunden. Sie geht zurück auf die Strahlungsexposition: Die Proben wurden entsprechend den Bedingungen im

Nematodentest (vgl. Kapitel 4.4.1) zunächst 4 Stunden im Dunkeln inkubiert und anschließend für 30 min mit einer Intensität von 231 W/m^2 bestrahlt. Um den Einfluss der Bestrahlung auf den oxidativen Stress in *C. elegans* zu erfassen, wurde die Inkubation unmittelbar im Anschluss abgebrochen. Methodisch bedingt kam es dabei zu einer Verzögerung von 15 Minuten, die zu einer Gesamtinkubationszeit von 4,75 Stunden führte (4 Stunden Inkubation + 0,5 Stunden SSR + 0,25 Stunden = 4,75 Stunden Gesamtinkubation).

Waschen der Testorganismen zur Aufreinigung der Proben

Um Reste von *E. coli*-Bakterien aus den Proben für die Genexpressionanalysen zu entfernen, wurden die Würmer durch Dichtentrennung auf einer 60 %igen Saccharoselösung gewaschen. Dazu wurde alle Medien, M9-Medium, 60 %ige Saccharose und Leitungswasser, zunächst auf Eis vorgekühlt. Die Würmer wurden mit 8 ml M9-Medium von der Platte in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt und zunächst 45 min auf Eis gekühlt. Dieser Schritt ermöglicht die Sedimentation der Testorganismen. Daraufhin wurden die Proben bei 4°C und 2000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das entstandene Wurmpellet in 3 ml Leitungswasser resuspendiert. Nach Zugabe von 8 mL Saccharose-Lösung wurden die Würmer erneut bei 2000 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Würmer, die nun auf der dichteren Saccharoseschicht schwammen, konnten vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden 8 ml Leitungswasser zugegeben, nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen. Nach einem weiteren Waschschrift mit Leitungswasser wurde das Pellet in 1,5 mL Eppis überführt und in einer Mikrozentrifuge bei 10.000 U/min für 30 Sekunden zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Würmer bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C tiefgefroren.

3.8.2 RNA Isolation

Die RNA der Nematoden wurde mit Hilfe des **RNeasy Kits** von **Qiagen** isoliert. Die tiefgefrorenen Würmer wurden zunächst mit einem RNase freien Pistill gemörsert und mit Lysepuffer versetzt. Anschließend wurden die Würmer mit dem Lysepuffer auf Flüssigstickstoff tiefgefroren und nach 1 bis 3 Stunden beim Auftauen erneut gemörsert. Um einen möglichst vollständigen Aufschluss des Gewebes und eine verbesserte Freisetzung der RNA zu erreichen, wurden die Proben anschließend durch eine 22 G Kanüle gedrückt. Das aufgeschlossene Gewebe wurde nun über eine **QiaShredder** Säule homogenisiert, bevor die RNA nach Angaben des Herstellers über eine **RNeasy** Säule isoliert wurde. Die gesamte Präparation erfolgte auf Eis. Zur Vorbeugung möglicher Kontamination mit genomischer DNA wurden die RNA-Proben mit DNase I für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der RNA Gehalt sowie die Reinheit der Gesamt-RNA wurden mit Hilfe eines **Eppendorf Biophotometers** in einer 1:10 Verdünnung der RNA bestimmt. Der Quotient der

Absorptionsspektren A260/A280 gibt dabei die Reinheit der RNA wieder, er sollte zwischen 1,7 und 2,1 liegen. Die Konzentration errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{A260} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Extinktionskoeffizient}_{\text{RNA}} \text{ (Farrell, 1993)}$$

A260 = Absorption bei 260 nm Wellenlänge in optischer Dichte (OD)

Extinktionskoeffizient der RNA = 44,19

3.8.3 Reverse Transkription

Durch reverse Transkription wurden die vorliegenden RNA Proben in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte in 200µl Reaktionsgefäßen im **BIORAD iCycler**. Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert und nach Abschluss der Synthese umgehend bei -20°C tiefgefroren. Alle verwendeten Reagenzien wurden von **Fermentas** bezogen.

cDNA-Synthese Ansatz

1000 ng RNA

0,5 µl Oligo (dt) Primer

0,5 µl Random Hexamer Primer

2 µl dNTP Mix

Alle Ansätze wurden mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 30 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 8 µl 5xRT Puffer und 2 µl RevertAid Premium Enzyme Mix zugefügt. Die Ansätze wurden nun für 30 Minuten bei 50°C inkubiert, zum Abbruch der Reaktion wurden die Proben anschließend 5 Minuten auf 85°C erhitzt.

3.8.4 Quantitative Real-Time-PCR

Hintergrund

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die der Vervielfältigung (Amplifikation) geringer Nukleinsäuremengen dient. Mit Hilfe der RT-PCR (Echtzeit-PCR) kann die Expression ausgewählter Gene untersucht werden. Durch den Einsatz spezifischer Primer werden einzelne Gene gezielt amplifiziert. Die Produkte werden dabei durch einen DNA-bindenden Farbstoff, in diesem Fall **SYBR®Green I** fluoreszenzmarkiert. Durch Fluoreszenzmessung über optische Thermocycler kann die Quantität des Produktes so bei jedem PCR-Zyklus in Echtzeit bestimmt werden. Die kontinuierlich aufgenommene Amplifikatmenge ermöglicht damit die Berechnung der Ausgangsmenge des ausgewählten Templates. Die Bestimmung der Genexpression erfolgt dabei immer relativ, im Verhältnis zu einem sogenannten

Housekeeping-Gen (HKG). Die Expression eines HKGs dient der Normalisierung der Genexpressionsanalysen und muss daher möglichst unabhängig sein von äußeren Umständen, wie z.B. der Schadstoffexposition. Als HKG dient im Rahmen dieser Studie Aktin 1 (*act-1*), dessen Eignung als HKG in *C. elegans* bereits nachgewiesen wurde (Offermann, 2009). Mit Hilfe der qRT-PCR wurde die Expression von *cyp35c1* und *sod-3* relativ zur *act-1* Expression untersucht.

Primerauswahl

Die Auswahl geeigneter Primer ist für die Qualität der Ergebnisse der qRT-PCR ausschlaggebend. Ziel der qRT-PCR ist es, ausschließlich mRNA zu vervielfältigen, die als gespleißte kodierende Sequenz (CDS) der Zielgene vorliegt. Um eine derartige Selektion zu erreichen, wurden sogenannte Intron-übergreifende Primer ausgewählt. Dafür wurde zunächst die Originalsequenz der jeweiligen CDS der einzelnen Gene über die Homepage des ‚National Center for Biotechnology Information (NCBI)‘¹ bezogen. Die Gesamtsequenz, die zudem Informationen über die Lage von Introns und Exons beinhaltet, wurde über die Seite des ‚Ensemble Genome Browser‘² bezogen. Nun wurden vorwärts- und rückwärtsgerichtete Primer mit einer Länge von 20 bis 25 Basenpaaren für jedes Gen so ausgewählt, dass sie jeweils ein Intron der Sequenz umfassten. So konnten nicht gespleißte mRNAs aus der Vervielfältigung ausgeschlossen werden. Mit Hilfe der Webseite ‚Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator‘³ konnte nun die Schmelztemperatur der Primer berechnet und justiert werden. Die optimale Schmelztemperatur für die qRT-PCR liegt bei 60°C. Bei Bedarf wurden die Primer entsprechend bis zu einer Länge von maximal 25 Basenpaaren verlängert. Abschließend wurde die Position der ausgewählten Primer mit Hilfe der Webseite ‚Spidey‘ des NCBI⁴ bestimmt. Aus der Position der Primer konnten die Amplikonlänge abgeleitet werden. Die so definierten Primer wurden von Eurofins synthetisiert. Tab. 3.6 zeigt die Primer, die nach Überprüfung durch qRT-PCR und Gelelektrophorese als geeignet eingeordnet und zur Durchführung der Genexpressionsanalysen ausgewählt wurden. Ihre Produkte wiesen in der qRT-PCR eine einheitliche Schmelztemperatur auf und erschienen bei der Gelelektrophorese als distinkte Bande bei der dem Amplikon entsprechenden Nukleotidlänge. Genauere Angaben über die Primer, insbesondere über Schmelztemperatur, Länge und Position finden sich in Anhang.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

² <http://www.ensembl.org/>

³ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi>

Tab. 3.6 Bezeichnungen und Sequenzen der eingesetzten Primer

Gen	Oligoname	Sequenz
act 1	ce_act1_pro	ccccaccagagcgcaagtactccgtct
	ce_act1_rev	tgttggagggtggagaggggaagcg
cyp35c1	ce_cYP35c1_for	ccacctggacctttttcgtcccat
	ce_cYP35c1_rev	cctgccatttgtcgccattcgag
sod-3	ce_SOD3_for	aatgtgcaatctactgctcgca
	ce_SOD3_rev	gtgtgcttggagcggacggc

Durchführung

Alle Enzyme und Reagenzien für die Durchführung der qRT-PCR wurden über **Finnzymes** bezogen. Die Durchführung der PCR erfolgte im **Biorad iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System** mit **iCycler** unter folgenden Konditionen:

qRT-PCR-Ansatz

12,5 µl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) ohne ROX

1 µl Forward Primer

1 µl Reverse Primer

9,5 µl Wasser, Nuklease-frei

qRT-PCR-Konditionen

Tab. 3.6 fasst das Programm der durchgeführten rt-PCR zusammen. Auf eine initiale Denaturierung (Schritt 1) folgte ein Zyklus zur Vervielfältigung der ausgewählten cDNA-Fragmente (Schritte 2 und 3). Im Schritt 4 wurde anschließend durch stufenweise Erhöhung der Temperatur die Schmelzkurve der DNA-Fragmente aufgezeichnet.

Tab. 3.6 Programm der quantitativen Real-Time-PCR

Schritt-Nr.	Reaktions-Schritt	Zeit	T (°C)
1	Initiale Denaturierung	10 min	95
2	Denaturierung	15 sec	95
3	Annealing und Elongation	60 sec	60
4	Aufzeichnung Schmelzkurve	10 sec	55 bis 95 in 0,5 °C Stufen

Wiederholungen Schritte 2 bis 3: 35 Mal

Wiederholungen Schritt 4: 85 Mal

Die Reaktion wurde in 96 Well Platten durchgeführt. Für jede Probe wurden dreifach Bestimmungen durchgeführt. Um das Auftreten von falsch-positiven Signalen durch Primer-

Dimerisierung auszuschließen, wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle ohne cDNA-Template durchgeführt.

Auswertung

Durch die Bestimmung der Amplifikation einer 5-stufigen Verdünnungsreihe der cDNA einer Probe von 1×10^{-1} bis 1×10^{-5} wurde bei jeder Reaktion die Effizienz der PCR bestimmt, auf deren Basis eine Effizienzkorrektur in die Auswertung der PCR nach der $\Delta\Delta C_T$ eingeht. C_T steht für Cycle threshold und bildet den Zyklus der PCR ab, bei dem das durch den Fluoreszenzmarker SYBRGreen I ausgelöste Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Die Berechnung der C_T -Werte und der Effizienzen erfolgt durch die Software **Bio-Rad iQ5**. Die Daten wurden anschließend exportiert und mit Excel ausgewertet. ΔC_T und $\Delta\Delta C_T$ berechnen sich wie folgt:

$$\Delta C_T(\text{Probe}) = \text{Zielgen}(\text{Probe}) - \text{HKG}(\text{Probe})$$

$$\Delta C_T(\text{Kalibrator}) = \text{Zielgen}(\text{Kontrolle}) - \text{HKG}(\text{Kontrolle})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Probe}) - \Delta C_T(\text{Kalibrator})$$

Die Auswertung der Daten erfolgte über die effizienzkorrigierte Rate, die sich wie folgt berechnet:

$$\text{Rate (effizienzkorrigiert)} = \frac{E(\text{Zielgen})^{C_T(\text{Probe}) - C_T(\text{Kontrolle})}}{E(\text{HKG})^{C_T(\text{Probe}) - C_T(\text{Kontrolle})}}$$

3.9 *gfp:sod-3*: transgene *C. elegans* als Indikatoren der *sod-3* Expression

Zur Untersuchung der *sod-3* Expression wurde zudem ein transgener *C. elegans* Stamm (CF1553) als Indikator herangezogen. Er trägt ein transfiziertes *gfp*-Gen, das für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) kodiert und als Fluoreszenzmarker genutzt wurde. Im Stamm CF1553 wird *gfp* im Bereich des Pharynx, der Vulva und des Enddarms zusammen mit *sod-3* exprimiert. Die Expression von *sod-3* kann so über die Fluoreszenz des GFPs beobachtet und quantifiziert werden. Der transgene *C. elegans*-Stamm wurde ebenfalls vom CGC bezogen und entsprechend der Haltung des Wildtyps kultiviert (siehe Kapitel 3.1.1).

Die Testorganismen wurden zunächst entsprechend der Durchführung des Nematodentests (siehe Kapitel 3.1.1) den TiO_2 -Materialien ohne Zufügen von Bakterien ausgesetzt. Nach einer Inkubation von 4,75 Stunden – entsprechend der Inkubation für die Genexpressionsanalysen (vgl. Kapitel 3.8.1) - 24 und 48 Stunden wurden die Würmer mit

0,5 %igem 1-Phenoxy-2-Propanol betäubt und nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Parallel zur SSR-exponierten Testgruppe wurde eine Negativkontrollgruppe im Dunkeln mitgeführt. Die Fluoreszenz der Testorganismen durch einen GFP Filter mit einer Exzitation bei 485 nm und einer Emission bei 530 nm bei 10-facher Vergrößerung unter konstanter Belichtungszeit von 200 ms detektiert. Anschließend wurde die mittlere Fluoreszenz - als mittlere Grauwerte - über die gesamte Fläche der Organismen quantifiziert und im Vergleich zu der Kontrollgruppe dargestellt. Zur Quantifizierung diente die Partikelanalysefunktion der Olympus-Software ‚xcellence‘.

3.10 Intestinale Autofluoreszenz als Indikator für oxidativen Stress

Die Zellen des intestinalen Gewebes von *C. elegans* enthalten neben verschiedenen Endosomen und autophagen Vakuolen auch autofluoreszierende Granula. Clokey and Jacobson (1986) konnten zeigen, dass diese Granula als sekundäre Lysosomen am Katabolismus der Organismen beteiligt sind. Die Fluoreszenz dieser Organellen wird durch eine Anreicherung von Lipofuscin hervorgerufen, das bei der Protein- und Lipidperoxidation gebildet wird. Das persistente Abbauprodukt akkumuliert über die Zeit in den intestinalen Granula und kann daher als Indikator für oxidativen Stress genutzt werden. Bei *C. elegans* konnte so eine Zunahme der Autofluoreszenz mit zunehmendem Alter beobachtet werden (Garigan et al., 2002). Die intestinale Autofluoreszenz bei einer Wellenlänge von 530 nm soll hier als Indikator für oxidativen Stress in Folge der Exposition gegenüber nTiO₂ beobachtet werden.

Zur Untersuchung der Auswirkung der TiO₂ –Partikel auf die intestinale Autofluoreszenz wurden die Würmer den Testsubstanzen über 72 Stunden exponiert. Die Exposition erfolgte sowohl in Dunkelheit, als auch unter Bestrahlung mit SSR. Für beide Versuchsgruppen wurde eine Negativkontrollgruppe ohne TiO₂ mitgeführt. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei 530 nm unter einer konstanten Belichtungszeit von 200 ms und einer Anregung bei 485 nm detektiert, quantifiziert und im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe dargestellt.

3.11 Bestimmung der Ingestion und Defäkation der TiO₂-Partikel durch *C. elegans*

Kenntnisse über die Aufnahme, den Verbleib und die Ausscheidung der Partikel durch den Organismus ermöglichen die Interpretation der toxikologischen Ergebnisse in Hinblick auf mögliche Wirkmechanismen der Partikel. Aus diesem Grund wurde eine Aufklärung der Aufnahmedynamiken in die Gewebe bis hin zu den Zellen der Testorganismen angestrebt. Dazu wurde neben lichtmikroskopischen Verfahren auch die Elektronenmikroskopie eingesetzt.

3.11.1 Stereomikroskopie

Da *C. elegans* ein transparenter Organismus ist, sind die Organe adulter Würmer bereits am Stereomikroskop, auch als Binokular bezeichnet, erkennbar. Titandioxid reflektiert aufgrund seines hohen Brechungsindex Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichtes sehr stark und ist dadurch im Auflichtmikroskop auch im transparenten Testorganismus als leuchtend weiße Substanz erkennbar. Aus diesem Grund konnte diese Methode genutzt werden, um die Aufnahme und Akkumulation von TiO_2 Partikeln in *C. elegans* zu beobachten.

Die Testorganismen wurden entsprechend der Vorgehensweise im Nematodentest verschiedenen Titandioxidkonzentrationen ausgesetzt und nach unterschiedlich langen Expositionszeiten am Binokular untersucht. Dazu wurden die Würmer mit einer 400 mM Ethanollösung betäubt und auf Objektträger überführt. Nach einer Einwirkzeit von etwa 5 Minuten waren die Würmer regungslos und konnten bei Vergrößerungen von 45 bis 60 fach untersucht werden.

3.11.2 Lichtmikroskopie

Im Durchlicht erscheint Titandioxid durch seinen hohen Brechungsindex dunkel, da es große Anteile des Lichts absorbiert oder reflektiert. Durch Vergrößerungen von 100- bis 1000-fach lässt sich die Lage der Partikel am Lichtmikroskop viel genauer bestimmen als am Binokular. Erkennbar sind jedoch nur größere Partikelagglomerate, Einzelpartikel werden nicht aufgelöst. Die Vorbereitung der Proben erfolgte entsprechend der Vorbereitung der Binokularproben. Als effizienteres Betäubungsmittel wurde auch 0,5 %iges 1-Phenoxy-2-Propanol verwendet.

3.11.3 Energiedispersive Röntgenspektrometrie

Die energiedispersive Röntgenspektrometrie (EDX) ermöglicht die Untersuchung der Elementzusammensetzung einer Probe. Durch die Anregung der Atome einer Probe mit einem Elektronenstrahl einheitlicher Energie werden die Elektronen der Atome auf ein höheres Energieniveau angehoben und geben beim Zurückfallen auf ihr Ausgangsniveau Röntgenstrahlung einer elementspezifischen Energie wieder. Die EDX wurde hier genutzt, um die Aufnahme von Titandioxid in den Testorganismus *C. elegans* elementar nachzuweisen.

Vorbereitung der Würmer für die REM-EDX-Analyse

Für die energiedispersiver Röntgenspektrometrie mussten die vorab Testorganismen zunächst dehydriert werden, um die Verunreinigung des Vakuums im Elektronenmikroskop zu vermeiden. Die Trocknung erfolgte über die sogenannte Kritisch-Punkt-Trocknung (KTP). Dazu wurden die Würmer nach Inkubation in 50 mg/l nTiO₂ mit isotonischer Salzlösung (0,9% NaCl) über eine Gaze mit einer Porenweite von 5 µm gespült und anschließend über 24 Stunden in 5 % Glutaraldehyd/PBS fixiert. Es folgte die Überführung in Amylacetat über 6 Ethanolkonzentrationen nach Schema in Tab. 3.7. Die Überführung der Testorganismen erfolgte in Zentrifugenröhrchen. Nach jedem Schritt wurden die Würmer bei 800 g über 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und durch die nächst höhere Ethanol- bzw. Amylacetatkonzentration ersetzt.

Tab. 3.7 Tabellarische Darstellung der Entwässerung von C. elegans für die KTP-Trocknung

20% Ethanol /PBS	30 min
40% Ethanol /PBS	30 min
60% Ethanol /PBS	30 min
80% Ethanol /PBS	30 min
96% Ethanol	12 bis 14 h
50% Ethanol/50% n-Amylactat	2 h
100% n-Amylacetat	Bis zur KTP

Kritisch-Punkt-Trocknung

Für die Kritisch-Punkt-Trocknung wurden die präparierten Organismen in Linsenpapier eingefaltet. Bei der Trocknung wird das Amylacetat in 8 Spülgängen gegen CO₂ ausgetauscht. Die dehydrierten Präparate wurden anschließend auf die Leittabs der REM-Template überführt.

EDX-Mapping

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Präparate zunächst bei 40 mA mit einer 10 nm dicken Goldschicht beschichtet. Am REM konnten die Würmer nun auf morphologische Veränderungen überprüft werden. Mit Hilfe der EDX-Analyse wurden die Testorganismen anschließend auf Titananreicherungen im Körper untersucht. Das Mapping von Titan erfolgte mit einer Spannung von 20 keV.

3.11.4 Hemmung der Nahrungsaufnahme

Zur Untersuchung der Auswirkung der TiO₂-Exposition auf die Nahrungsaufnahme von *C. elegans* wurden die Würmer zunächst den TiO₂-Partikeln im Nährmedium M9 mit bzw. ohne Zusatz von *E. coli*-Bakterien als Nahrungspartikel über unterschiedliche Zeiträume exponiert. Eine Kontrollgruppe wurde ausschließlich in Nährmedium mit bzw. ohne *E. coli* inkubiert. Im Anschluß wurden fluoreszierende Mikropartikel aus Polystyrol mit einem Durchmesser von 0,84 nm ± 0,019 (**Fluorescent Polystyrene Particles, purple** von **Kisker biotech**) zugefügt. Diese Partikelgröße fällt ins Größenspektrum der bevorzugten Nahrungspartikel von *C. elegans*, das nach Fang-Yen et al. (2009) bei 0,5 µm bis 3 µm liegt. Fang-Yen et al. (2009)Fang-Yen et al. (2009)Fang-Yen et al. (2009)Fang-Yen et al. (2009)Fang-Yen et al. (2009)Die Aufnahme dieser Partikel durch *C. elegans* simulierte eine Nahrungspartikelaufnahme und konnte fluoreszenzmikroskopisch verfolgt werden.

3.12 Experimentelles Design

Für alle aufgeführten Experimente wurden Negativkontrollgruppen mitgeführt, in denen die Testorganismen ausschließlich Reinstwasser und Nährmedium ausgesetzt wurden. Für jedes Treatment wurden 4 Parallelen mit jeweils 10 Würmern angesetzt.

3.12.1 Einfluss von primärer und sekundärer Partikelgröße auf den Effekt von TiO₂

Die Abhängigkeit der toxischen Effekte von der Größe der TiO₂-Partikel wurde durch den Vergleich zweier Testmaterialien untersucht. Dabei wurde dem nanopartikulären Testmaterial nTiO₂ mit einer Primärpartikelgröße von 21 nm ein nicht nanopartikuläres Referenzmaterial, bTiO₂, mit einer Primärpartikelgröße von 90 bis 230 nm gegenübergestellt. Neben der Bestimmung der Größenverteilung und Agglomeration der Partikel im Testsystem wurden folgende Parameter bestimmt:

1. Toxikologische Effekte gegenüber *C. elegans* mit den Endpunkten Wachstum, Reproduktion und Fertilität
2. Bestimmung der Ingestion und Defäkation der Partikel durch *C. elegans*
3. Bestimmung der Hemmung der Nahrungsaufnahme

Zur Bestimmung der toxikologischen Effekte wurde der chronische Nematodentest nach ISO 10872 durchgeführt. Die Exposition der Testorganismen gegenüber den Testsubstanzen erfolgte über 96 Stunden. Die Bestimmung der Ingestion der Partikel erfolgte durch Stereomikroskopie, Lichtmikroskopie und REM-EDX-Analysen nach definierten Expositionszeiten von 6 bis 240 Stunden. Nach Überführung der Testorganismen in TiO₂-freies Medium wurde die Effizienz der Defäkation der Partikel untersucht. Eine Exposition

gegenüber fluoreszierender Mikropartikel, die Nahrungspartikel simulierten, ermöglichte die Untersuchung der Hemmung weiterer Nahrungsaufnahme nach Inkubation in TiO_2 -Suspensionen.

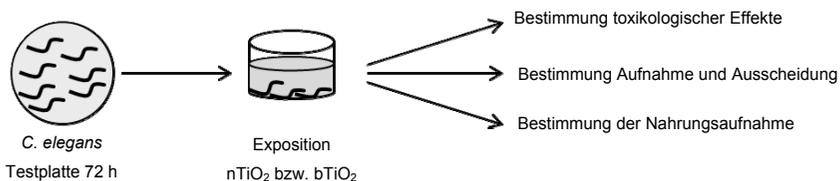


Abb. 3.7 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Einfluss von Partikelgröße und Agglomeration“

3.12.2 Co-Kontamination: Wirkung von $n\text{TiO}_2$ auf die Toxizität von PAKs

Für die Untersuchung der Wirkung von $n\text{TiO}_2$ auf die Toxizität von Phenanthren gegenüber *C. elegans* wurden die Testorganismen einem Gemisch der beiden Kontaminanten ausgesetzt. Folgende Parameter wurden untersucht:

1. Einfluss von $n\text{TiO}_2$ auf die Toxizität von Phenanthren in Bezug auf Reproduktion, Wachstum und Fertilität von *C. elegans*
2. Einfluss von $n\text{TiO}_2$ auf die Bioverfügbarkeit von Phenanthren durch Bestimmung des Biomarkers *cyp-35C1*

Die Untersuchung des Einflusses von $n\text{TiO}_2$ auf die Toxizität von Phenanthren erfolgte zunächst durch kombinierte Exposition gegenüber PHE und $n\text{TiO}_2$ im Nematodentest mit einer Expositionszeit von 96 Stunden. Zur Bestimmung der Wechselwirkung von $n\text{TiO}_2$ und Phenanthren wurden zum Vergleich Einzelsubstanzexpositionen mit entsprechenden Testkonzentrationen durchgeführt. Als Indikator für die Verfügbarkeit von Phenanthren wurde die Genexpression von *cyp-35C1* nach 6-stündiger Exposition untersucht. Parallel dazu wurde ein entsprechender Nematodentest nach 6-stündiger durchgeführt. Die Würmer wurden dazu nach der 6-stündigen Exposition zunächst gewaschen und anschließend in frisches, schadstoffreies Nährmedium überführt und weitere 90 Stunden inkubiert (Gesamttestlaufzeit von 96 Stunden). Zudem wurde ein Einfluss von simultaner Bestrahlung mit SSR und Vorbestrahlung mit SSR untersucht.

Zur Interpretation der Ergebnisse wurde im Anschluss die Entwicklung der Phenanthrenkonzentrationen über den Testzeitraum, sowie die Sorption von Phenanthren an die TiO_2 -Partikel durch HPLC und GC-MS bestimmt.

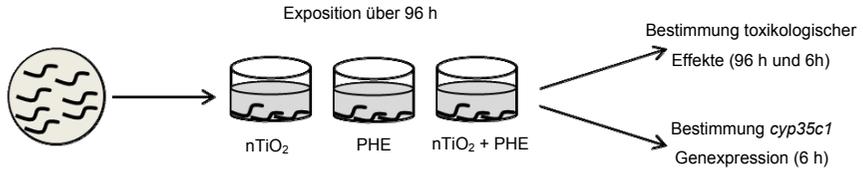


Abb. 3.8. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Co-Kontamination“

3.12.3 Einfluss simulierter Sonnenstrahlung auf die Effekte von TiO₂ Partikeln

Zur Untersuchung des Einflusses von simulierter Sonnenstrahlung auf die Effekte der photokatalytisch aktiven TiO₂ Materialien wurden folgende Parameter untersucht:

1. Einfluss der simulierten Sonnenstrahlung auf die Toxizität der TiO₂-Partikel
2. Einfluss der simulierten Sonnenstrahlung auf *sod-3*-Expression in Gegenwart von nTiO₂ als Indikator für die Abwehr von oxidativem Stress

Zur Bestimmung des Einflusses der simulierten Sonnenstrahlung wurde eine Versuchsgruppe den Testsubstanzen gegenüber für 96 Stunden exponiert. 4 Stunden nach Teststart wurde sie für 30 Minuten simulierter Sonnenstrahlung (SSR) einer Intensität von 231 W/m² (bei 300 bis 800 nm) ausgesetzt. Eine Kontrollgruppe wurde zeitgleich über 96 Stunden im Dunkeln exponiert.

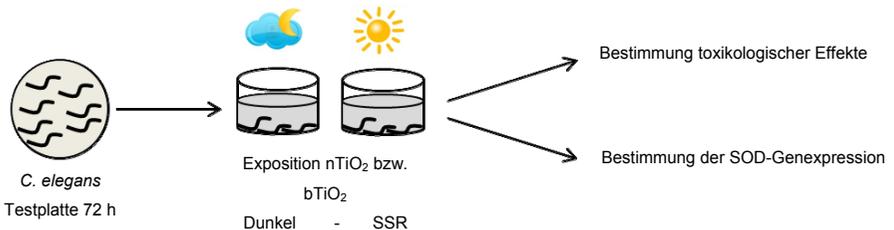


Abb. 3.9 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Einfluss von SSR“

Zur Interpretation der Ergebnisse wurde zudem die photokatalytische Aktivität der Partikel unter den gegebenen Bestrahlungsbedingungen untersucht. Als Indikator der photokatalytischen Aktivität diente der photokatalytische Abbau von Metylenblau.

3.12.4 Effekte photoaktivierter TiO₂-Nanopartikeln auf die Toxizität von Phenanthren

Bei der Untersuchung der Effekte von photoaktivierter nTiO₂-Partikel auf die Toxizität von Phenanthren sollten zwei Wirkmechanismen unterschieden werden. Photomodifikations-

prozesse, die zu einer chemischen Modifikation des Kontaminanten führen, wurden durch die Vorbestrahlung beider Verbindungen in kombinierter Exposition untersucht.

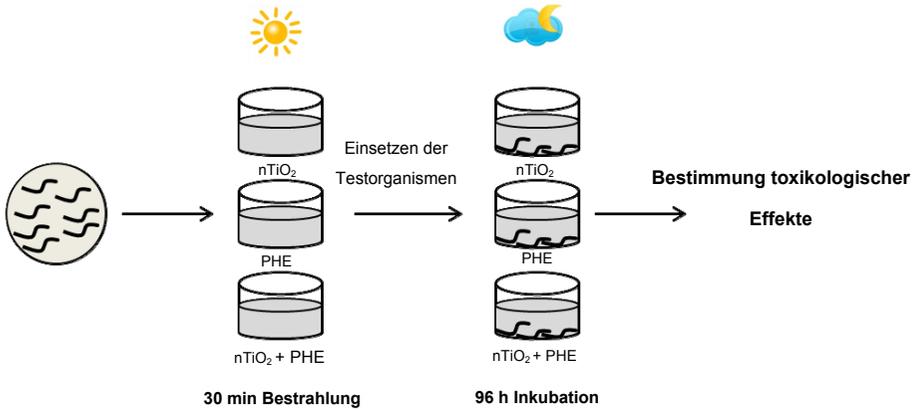


Abb. 3.10 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Vorbestrahlung von Phenanthren und $nTiO_2$ “

Durch simultane Bestrahlung der Testorganismen während der Exposition konnten zudem photosensibilisierende Prozesse erfasst werden (Erläuterungen siehe Kapitel 4.5).

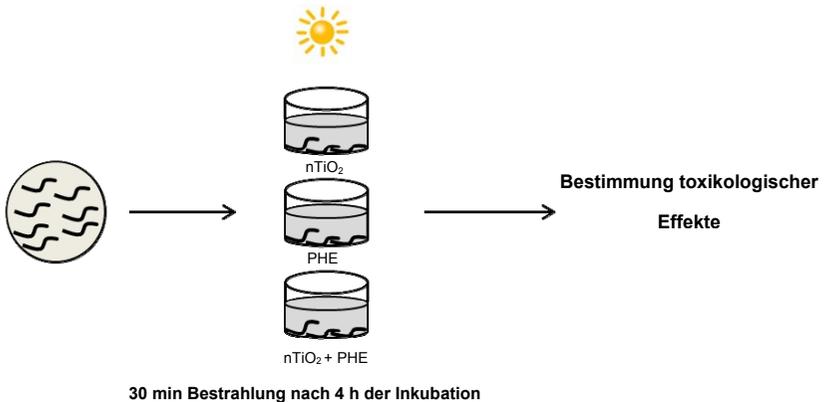


Abb. 3.11 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Simultane Bestrahlung von Phenanthren und $nTiO_2$ “

3.13 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die Auswertung der DLS Messungen wurden für nTiO₂ 6 Replikate (n=6), für bTiO₂ 3 Replikate (n = 3) herangezogen. Für die Auswertung der Größenverteilung nach REM wurden jeweils 3 Replikate herangezogen. Mittelwerte, Standardabweichungen, Median, Quartile, Minima und Maxima wurden mit **Microsoft Office Excel 2007** berechnet. Für die Auswertung der Nematodentests wurden für die Einzeltests jeweils vier Replikate (n = 4) herangezogen. Die Berechnung der Hemmungen erfolgte mit **Microsoft Office Excel 2007**, es wurden Mittelwerte der Parallelen und Standardabweichungen bestimmt. Die Ergebnisse mehrfach durchgeführter Test wurden zusammengefasst (n = 12 für nTiO₂ im Dunkeln und n = 8 für PHE+nTiO₂ im Dunkeln). Die Tests auf Normalverteilung der Daten, alle Signifikanzanalysen sowie die Berechnungen von EC₅₀-Werten und Korrelationen wurden mit **Graph Pad Prism 5** durchgeführt. Die Analyse auf eine Gauß'sche Verteilung der Daten erfolgte dabei durch den Kolmogorov-Smirnov-Test. Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-hoc-Test Dunett durchgeführt. EC₅₀-Werte und Korrelationen wurden durch Nicht-lineare-Regression nach der Formel *log [inhibitor] vs. Normalized response – Variable slope* berechnet.

Für die Auswertung der Genexpressionsanalysen wurden jeweils drei Replikate herangezogen (n = 3). Die relative Genexpression wurde über die effizienzkorrigierte Rate nach $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte berechnet. Mit Excel wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Bestimmung der Signifikanzen wurde ebenfalls durch die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-hoc-Test Dunett durchgeführt.

3.14 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Carl Roth, Merck oder Sigma Aldrich Deutschland bezogen. Die Titandioxidmaterialien NM100 und P25 wurde vom Joint Research Center zur Verfügung gestellt. Das eingesetzte Phenanthren hatte eine Reinheit von 99,5 % und wurde über Sigma Aldrich bezogen.

3.15 Medien

LB-Medium

Pepton aus Casein	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

M9-Medium

Na ₂ HPO ₄	6 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 g/l
NaCl	3 g/l

NGM-Agar

Pepton aus Casein	2,5 g/l
Agar	17,0 g/l
NaCl	3,0 g/l

Pepton, Agar und NaCl in 972 ml Reinstwasser lösen und autoklavieren. Nach Abkühlung auf ca. 55°C werden folgende Lösungen steril dazugeben:

1 ml Cholesterinlösung (5 mg/ml 95 % Ethanol)

1 ml CaCl₂-Lösung (1 mol/l)

1 ml MgSO₄-Lösung (1 mol/l)

25 ml KH₂PO₄-Puffer (1 mol/l), mit KOH auf pH 6 einstellen

Saccharose-Lösung

600 mg/l Saccharose

0,29 mg/l NaCl

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Partikel im Testsystem

Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der Partikelgrößen und Konzentrationen im Testsystem wurde zunächst eine Standard Operating Procedure (SOP) zur Herstellung der Testsuspensionen entwickelt, die durch eine ausführlichen Charakterisierung der Partikelsuspensionen validiert wurde. Dabei wurden neben der Art des TiO_2 -Materials auch die Konzentration des Materials, sowie die Eigenschaften des Mediums berücksichtigt. Für jede Testkonzentration wurden die Größenverteilung mit DLS und Rasterelektronenmikroskopie, sowie die Oberflächenladung in Form des Zetapotentials bestimmt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Testkonzentrationen wurde zudem der Titangehalt der Testansätze mittels ICP-OES bestimmt. Um den Einfluss der Konzentration und des Mediums auf die Eigenschaften der Suspensionen zu erfassen, wurden alle getesteten Konzentrationen beider Testmaterialien sowohl als Ausgangssuspension in Wasser, als auch als Testsuspension in M9-Medium untersucht. Die pH-Werte der Suspensionen wurden vor jedem Test aufgenommen und lagen konstant bei pH 6,75 in Wasser und bei pH 7 in M9-Medium. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Charakterisierung zusammengefasst.

4.1.1 Sekundäre Partikelgrößen nach DLS Messung

Die Methode der ‚Dynamischen Lichtstreuung‘ (DLS) diente der Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der TiO_2 -Partikel in Suspension. Insgesamt wurden für n TiO_2 jeweils sechs und für b TiO_2 jeweils drei separat dispergierte Suspensionen für verschiedene Konzentrationen von 1 bis maximal 200 mg/l angesetzt und untersucht.

Die Darstellungen der DLS-Ergebnisse basieren ausschließlich auf den detektierten Intensitäten der DLS-Messungen (vgl. Kapitel 3.4.1).

Bezüglich der Vergleichbarkeit verschiedener Studien wird die Nutzung der mittleren Intensität als Parameter für die Bestimmung der Partikelgröße eindeutig empfohlen: Eine Studie zur Verlässlichkeit der Größenbestimmung von Nanopartikeln durch DLS von Kato et al. (2009) konnte zeigen, dass die erhobenen intensitätsgewichteten, mittleren Partikelgrößen unabhängig vom verwendeten DLS-Gerät eine hohe Vergleichbarkeit aufwiesen, wohingegen die Parameter der anzahl- und volumengewichteten Daten sehr stark voneinander abwichen.

Im Folgenden wird daher die mittlere Partikelgröße als hydrodynamischer Durchmesser für jede Testkonzentration sowie die Standardabweichung auf Basis der ‚mittleren Intensitäten‘ dargestellt.

Mittlere Partikelgrößen der TiO₂-Suspensionen

Abb. 4.1 zeigt die mittleren Partikelgrößen für nTiO₂ als Box-Whisker-Plots. Es wird deutlich, dass die Partikelgröße im Mittel sowohl in Wasser, als auch in M9-Medium mit zunehmender Konzentration ansteigt. Zudem wird die Streuung der mittleren Partikelgrößen mit ansteigender Konzentration breiter.

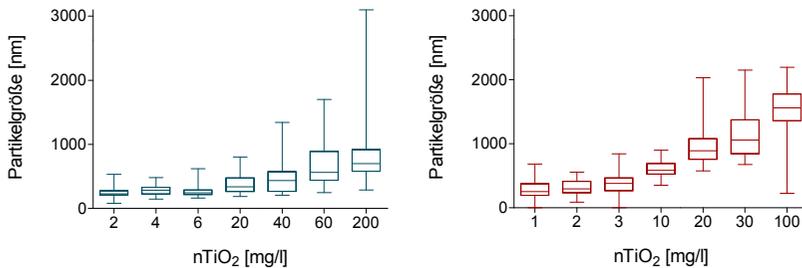


Abb. 4.1 Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von nTiO₂ suspendiert in Wasser (rechts) und M9-Medium (links), berechnet aus den mittleren Intensitäten, dargestellt als Box-Whisker Plots mit Minimum und Maximum, n = 60.

Wie Tab. 4.1 und Tab. 4.2 zeigen nimmt für nTiO₂ auch die Standardabweichung der einzelnen mittleren Partikelgrößen mit steigender Konzentration zu. Weiterhin wurde beobachtet, dass das Zufügen von M9-Medium im Verhältnis 1:2 zu einer verstärkten Agglomeration führt, die Partikelgrößen sind gegenüber den Ausgangssuspensionen in Wasser deutlich erhöht.

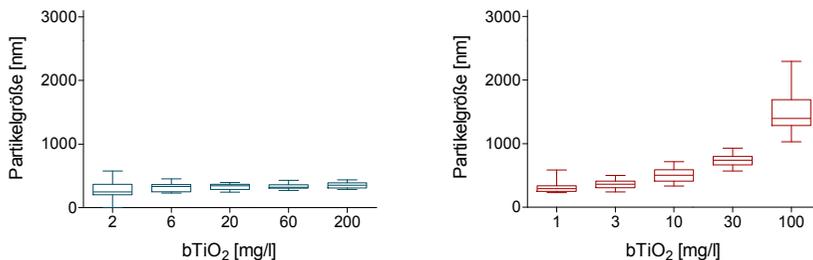


Abb. 4.2 Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von bTiO₂ suspendiert in Wasser (rechts) und M9-Medium (links), berechnet aus den mittleren Intensitäten, dargestellt als Box-Whisker Plots mit Minimum und Maximum, n = 30.

Auch bTiO₂-Suspensionen zeigen erhöhte mittlere Partikelgrößen nach Zufügen von M9-Medium (vgl. Abb. 4.2.). Die Partikelgrößen von bTiO₂ in Wasser sind hingegen von der Partikelkonzentration unbeeinflusst und liegen deutlich unter den Größen von nTiO₂ in Wasser. Wie aus Tab. 4.1 und Tab. 4.2 hervorgeht liegen zudem die Polydispersitätsindizes (PDIs) – als Maß der Polydispersität der Suspensionen - für bTiO₂-Suspensionen mit 0,18 bis 0,31 durchgehend deutlich unter denen der nTiO₂-Suspensionen mit 0,34 bis 0,59. Der geringere PDI der bTiO₂-Suspensionen deutet auf eine monodispersere Verteilung hin.

Tab. 4.1 Polydispersitätsindizes (PDI), mittlerer hydrodynamischer Partikeldurchmesser und Standardabweichung (STABW) der nTiO₂- und bTiO₂-Suspensionen in Wasser.

Suspension		nTiO ₂			bTiO ₂		
Konz. [mg/l]	Medium	PDI	mittlere Größe [nm]	SD [nm]	PDI	mittlere Größe [nm]	SD [nm]
2	H ₂ O	0,59	253	79	0,31	296	97
6	H ₂ O	0,48	258	64	0,24	326	69
20	H ₂ O	0,38	377	106	0,19	331	46
60	H ₂ O	0,35	718	145	0,18	335	36
200	H ₂ O	0,34	892	160	0,18	357	39

Tab. 4.2 Polydispersitätsindizes (PDI), mittlerer hydrodynamischer Partikeldurchmesser und Standardabweichung (STABW) der nTiO₂- und bTiO₂-Suspensionen in M9-Medium.

Suspension		nTiO ₂			bTiO ₂		
Konz. [mg/l]	Medium	PDI	mittlere Größe [nm]	SD [nm]	PDI	mittlere Größe [nm]	SD [nm]
1	M9	0,67	292	87	0,46	306	90
3	M9	0,57	388	92	0,31	361	46
10	M9	0,44	610	104	0,26	516	92
30	M9	0,36	1162	203	0,23	735	80
100	M9	0,35	1474	247	0,24	1509	177

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass die mittleren Partikelgrößen der höchsten getesteten Konzentration von 100 mg/l in M9-Medium für beide Materialien bereits deutlich über 1000 nm und damit außerhalb des optimalen Messbereiches der DLS liegen. Eine Überprüfung der DLS-Ergebnisse über Raster-elektronenmikroskopie als visuelles Auswertungsverfahren wurde deshalb angeschlossen.

Partikelgrößenverteilung der TiO₂-Suspensionen

Für alle Suspensionen wurden zudem die Partikelgrößenverteilungen im entsprechenden Medium aufgenommen. Wie in den folgenden Abbildungen exemplarisch dargestellt konnte auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden: Die Verteilung einer 2 mg/l

nTiO₂-Suspension in Wasser, dargestellt in Abb. 4.3, zeigte Größen von etwa 100 bis 500 nm. Zwei der zehn Messwiederholungen detektierten auch Partikel im Größenbereich von 4500 bis 6500 nm. Die Verteilungen niedrigkonzentrierter Suspensionen in Wasser stellten sich nach DLS-Messungen jedoch weitestgehend unimodal dar.

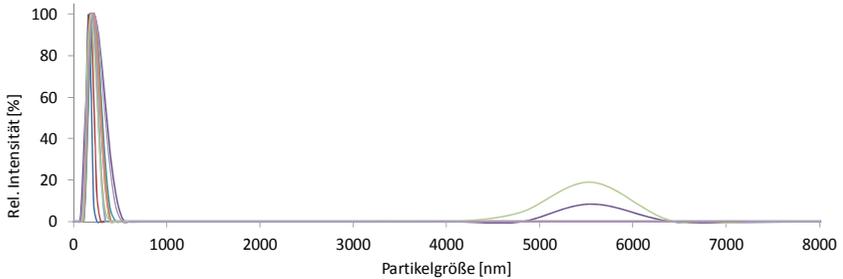


Abb. 4.3 Partikelgrößenverteilung einer 2 mg/l nTiO₂-Suspension in H₂O dargestellt als normalisierte mittlere Intensitäten ($I/I_{max}[\%]$), $n=10$.

Abb. 4.4 stellt die Größenverteilung der entsprechenden Suspension nach Überführung in M9-Medium dar. Bei dieser geringen Konzentration von 1 mg/l ändert sich die Verteilung durch Überführung in M9-Medium nur geringfügig. Lediglich für eine der zehn Messungen wird der Peak breiter und reicht bis etwa 800 nm.

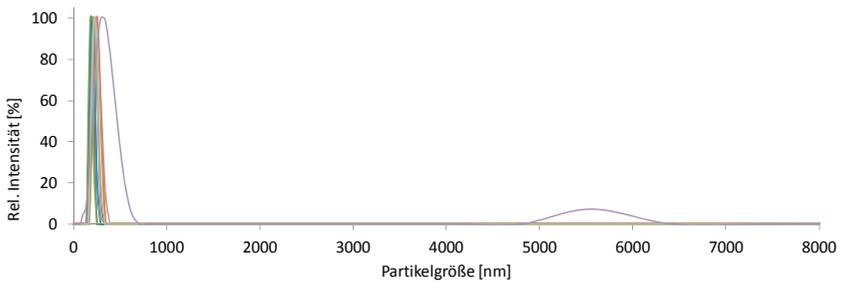


Abb. 4.4 Partikelgrößenverteilung einer 1 mg/l nTiO₂-Suspension in M9 dargestellt als normalisierte mittlere Intensitäten ($I/I_{max}[\%]$), $n=10$.

Betrachtet man die Partikelgrößenverteilung einer höher konzentrierten Suspension in Wasser, im Beispiel in Abb.12 für 60 mg/l, sind bereits bimodale Verteilungen zu beobachten: Die Spannweite der Partikelgrößen reicht von 100 nm bis über 1000 nm und ist damit breiter als bei der 2 mg/l-Suspension, zudem werden in neun der zehn Messungen auch Partikel in einem Größenbereich von 3000 nm bis 6500 nm detektiert. Dieser Größenbereich liegt außerhalb des optimalen Messbereichs der DLS (< 1000 nm), die

Belastbarkeit dieser Daten ist demnach nicht sichergestellt und wurde über REM Messungen überprüft.

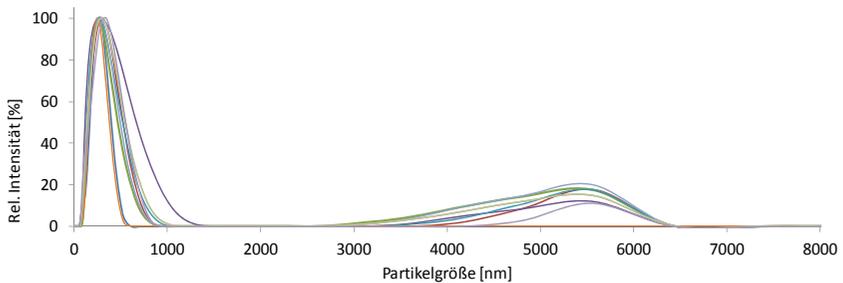


Abb. 4.5 Partikelgrößenverteilung einer 60 mg/l $nTiO_2$ -Suspension in H_2O dargestellt als normalisierte mittlere Intensitäten (I/I_{max} [%]), $n=10$.

In M9-Medium wurde die Größenverteilung in diesem Konzentrationsbereich deutlich polydisperser, der untere Peak streute hier von 160 nm bis 3000 nm (siehe Abb. 4.6). Für einige Suspensionen in M9-Medium, die hier nicht dargestellt sind, zeichneten sich noch stärkere Streuungen von bis zu 6000 nm ab.

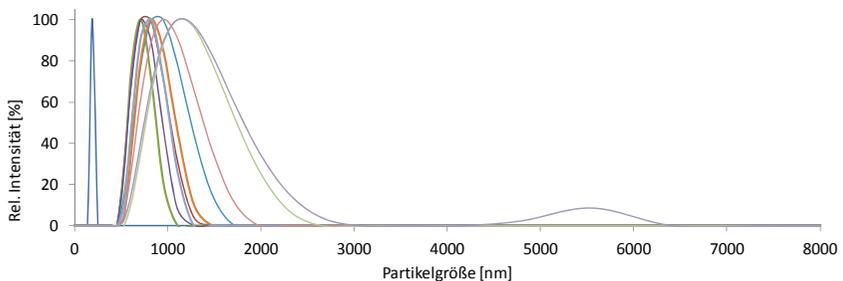


Abb. 4.6 Partikelgrößenverteilung einer 30 mg/l $nTiO_2$ -Suspension in M9 dargestellt als normalisierte mittlere Intensitäten (I/I_{max} [%]), $n=10$.

Agglomeration der Partikel im Testsystem über die Testlaufzeit von 96 Stunden

Zur Untersuchung der Entwicklung der Partikelgrößen im Testsystem über die Testlaufzeit wurde eine Testsimulation durchgeführt: Die Suspensionen wurden entsprechend der Durchführung im Nematodentest 1:2 mit dem Nährmedium M9 versetzt. Auf einen Einsatz der *E. coli*-Bakterien als Futterpartikel wurde verzichtet, da diese als partikuläre Bestandteile die DLS-Analytik stören würden.

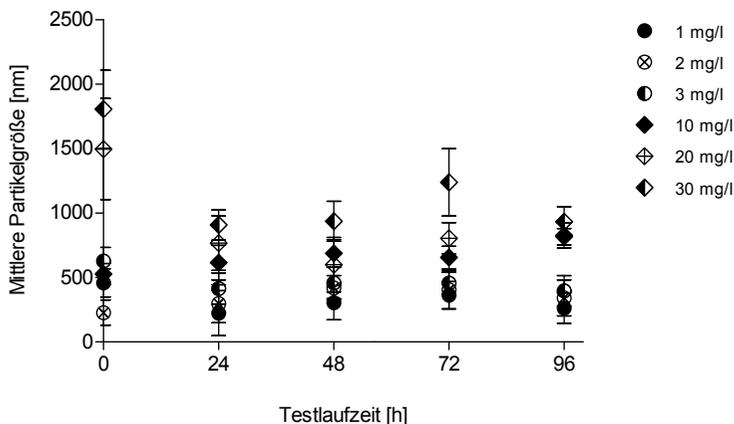


Abb. 4.7 DLS Messungen von P25 Suspensionen im Testmedium M9 nach 0, 24, 48, 72 und 96 h. Dargestellt sind die Mittelwerte der Intensity Mean-Werte von 10 Wiederholungsmessungen und Standardabweichung.

Nach den Ergebnissen der DLS Messreihe änderte sich die mittlere Partikelgröße über die Testlaufzeit von 96 Stunden jedoch nicht signifikant. Wie Abb. 4.7 zeigt, bleiben die Partikelgrößen für die meisten Konzentrationen über 96 Stunden konstant, gegenüber der Messung zur Startzeit bei t_0 nehmen sie für einige Konzentrationen sogar deutlich ab.

Makroskopisch konnte beobachtet werden, dass die $n\text{TiO}_2$ -Partikel im Testmedium agglomerierten und zum Boden der Testgefäße sedimentierten.

4.1.2 Sekundäre Partikelgrößen nach REM-Messung

Zur Validierung der DLS-Daten wurden die TiO_2 -Suspensionen unmittelbar im Anschluss an die DLS-Messungen auf Polycarbonatfilter (PC-Filter) gezogen und nach entsprechender Vorbereitung (siehe Kapitel 3.2.2) am Rasterelektronenmikroskop untersucht. Für jede Testkonzentration wurden drei Suspensionen mikroskopiert. In Abhängigkeit von der Verteilung der Partikel auf dem Filter wurden sechs bis zwölf Bilder jeder Probe aufgenommen. Ausschnitte, die dicht mit Partikeln belegt waren, wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da hier die ursprünglichen Partikelgrößen nicht erkennbar waren. Die Bilder der Filter wurden bei 20.000-facher Vergrößerung und einer Spannung von 5 keV mit dem ‚In-Lens Detektor‘ aufgenommen. Abb. 4.8 zeigt beispielhaft Aufnahmen einer $n\text{TiO}_2$ - (A) und einer $b\text{TiO}_2$ -Suspension (B).

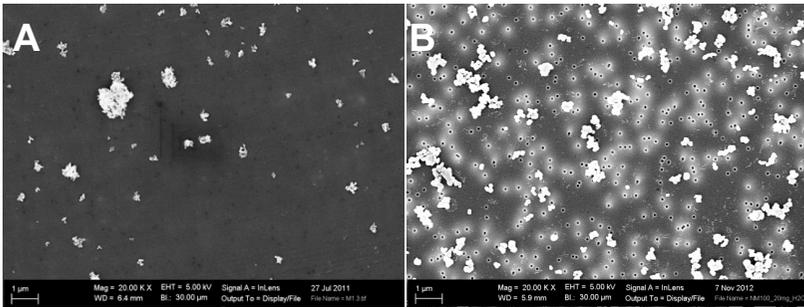


Abb. 4.8 20 mg/l TiO_2 -Suspension in H_2O bei 20.000-facher Vergrößerung durch ‚In-Lens Detektor‘, mit 6 nm Gold beschichtet. (A) $n\text{TiO}_2$ auf 0,03 μm PC-Filter; (B) $b\text{TiO}_2$ auf 0,1 μm PC-Filter (Strukturen im Hintergrund von B entsprechen den Poren des Filters).

Die Ergebnisse der Auswertung bestätigten für die $n\text{TiO}_2$ -Suspensionen in Wasser eine Größenverteilung von < 100 nm bis > 4000 nm (siehe Tab. 4.3). Die Streuung der Partikelgrößen decken sich demnach mit den Ergebnissen der DLS-Messungen (vgl. Abb. 4.1).

Tab. 4.3 Durchmesser der $n\text{TiO}_2$ -Aggregate in H_2O nach REM-Messung. Median, Quartile, Maximum, Minimum und Mittelwert in nm.

Konz. [mg/l]	Durchmesser [nm] der $n\text{TiO}_2$ Agglomerate in H_2O						
	Anzahl Partikel	Median [nm]	25% Quartil [nm]	75% Quartil [nm]	Max [nm]	Min [nm]	Mittelwert [nm]
2	500	362	213	604	4634	100	586
4	203	359	238	567	2830	93	478
6	621	443	236	967	3559	666	897
60	326	805	744	544	3559	954	851
40	973	301	201	544	3535	87	460
60	770	254	177	387	1994	102	351
200	2987	173	117	283	3783	53	249

Die REM-Auswertung weist auf einen konzentrationsunabhängigen Mittelwert von 249 bis 897 nm hin. Ein Anstieg der mittleren Partikelgröße mit zunehmender Konzentration der Suspensionen zeichnet sich nicht ab. In Teilen kann dieses Ergebnis durch eine Messungengenauigkeit der DLS-Messungen aufgrund der die hohe Partikeldichte zustande kommen. Sowohl multiple Streueffekte, als auch verminderte Laser-Transmissionsraten können bei hochkonzentrierten Suspensionen die Messgenauigkeit einschränken (Medebach et al., 2007).

Für die $n\text{TiO}_2$ -Suspensionen zeigten sich in M9-Medium geringere Partikelgrößen als in H_2O (Tab. 4.4). Diese Beobachtung widerspricht wiederum den Ergebnissen der DLS-

Messungen: Nach DLS lag die mittlere Partikelgröße in M9-Medium in Abhängigkeit von der Konzentration bei etwa 300 nm bis 1500 nm, nach REM-Auswertung bei 300 nm bis 500 nm (vgl. Tab. 4.2 und Tab. 4.4).

Tab. 4.4 Durchmesser der nTiO₂-Agglomerate in M9 nach REM-Messung. Median, Quartile, Maximum, Minimum und Mittelwert in nm.

Durchmesser [nm] der nTiO ₂ Agglomerate in M9							
Konz. [mg/l]	Anzahl Partikel	Median [nm]	25% Quartil [nm]	75% Quartil [nm]	Max [nm]	Min [nm]	Mittelwert [nm]
1	330	241	160	377	1450	68	303
2	939	283	174	475	2197	82	383
3	141	288	183	488	5145	77	431
10	424	302	230	588	5145	81	504
20	728	370	246	588	3586	83	502
30	388	405	275	590	1919	116	493
100	806	283	163	463	5923	60	470

Dieses Ergebnis könnte methodisch bedingt sein: Die Filter der M9-Suspensionen wurden im Gegensatz zu den Filtern der H₂O-Suspensionen mit Wasser gespült, um die Salze von der Filteroberfläche abzuspülen. Wird dieser Waschschritt ausgelassen, kommt es zu einer Auskristallisation der Salze des Mediums auf den Partikeln, wodurch eine Auswertung der Partikelgröße unmöglich wird. Ein Spülen der Filter kann jedoch bereits zu einer Auftrennung großer, lockerer nTiO₂-Agglomerate führen, die durch DLS-Messung als ein Partikel identifiziert werden, auf dem Filter jedoch nach dem Waschvorgang als mehrere kleinere Partikel vorliegen. Bestätigt wird hingegen für die M9-Suspensionen im Gegensatz zu den Suspensionen in Wasser ein Anstieg der Partikelgrößen mit der Partikelkonzentration, wobei dieser deutlich geringfügiger ausfällt als nach DLS-Ergebnissen.

Tab. 4.5 Durchmesser der bTiO₂-Agglomerate in H₂O nach REM-Messung. Median, Quartile, Maximum, Minimum und Mittelwert in nm.

Durchmesser [nm] der bTiO ₂ Agglomerate in H ₂ O							
Konz. [mg/l]	Anzahl Partikel	Median [nm]	25% Quartil [nm]	75% Quartil [nm]	Max [nm]	Min [nm]	Mittelwert [nm]
2	668	316	231	447	1044	103	351
6	837	334	236	460	1320	123	369
20	1796	318	210	483	2241	100	403
60	4018	292	197	475	2613	109	393
200	2035	323	200	583	6098	98	514

Für bTiO₂ bestätigen sich die Ergebnisse der DLS-Analyse durchgehend: In Wasser ist die Agglomeratgröße annähernd konzentrationsunabhängig, die mittleren Partikelgrößen liegen

bei etwa 350 bis 500 nm (Tab. 4.5). In M9-Medium kommt es hingegen zu einem deutlichen Anstieg der mittleren Agglomeratgrößen von 300 bis knapp 700 nm mit steigender Konzentration der Suspension (siehe Tab. 4.6).

Tab. 4.6 Durchmesser der bTiO₂-Agglomerate in M9 nach REM-Messung. Median, Quartile, Maximum, Minimum und Mittelwert in nm.

Durchmesser [nm] der bTiO₂ Agglomerate in M9							
Konz. [mg/l]	Anzahl Partikel	Median [nm]	25% Quartil [nm]	75% Quartil [nm]	Max [nm]	Min [nm]	Mittelwert [nm]
1	295	255	192	405	892	99	309
3	909	336	235	472	1557	102	395
10	599	435	299	664	2662	117	547
30	605	508	333	826	4380	120	702
100	1095	462	273	830	7420	107	677

Die Partikelgrößenverteilung wird dabei in beiden Medien mit zunehmender Konzentration breiter. Für die geringste Konzentration von 1 bzw. 2 mg/l liegen die Partikelgrößen etwa zwischen 100 und 1000 nm, für die höchste Konzentration von 100 bzw. 200 mg/l streuen sie von 100 bis über 6000 nm. Auch diese Beobachtung deckt sich mit den DLS-Ergebnissen.

Zu beachten ist jedoch, dass im Rahmen Größenbestimmung der TiO₂-Suspensionen weder der Einfluss von Cholesterol, noch der Einfluss der *E. coli*- Bakterien im Futtermedium auf die Agglomeration der Partikel untersucht wurde. Die Anwesenheit der Bakterien als partikuläre Strukturen würde die Bestimmung der Größenverteilung durch DLS unmöglich machen. Da ein Einfluss der Bakterien auf die Agglomeration der Partikel, beispielsweise durch abgesonderte Exopolymere, möglich ist, wurde dieser Effekt mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen untersucht (siehe Kapitel 4.1.5).

Agglomeration der Partikel im Testsystem über die Testlaufzeit von 96 Stunden

Auch die Auswertung der Suspensionen der Testsimulation durch REM zeigen, dass die Agglomeratgrößen der nTiO₂-Partikel über eine Testlaufzeit von 96 Stunden stabil sind. Mit 345 bis 656 nm (Tab. 4.7) entsprechen die mittleren Partikelgrößen nach 96 Stunden denen der Suspensionen unmittelbar nach Einbringung in das Testsystem von 300 bis 500 nm (vgl. Tab. 4.4).

Tab. 4.7 Durchmesser der nTiO₂-Agglomerate im Testsystem nach 96 Stunden Inkubation- Ergebnisse der REM-Messung mit Median, Quartilen, Maxima, Minima und Mittelwerten in nm.

Durchmesser [nm] der nTiO ₂ Agglomerate im Testsystem t ₉₆							
Konz. [mg/l]	Anzahl Partikel	Median [nm]	25% Quartil [nm]	75% Quartil [nm]	Max [nm]	Min [nm]	Mittelwert [nm]
1	26	326	168	377	874	124	345
3	170	333	196	579	2597	74	460
10	13	662	231	958	1651	131	656
20	18	338	214	549	2134	75	433
30	102	272	168	450	1583	83	381

4.1.3 Zetapotentiale der Partikel

Das Zetapotential, also die Ladung eines Partikels an seiner Abscherschicht, hat einen starken Einfluss auf die Agglomeration der Partikel sowie die Bindungskapazität gegenüber anderen Stoffen im System (siehe Kapitel 2.8). Es hängt neben den Partikeleigenschaften selbst von den Ionen des Umgebungsmediums ab. Aus diesem Grund wurden die Zetapotentiale beider Testmaterialien in Abhängigkeit der Medien untersucht. Für jede Konzentration wurden dabei drei Replikate herangezogen. Das mittlere Zetapotential erwies sich als konzentrationsunabhängig. Wie Tab. 4.8 zeigt ist es zudem für nTiO₂ entgegen der Annahmen unabhängig vom Ionengehalt des Medium: Es liegt in Wasser und in M9-Medium im Mittel bei -25 mV. Für bTiO₂ zeigt sich die Abhängigkeit der Zetapotentials von der Ionenstärke des Mediums erwartungsgemäß: In Wasser liegt es bei -48,42 mV, in M9-Medium bei -28,54 mV. bTiO₂-Partikel sind in Wasser demnach deutlich stärker negativ polarisiert. Aufgrund des negativeren Zetapotentials kommt es im Vergleich zu nTiO₂ bei bTiO₂ also zu stärkeren Abstoßungseffekten, die Partikel agglomerieren weniger, was sich in den kleineren Partikelgrößen widerspiegelt (vgl. Abb. 4.1 und Abb. 4.2).

Tab. 4.8 Zetapotentiale in mV und Standardabweichung der nTiO₂- und bTiO₂-Partikel in Wasser bzw. M9-Medium.

Material	nTiO ₂		bTiO ₂	
	H ₂ O	M9	H ₂ O	M9
Zetapotential [mV]	-25,35	-25,39	-48,42	-28,54
STABW [mV]	9,20	6,94	2,20	3,40

Durch Zugabe des Nährmediums M9 verringerte sich das Zetapotential von bTiO₂ von -48 mV auf -28 mV, wodurch es auch hier zu einer Agglomeration der Partikel kam: Die Partikelgrößen von bTiO₂ in M9-Medium liegen bei 306 nm bis 1509 nm mit einem PDI von 0,29 im Mittel. Diese Ausprägung ist vergleichbar mit der Agglomeration von nTiO₂, die in

M9-Medium mittlere Partikelgrößen von 292 nm bis 1474 nm mit einem mittleren PDI von 0,48 aufweisen.

4.1.4 TiO₂-Konzentrationen

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Suspensionsmethode und der Einbringung der TiO₂-Suspensionen in das Testsystem wurden die Titankonzentrationen in den Testansätzen bestimmt. Die Messung erfolgte auf zwei Arten:

1. Messung der Titankonzentration direkt in den Partikelsuspensionen mittels ICP-OES
2. Messung der Titankonzentration nach Mikrowellenaufschluss der Suspensionen mit einem HNO₃/HF/H₂O –Gemisch mittels ICP-OES.

Der letztere Ansatz vermeidet Fehler durch eine zweite Resuspendierung, da hier das gesamte Aliquot aufgeschlossen wurde. Die Aufschlussmethode ist ihrerseits hingegen wiederum aufgrund der vielen Präparationsschritte fehleranfällig. Aus diesem Grund werden hier die Ergebnisse beider Methoden verglichen.

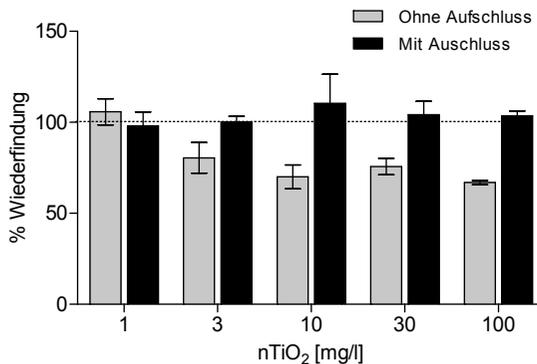


Abb. 4.9 Wiederfindung von Titandioxid in den nTiO₂-Testansätzen, dargestellt in % als Mittelwerte aus drei Replikaten und STABW. Schwarze Balken: mit Aufschluss; graue Balken: ohne Aufschluss.

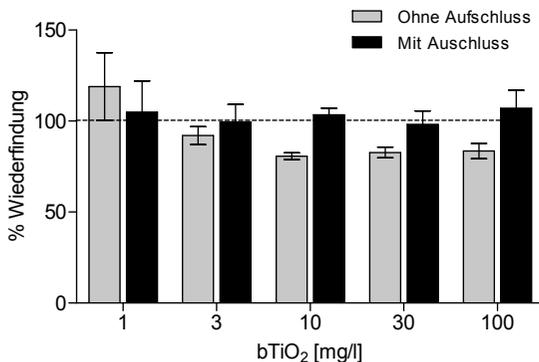


Abb. 4.10 Wiederfindung von Titandioxid in den $bTiO_2$ -Testansätzen, dargestellt in % als Mittelwerte aus 3 Replikaten und STABW. Schwarze Balken: mit Aufschluss; graue Balken: ohne Aufschluss.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Verfahren ohne Aufschluss tatsächlich geringere Abweichungen erzeugt (vgl. Abb. 4.9 und Abb. 4.10). Wie in Tab. 4.9 dargestellt führt die Analyse ohne Aufschluss jedoch zu hohen Verlusten: Die mittleren Wiederfindungsraten liegen für $nTiO_2$ bei 80 % und für $bTiO_2$ 92 %. Die mittleren Wiederfindungsraten mit Aufschluss liegen für beide Materialien bei 103 %. Die Einbringung der TiO_2 -Materialien in die Testsysteme nach SOP erfolgte mit einem Fehler von maximal 7,4 % für $nTiO_2$ und 9,5 % für $bTiO_2$. Ein Fehler von maximal 10 % in den Konzentrationen der Testsubstanzen sollte daher in die Interpretation der toxikologischen Ergebnisse einbezogen werden.

Tab. 4.9 Wiederfindung von TiO_2 in den Testsystemen für $nTiO_2$ und $bTiO_2$ aus Analysen mit und ohne Aufschluss. Angaben in % der Zielkonzentration; MW: Mittelwert, MIN: Minimum, MAX: Maximum.

		$nTiO_2$		$bTiO_2$	
		ohne Aufschluss	mit Aufschluss	ohne Aufschluss	mit Aufschluss
Wiederfindung [%]	MW	80± 5,6	103± 7,4	92± 6,5	103± 9,5
	MIN	63	91	78	89
	MAX	114	129	140	124

4.1.5 Agglomeration der TiO_2 -Partikel mit *E. coli*

Im Rahmen der Größenbestimmung der TiO_2 -Suspensionen durch DLS-Messung konnte der Einfluss der *E. coli*-Bakterien, die als Nahrungspartikel für *C. elegans* in den Testansätzen vorliegen, auf das Agglomerationsverhalten der TiO_2 -Partikel nicht berücksichtigt werden. Im Folgenden werden REM-Aufnahmen von TiO_2 -Suspensionen dargestellt, die zuvor mit den

Bakterien inkubiert wurden. Abb. 4.11 und Abb. 4.12 zeigen exemplarisch die Assoziation der Partikel mit den *E. coli*-Bakterien für nTiO₂ und bTiO₂.

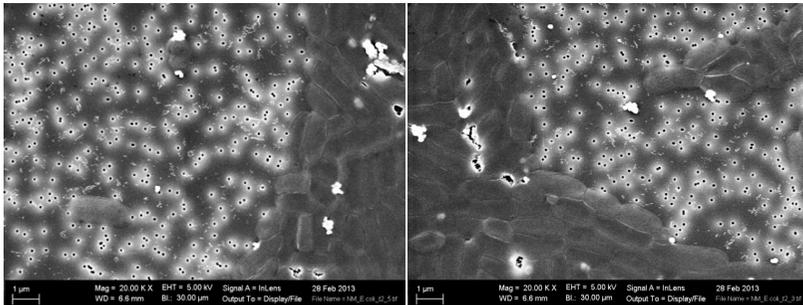


Abb. 4.11 Agglomeration einer bTiO₂-Suspension (10 mg/l) mit *E. coli* nach 2-stündiger Inkubation. REM-Aufnahme mit ‚In Lens-Detektor‘, Vergrößerung 20.000-fach. Suspension auf 0,1 µm PC-Filter, getrocknet im Exsikkator, mit 6 nm Gold beschichtet.

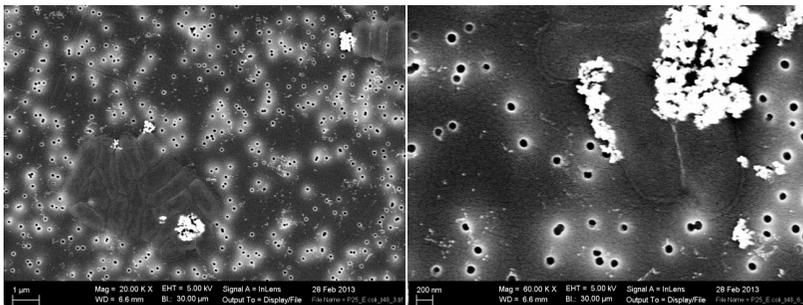


Abb. 4.12 Agglomeration einer nTiO₂-Suspension (10 mg/l) mit *E. coli* nach 48-stündiger Inkubation. REM-Aufnahme mit ‚In Lens-Detektor‘, Vergrößerung 20.000-fach. Suspension auf 0,1 µm PC-Filter, getrocknet im Exsikkator, mit 6 nm Gold beschichtet.

Beide Partikelarten scheinen mit der Oberfläche der Bakterien zu assoziieren, wobei für bTiO₂ häufiger auch frei vorliegende, nicht assoziierte Agglomerate beobachtet wurden.

Die Partikelgrößen liegen auch nach 48 Stunden Inkubation im Testsystem - also mit *E. coli*-Bakterien und Cholesterol in M9-Medium - im selben Größenbereich wie die Partikel, die ausschließlich in M9-Medium vorliegen: Die mittlere Partikelgröße liegt nach zwei Stunden Inkubation bei 315 nm (nTiO₂) bzw. 462 nm (bTiO₂), nach 48 Stunden Inkubation bei 468 nm bzw. 403 nm (siehe Tab. 4.10).

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Partikelgrößen in reinem M9-Medium, dargestellt in Tab. 4.4 und Tab. 4.6, so wird deutlich, dass Bakterien und Cholesterol keinen signifikanten Einfluss auf die Partikel-Partikel Interaktion haben. Die REM-Bilder in Abb. 4.12 machen

jedoch deutlich, dass es zu einer Wechselwirkung zwischen Partikelagglomeraten und Bakterien kommt.

Tab. 4.10 Partikelgrößen der TiO_2 -Suspensionen einer Konzentration von 10 mg/l nach 2 bzw. 48 Stunden Inkubation im Testsystem mit *E. coli*-Bakterien und Cholesterol. Mittelwert, Minimum und Maximum in nm.

Durchmesser [nm] der TiO_2 Agglomerate im Testsystem mit <i>E. coli</i>						
	nTiO₂			bTiO₂		
Zeitpunkt [h]	Anzahl Partikel	Min - Max [nm]	Mittelwert [nm]	Anzahl Partikel	Min- Max [nm]	Mittelwert [nm]
2	405	50 - 2170	315	91	130 - 1570	462
48	98	60 - 2050	468	38	110 - 1190	403

4.2 Einfluss der primären und sekundären Partikelgröße auf die Effekte von TiO_2 -Partikeln

Im ersten Schritt der toxikologischen Untersuchung wurde der Einfluss der Primärpartikelgröße von TiO_2 auf die Toxizität der Materialien untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Effekte zweier TiO_2 -Materialien unterschiedlicher Größe bestimmt und verglichen (vgl. Tab. 3.1). Zur Bestimmung der toxikologischen Effekte wurde der chronische Nematodentest mit einer Expositionszeit von 96 Stunden durchgeführt. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde anschließend speziell die Ingestion der beiden Materialien durch den Testorganismus *C. elegans* untersucht und der Einfluss der Exposition auf die Nahrungsaufnahme des Organismus beobachtet. Das folgende Kapitel fasst die Ergebnisse zusammen und stellt dabei einen Bezug zur Agglomeratgröße der Materialien her.

4.2.1 Toxikologische Effekte von bTiO₂ und nTiO₂

Abb. 4.13 fasst die Ergebnisse aus drei unabhängig durchgeführten Nematodentests mit nTiO₂-Konzentrationen von 1 bis 30 mg/l zusammen. Nach Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf eine Gauß'sche Verteilung sind dabei alle Daten normalverteilt.

Die Exposition von *C. elegans* gegenüber nTiO₂ induzierte eine deutliche Hemmung der Reproduktion der Testorganismen mit klarer Dosis-Wirkungs-Beziehung. Den Ergebnissen der statistischen Analyse zufolge lag der LOEC (lowest observed effect concentration) für Reproduktion bei 10 mg/l ($p < 0,05$), der LOEC für Wachstum bei 30 mg/l ($p < 0,001$). Eine Konzentration von 30 mg/l rief eine mittlere Reproduktionshemmung von $39 \% \pm 11$ hervor ($p < 0,001$). Das Wachstum wurde dabei signifikant um $6,5 \% \pm 2$ gehemmt, während kein signifikanter Einfluss auf die Fertilität von *C. elegans* beobachtet werden konnte.

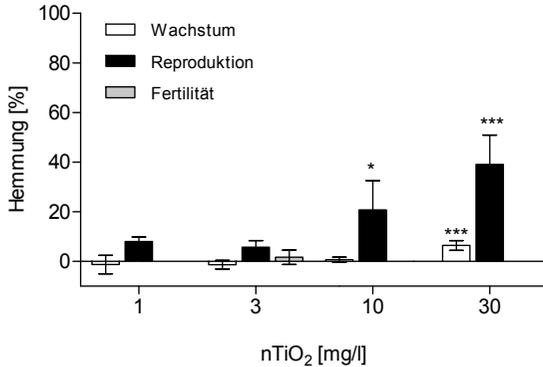


Abb. 4.13 Effekte von nTiO₂ auf Wachstum, Reproduktion und Fertilität von *C. elegans* im Dunkeln, Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen mit je vier Replikaten ($n = 3 \times 4 = 12$); (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ nach einfaktorieller ANOVA mit Post-hoc-Test Dunett).

In einem weiteren Versuch wurde die höchste getestete Konzentration auf 100 mg/l erhöht. Mit dieser Konzentrationserhöhung stieg auch die Hemmung: Die Reproduktion wird bei 100 mg/l um $46 \% \pm 3$ gehemmt, das Wachstum wird um $34 \% \pm 3$ gegenüber der Kontrolle vermindert. Eine Erhöhung der Testkonzentration auf 300 mg/l verursachte keine weitere Steigerung der Hemmung.

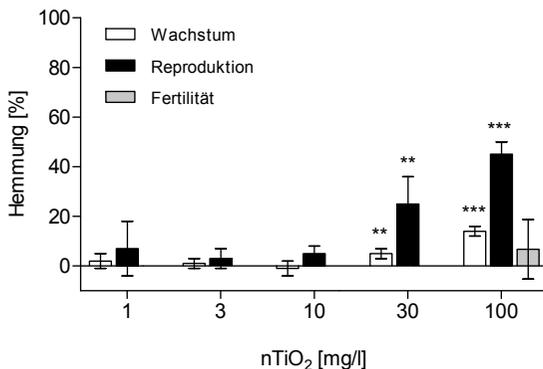


Abb. 4.14 Effekte von nTiO₂ auf Wachstum, Reproduktion und Fertilität von *C. elegans* im Dunkeln, Mittelwerte aus einem Versuch mit vier Replikaten ($n = 4$); (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ nach einfaktorieller ANOVA mit Post-hoc-Test Dunett).

Zur Abschätzung des Einflusses der Primärpartikelgröße wurde im Vergleich zu P25 als nanopartikuläres TiO₂ eine nicht nanopartikuläre Referenzsubstanz untersucht. Wie Abb.

4.15 demonstriert, hat $bTiO_2$ bis zu einer Konzentration von 100 mg/l keine Schädigung gegenüber *C. elegans*. Weder Wachstum, noch Reproduktion und Fertilität sind durch eine 96-stündige Exposition beeinträchtigt.

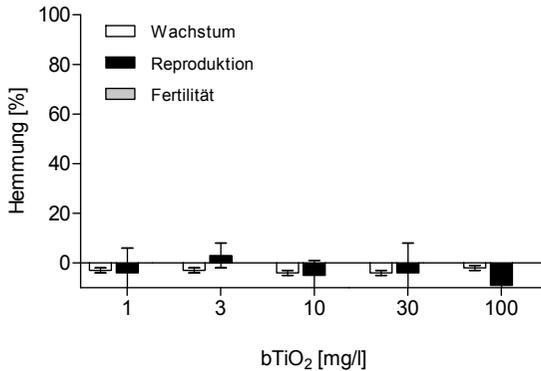


Abb. 4.15 Effekte von $bTiO_2$ auf Wachstum, Reproduktion und Fertilität von *C. elegans* im Dunkeln, Mittelwerte aus einem Versuch mit vier Replikaten ($n = 4$); nach einfaktorieller ANOVA mit Post-hoc-Test Dunnett liegen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle vor.

Betrachtet man die Hemmung der Reproduktion in Bezug auf die sekundäre Partikelgröße nach DLS (Abb. 4.17 und Abb. 4.17), so wird deutlich, dass die zwei TiO_2 -Materialien bei vergleichbarer Agglomeratgröße ganz unterschiedliche Effekte hervorrufen.

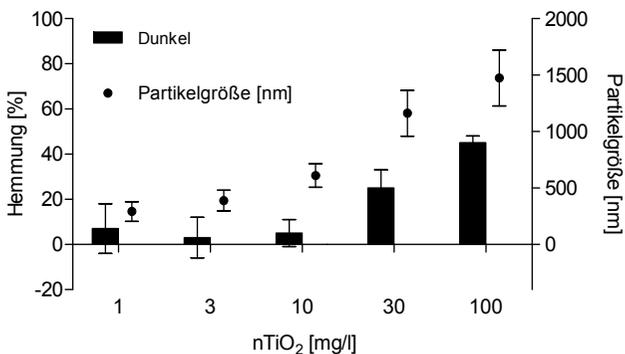


Abb. 4.16 Reproduktionshemmung ($n=4$) von $nTiO_2$ gegen die sekundäre Partikelgröße nach DLS der jeweiligen Konzentration.

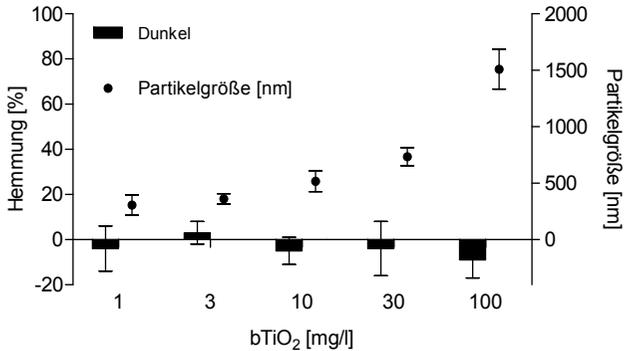


Abb. 4.17 Reproduktionshemmung ($n=4$) von $bTiO_2$ gegen die sekundäre Partikelgröße nach DLS der jeweiligen Konzentration.

4.2.2 Ingestion der Partikel durch *C. elegans*

Ein möglicher Unterschied in den Effekten der beiden TiO_2 -Materialien, der mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Partikelgröße der Materialien abhängig ist, ist die Ingestion der Partikel in die Testorganismen, die letztendlich die Bioverfügbarkeit des Materials bestimmt. Grundlage für das Verständnis der toxikologischen Effekte von Nanomaterialien ist deshalb die Aufklärung von Aufnahme- und Ausscheidungsprozessen der Kontaminanten.

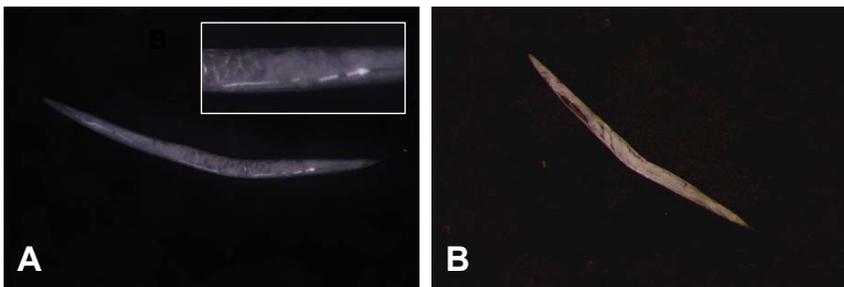


Abb. 4.18 Stereomikroskopische Aufnahme von *C. elegans* bei 60-facher Vergrößerung. (A) nach 96 h Exposition mit 50 mg/l $nTiO_2$ unter Anwesenheit von *E. coli* und (B) Kontrolle ohne TiO_2

Stereomikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass beide TiO_2 -Materialien innerhalb von 48 Stunden in den intestinalen Trakt von *C. elegans* aufgenommen werden. TiO_2 ist aufgrund seines hohen Brechungsindex ein stark reflektierendes Weißpigment und somit unter Auflichtmikroskopie im transparenten Organismus als weiße Substanz gut

sichtbar (beispielhaft dargestellt in Abb. 4.18). Die Aufnahme konnte dabei für alle getesteten Konzentrationen von 10 mg/l bis 100 mg/l beobachtet werden. Die exponierten Würmer unterschieden sich durchgehend deutlich von den Kontrollwürmern (Abb. 4.12 B). Es ist davon auszugehen, dass es auch bei niedrigeren Konzentrationen zu einer Aufnahme kommt, die stereomikroskopisch nicht nachzuweisen ist.

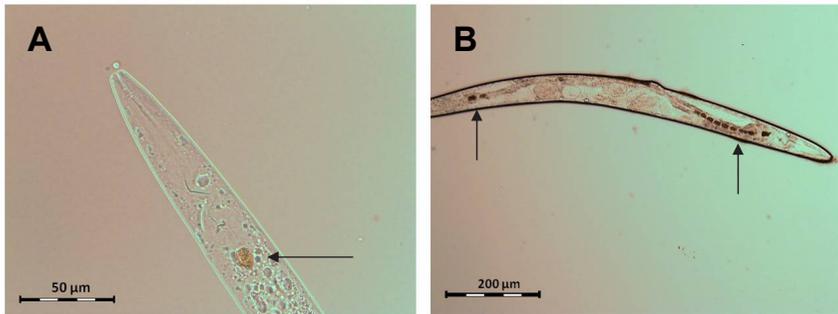


Abb. 4.19 *C. elegans* nach 4,75 h Exposition in $n\text{TiO}_2$ ohne *E. coli*. (A) 10 mg/l, Vergrößerung 400-fach; (B) 100 mg/l, Vergrößerung 100-fach.

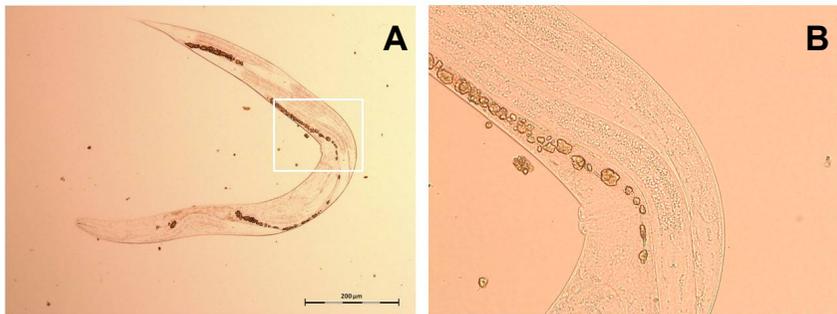


Abb. 4.20 *C. elegans* nach Exposition in 100 mg/l $n\text{TiO}_2$ über 240 Stunden mit *E. coli*. (A) Gesamtaufnahme, Vergrößerung 40-fach; (B) Ausschnitt mit intestinalem Trakt und Vulva, Vergrößerung 100-fach.

Im Durchlicht konnte die orale Aufnahme von $n\text{TiO}_2$ durch *C. elegans* nach bereits 4,75 Stunden beobachtet werden (Abb. 4.19). Titandioxid stellt sich dabei aufgrund seines hohen Brechungsindex dunkel dar. Die Exposition erfolgte hier ohne die Anwesenheit von *E. coli*-Bakterien. Bei einer Konzentration von 10 mg/l finden sich vereinzelt $n\text{TiO}_2$ -Agglomerate, wie z.B. in Abb. 4.19 A sichtbar. Bei Konzentrationen von 100 mg/l kommt es hier bereits zu einer Blockierung großer Teile des Darmlumens von *C. elegans* (siehe Abb. 4.19 B).

Nach 10-tägiger Exposition gegenüber $n\text{TiO}_2$ unter Anwesenheit von *E. coli* als Nahrungspartikel haben sich im Darmlumen von *C. elegans* kompakte Agglomerate mit einem Durchmesser von bis zu $130\ \mu\text{m}$ gebildet (Abb. 4.20 A und B). Die Agglomerate wirkten sehr dicht und kompakt und blockierten den Darmtrakt fast vollständig. Eine weitere Aufnahme von Bakterien als Nahrungsquelle ist unter diesen Bedingungen kaum zu erwarten. Auch $b\text{TiO}_2$ wird durch *C. elegans* unter Anwesenheit von *E. coli*-Bakterien aufgenommen und füllt große Teile des Darmtraktes aus, wie aus Abb. 4.21 hervorgeht. Eine Agglomeration der Partikel im Darm ist hingegen nicht zu beobachten: Die Partikel sind fein verteilt und es ist zu vermuten, dass sie leichter ausgeschieden werden können, als die $n\text{TiO}_2$ -Agglomerate.

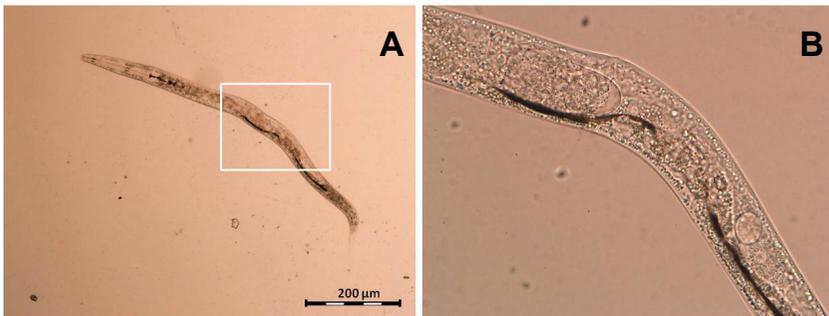


Abb. 4.21 *C. elegans* nach Exposition in $100\ \text{mg/l}$ $b\text{TiO}_2$ über 96 Stunden über 240 Stunden mit *E. coli*. (A) Gesamtaufnahme, Vergrößerung 40-fach; (B) Ausschnitt mit intestinale Trakt, Vergrößerung 100-fach.

Um diese Hypothese zu unterstützen, wurde die Ausscheidung der Partikel nach Überführung in TiO_2 -freies Medium untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass *C. elegans* sowohl $n\text{TiO}_2$, als auch $b\text{TiO}_2$ über einen Zeitraum von 24 Stunden ausscheiden konnte.

Energiedispersive Röntgenspektrometrie (EDX)

Mit Hilfe der EDX konnte die Akkumulation von TiO_2 im Darm auch elementar nachgewiesen werden. Die Anregung der Proben mit einer hohen Elektronenvoltzahl ermöglicht das Durchdringen der Kutikula. Neben Titan (blau dargestellt) wurde im ‚EDX-Mapping‘ (Abb. 4.22) zeitgleich Sauerstoff (beige dargestellt) detektiert. Sauerstoff ist im Wurm ubiquitär ist und bildet damit die Umrisse des Wurms gut ab. Die REM-Aufnahme der Oberfläche des Wurmes (Abb. 4.22 B), zeigt deutlich, dass hier keine Partikel an der Oberfläche anhaften.

Die Anhäufung von Titan, die durch das EDX-Mapping nachgewiesen wurde (Abb. 4.22 A) muss demnach subkutan vorliegen.

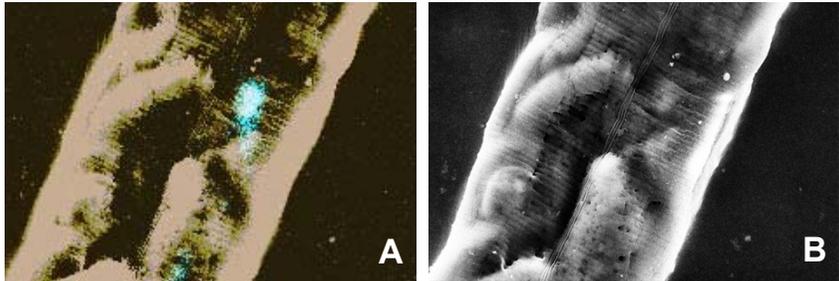


Abb. 4.22 EDX-Mapping von *C. elegans* nach 96-stündiger Exposition gegenüber 20 mg/L TiO_2 . (A) EDX-Mapping von Titan (blau) und Sauerstoff (beige) mit 20 keV, (B) REM Bild, SE Detektor, 5 keV.

Um die Unterschiede in den Effekten der Materialien zu klären, wurde im nächsten Schritt der Einfluss der TiO_2 -Agglomerate auf die Nahrungsaufnahme von *C. elegans* untersucht.

4.2.3 Hemmung der Nahrungsaufnahme

Zur Untersuchung der Auswirkung der TiO_2 -Exposition auf die Nahrungsaufnahme von *C. elegans* wurden die Würmer zunächst den TiO_2 -Partikeln im Nährmedium M9 mit bzw. ohne Zusatz von *E. coli*-Bakterien als Nahrungspartikel exponiert. Eine Kontrollgruppe wurde ausschließlich in Nährmedium ohne *E. coli* inkubiert. Im Anschluß wurden fluoreszierende Mikropartikel aus Polystyrol mit einem Durchmesser von $0,84 \text{ nm} \pm 0,019$ zugefügt, die die Nahrungspartikel simulierten.

Im ersten Experiment wurden die Würmer gegenüber den Testsubstanzen über 4,75 Stunden ohne *E. coli*-Bakterien im Nährmedium exponiert. Wie Abb. 4.23 A veranschaulicht nahmen die Organismen der Kontrollgruppe die Partikel innerhalb von 10 Minuten in den gesamten Darmtrakt - vom Pharynx bis zum Enddarm – auf. Das Darmlumen der TiO_2 -exponierten Würmer hingegen war zum Großteil mit TiO_2 -Agglomeraten blockiert. Die Aufnahme der Mikropartikel, die die Nahrungspartikel simulierten, erfolgte nur bis in den posterioren Bulbus des Pharynx oder gerade darüber hinaus, über das pharyngal-intestinale Ventil in das vordere intestinale Lumen. Eine Aufnahme in den Mitteldarm konnte jedoch nicht beobachtet werden (siehe Abb. 4.23 B und C). Sowohl $n\text{TiO}_2$, als auch $b\text{TiO}_2$ haben demnach unter gegebenen Bedingungen eine hemmende Wirkung auf die Aufnahme von Nahrungspartikeln durch *C. elegans*.

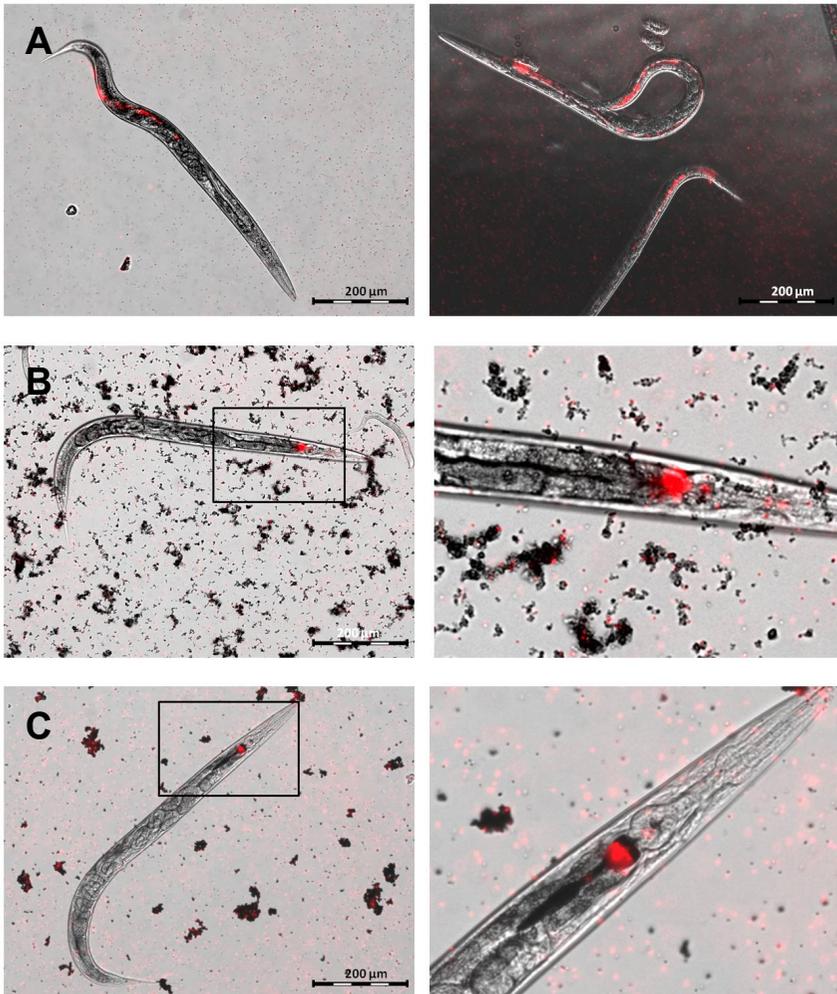


Abb. 4.23 Hemmung der Nahrungsaufnahme: *C. elegans* nach 10 Minuten Exposition gegenüber fluoreszierenden Mikropartikeln; Vergrößerung 100-fach, Filterkombination Texas Red. (A) Kontrollgruppe ohne vorhergehende TiO₂ Exposition, (B) nTiO₂-Gruppe: *C. elegans* nach 4,75 h Inkubation in 100 mg/l nTiO₂-Suspension ohne *E. coli*-Bakterien und (C) bTiO₂-Gruppe: *C. elegans* nach 4,75 h Inkubation in 100 mg/l bTiO₂-Suspension ohne *E. coli*-Bakterien. Die rot fluoreszierenden Mikropartikel simulieren Nahrungspartikel und sind bei A im gesamten Darmtrakt, bei B und C im hinteren Bereich des posterioren Bulbus zu sehen, die nTiO₂-Partikel füllen den Mitteldarm aus und stellen sich als kompakte, schwarze Partikelanhäufungen dar.

Anders stellte sich der Effekt der TiO₂-Partikel nach 48-stündiger Exposition in Anwesenheit von *E. coli* dar. Auch hier waren die Darmlumen der Kontrollgruppe bereits innerhalb von 10 Minuten durchgehend mit Mikropartikeln gefüllt, während TiO₂-exponierte Organismen sowohl Mikropartikel, als auch TiO₂-Agglomerate im Darm trugen. Mikropartikel und TiO₂-Agglomerate wurden etwa im selben Ausmaß aufgenommen. Auch in Anwesenheit von *E. coli* fand demnach eine Aufnahme der TiO₂-Partikel statt. Die Aufnahme der Mikropartikel, die erst nach der 48-stündigen Exposition zugegeben wurden, legt jedoch nahe, dass in Anwesenheit Bakterien auch eine Ausscheidung der Partikel erfolgt. Bei einzelnen TiO₂-exponierten Organismen trat jedoch auch in Anwesenheit von *E. coli* eine komplette Blockierung des Darmtrakts trat, die auch nach 60 Minuten der Mikropartikel-Exposition noch anhielt.

4.3 Co-Kontaminanten: Wirkung von nTiO₂ auf die Toxizität von PAKs

Aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften gelten industriell gefertigte Nanopartikel als potentiell bedeutende Interaktoren in ihrer Umwelt und stehen im Verdacht die Toxizität und Verfügbarkeit von Co-Kontaminanten zu beeinflussen. Mit den folgenden Experimenten wurde anhand der Modellschubstanz Phenanthren untersucht, ob nTiO₂ als Träger für lipophile Co-Kontaminanten dienen kann, oder auf andere Art die Bioverfügbarkeit des Schadstoffes beeinflusst. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Welche Auswirkung hat nTiO₂ auf die Toxizität von Phenanthren gegenüber *C. elegans* in kombinierter Exposition?
2. Kommt es zu einer Beeinflussung der Bioverfügbarkeit von Phenanthren und können mögliche Auswirkungen auf einen Trägereffekt des Nanomaterials zurückgeführt werden?

Zur Aufklärung dieser Fragestellungen wurden zum einen die chronischen Effekte von nTiO₂ und Phenanthren in kombinierter Exposition anhand des Nematodentests untersucht, zum anderen wurde die Expression einer cytochromabhängigen Monooxygenase als Biomarker für die Verfügbarkeit von PAKs bestimmt.

Voraussetzung für die Interpretation der beobachteten Effekte sind Kenntnisse über das chemisch-physikalische Verhalten der Testsubstanz. Aus diesem Grund wurde zunächst die Entwicklung der Konzentrationen von Phenanthren im Testsystem, sowie die Sorption des Co-Kontaminanten an die Nanopartikel untersucht. In den folgenden zwei Kapiteln werden die entsprechenden Ergebnisse zusammengefasst werden.

4.3.1 Verhalten von Phenanthren im Testsystem

Mit einer Wasserlöslichkeit von 0,0011 g/l bei 25°C ist Phenanthren schlecht wasserlöslich und wurde mit Hilfe des Lösevermittlers DMSO in die Testgefäße eingebracht. Zur Vermeidung von Adsorptionen an der Gefäßwand wurden für die Tests ausschließlich Glasgefäße verwendet. Mit einem Dampfdruck von 0,022 Pa bei 25°C kommt es bereits bei Raumtemperatur zum Verdampfen des Kontaminanten. In dem durch Parafilm verschlossenen System kann es demnach leicht zum Abbau der Phenanthrenkonzentration in den Testansätzen kommen. Aus diesem Grund wurde die Entwicklung der Phenanthrenkonzentration im Testsystem über die gesamte Testlaufzeit von 96 h gemessen.

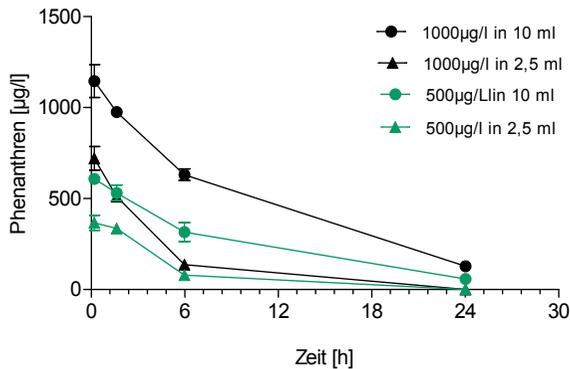


Abb. 4.24 Phenanthrenkonzentrationen im Testverlauf, Mittelwerte und STABW, $n=3$. Kreise: 10 ml Ansätze, Dreiecke: 2,5 ml Ansätze.

Wie Abb. 4.24 veranschaulicht sank die Phenanthrenkonzentration bereits innerhalb der ersten sechs Stunden rapide ab, nach 24 bzw. 48 Stunden konnte in den Testlösungen bereits kein Phenanthren mehr nachgewiesen werden. Das Volumen hatte dabei einen starken Einfluss auf die Entwicklung der Konzentrationen: In den 2,5 ml-Ansätzen war zum Zeitpunkt t_0 , unmittelbar nach Ansetzen der Lösungen, nur etwa 70 % des eingebrachten Phenanthrens in den Lösungen nachzuweisen, während in den 10 ml-Ansätzen 114 % bis 120 % nachgewiesen wurden. Nach 24 Stunden war in den 2,5 ml Ansätzen bereits kein Phenanthren mehr gelöst, in den 10 ml-Ansätzen waren noch etwa 12 % des Phenanthrens in Lösung. Diese Abhängigkeit könnte zum einen auf die geringeren Pipettiervolumen in den 2,5 ml Ansätzen zurückgeführt werden, zum anderen durch das ungünstigere Oberflächen-Volumen-Verhältnis der 2,5 ml-Ansätze verursacht sein.

Der Verlust des Phenanthrens könnte folgende Ursachen haben:

1. Adsorption des Phenanthrens an den Testgefäßwänden
2. Auskristallisierung des Phenanthrens in den wässrigen Testlösungen
3. Verdunstung des Phenanthrens aus den Testlösungen

Um den Verbleib des Phenanthrens aufzuklären, wurden sowohl die Testgefäße, als auch die Lösungen nach 48 Stunden Inkubation in den Testansätzen mit Hexan ausgeschüttelt. Anschließend wurden die Hexanextrakte eingeeengt und mittels GC-MS auf deren Phenanthrenkonzentration untersucht. Die Messungen konnten zeigen, dass weder von den Gefäßwänden, noch aus den Testlösungen Phenanthren extrahiert werden konnte. Es kommt also nicht zu einer Adsorption des Phenanthrens an die Gefäßwände oder zu einer Auskristallisierung aus den Lösungen. Demnach ist das Phenanthren durch Verdunstung aus den Testlösungen entwichen. Möglicherweise adsorbiert es daraufhin an der Abdeckung der Gefäße aus Parafilm.

4.3.2 Sorption von Phenanthren an nTiO₂

Zunächst wurde das Sorptionsverhalten von Phenanthren an die hier verwendeten nTiO₂-Partikel untersucht. Dazu wurden nTiO₂-Suspensionen mit Konzentrationen von 1, 3 und 10 mg/l über 30 Minuten in einer 500 µg/l Phenanthrenlösung inkubiert und anschließend mit Hexan extrahiert. Bei einer Wiederfindung des Standards in den Extrakten von 113 % konnte nur eine sehr geringfügige Sorption von Phenanthren an nTiO₂ von 0,85 % ± 0,64 nachgewiesen werden.

4.3.3 Toxizität von nTiO₂ und Phenanthren bei kombinierter Exposition

Zur Einordnung der Toxizität von Phenanthren und zur Ermittlung der Arbeitskonzentration für die Folgeexperimente wurden zunächst die Einzelsubstanzeffekte von Phenanthren auf *C. elegans* untersucht. Dazu diente der chronische Nematodentest über 96 Stunden, als Endpunkte wurden für alle Folgeexperimente Wachstum, Reproduktion und Fertilität herangezogen.

Wie aus Abb. 4.25 hervorgeht zeigte sich für die Reproduktionshemmung eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung. Ab 200 µg/l tritt eine signifikante Reproduktionshemmung auf mit $p < 0,05$, ab 500 µg/l liegt $p < 0,001$. Der EC₅₀ von Phenanthren liegt für die Reproduktion nach 96-stündiger Exposition bei 1230 µg/l. Als Arbeitskonzentration für die Folgeexperimente wurden 500 µg/l und 1000 µg/l ausgewählt. Es sollte sowohl eine Abnahme, als auch eine Zunahme der Toxizität beobachtet werden können.

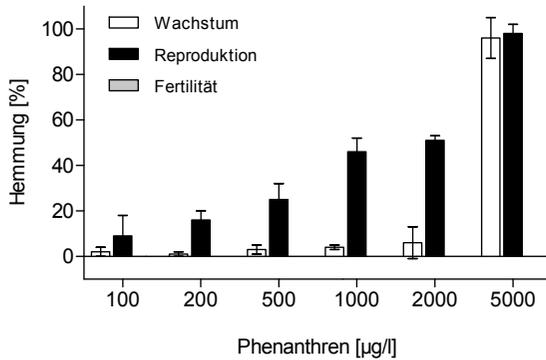


Abb. 4.25 Hemmung von Wachstum, Reproduktion und Fertilität von *C. elegans* durch Phenanthren im Dunkeln; Mittelwert und STABW, $n = 4$.

Zur Untersuchung des Einflusses von $n\text{TiO}_2$ auf die Toxizität von Phenanthren im Dunkeln wurde *C. elegans* beiden Kontaminanten zeitgleich über einen Zeitraum von 96 Stunden exponiert.

Konstante $n\text{TiO}_2$ -Konzentration bei ansteigender Phenanthrenkonzentration

Im folgenden Experiment wurde die Konzentration von $n\text{TiO}_2$ bei 3 mg/l, also dem NOEC in Bezug auf den Endpunkt Reproduktion konstant gehalten und mit ansteigenden Phenanthren-Konzentrationen von 100 µg/l bis 1000 µg/l im Test eingesetzt.

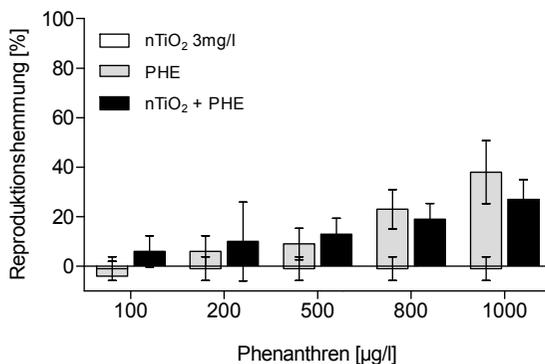


Abb. 4.26 Hemmung der Reproduktion von *C. elegans* durch Phenanthren und $n\text{TiO}_2$ im Dunkeln (Mittelwerte und STABW, $n = 4$). Weiße/graue Säulen: addierte Einzelsubstanzeffekte; schwarze Säulen: Effekte durch kombinierte Exposition.

Die Testergebnisse zeigten eine klare Dosis-Wirkung-Beziehung für die Reproduktionshemmung durch Phenanthren. $n\text{TiO}_2$ hat unter den gegebenen Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die Toxizität von Phenanthren. Es kommt gegenüber dem Einzelsubstanzeffekt von Phenanthren zu einer geringen, jedoch nicht signifikanten Abnahme der Toxizität durch kombinierte Exposition mit $n\text{TiO}_2$ und Phenanthren.

Konstante Phenanthren-Konzentrationen bei steigenden $n\text{TiO}_2$ Konzentrationen

Abb. 4.27 zeigt eine Zusammenfassung von zwei Nematodentests mit konstanten Phenanthrenkonzentrationen ($500 \mu\text{g/l}$) bei ansteigenden $n\text{TiO}_2$ -Konzentrationen.

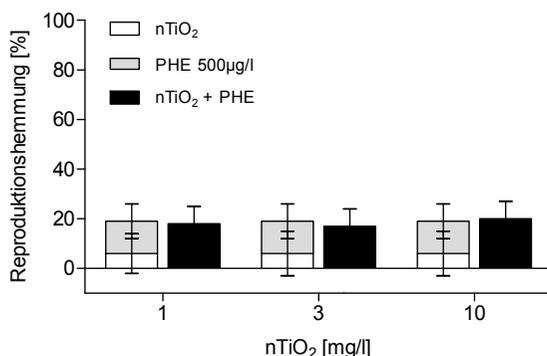


Abb. 4.27 Hemmung der Reproduktion von *C. elegans* durch Phenanthren und $n\text{TiO}_2$ im Dunkeln aus zwei unabhängigen Nematodentests (Mittelwerte und STABW, $n = 8$). Weiße/grau Säulen: addierte Einzelsubstanzeffekte; schwarze Säulen: Effekte durch kombinierte Exposition.

Beide Tests konnten keinen signifikanten Effekt von $n\text{TiO}_2$ auf die Phenanthrentoxizität nachweisen. Es zeigten sich in kombinierter Exposition Tendenzen sowohl zu überadditiven, als auch zu unteradditiven Effekten. Im Mittel entspricht die Reproduktionshemmung der kombinierten Exposition den addierten Einzelsubstanzeffekten, wie Abb. 4.27 verdeutlicht. Demnach konnte für $n\text{TiO}_2$ weder ein Trägereffekt nachgewiesen werden, noch wurde ein hemmender Effekt auf die Wirkung des Phenanthrens gezeigt.

4.3.4 *Cyp-35C1*-Expression als Biomarker für die Verfügbarkeit polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe

Cyp-35C1 wird in *C. elegans* als Biomarker für die Verfügbarkeit polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAKs) verwendet. Die Untersuchung der Expression von *cyp-35C1* diene der Klärung der Fragestellung, ob $n\text{TiO}_2$ die Verfügbarkeit durch Sorption herabsetzt, oder, basierend auf einem Trägerereffekt erhöht.

Induktion von *cyp35c1* durch Phenanthren

Zunächst wurde die Eignung von *cyp-35C1* als Biomarker für die Verfügbarkeit von Phenanthren geprüft. Zu diesem Zweck wurde die Geninduktion von *cyp-35C1* durch Phenanthren (PHE) der Induktion durch Fluoranthren (FLA) gegenübergestellt. Die Inkubation erfolgte jeweils über sechs Stunden.

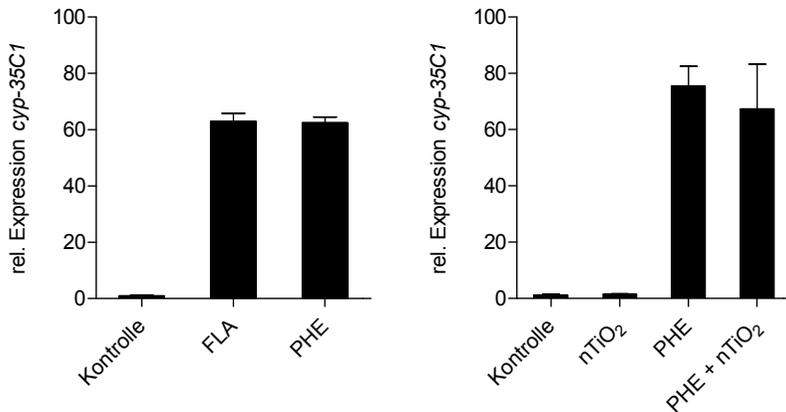


Abb. 4.28 Relative Expression von *cyp-35C1* durch *C. elegans* nach 6-stündiger Exposition; Mittelwert und STABW, 3-fach Bestimmung. Links: Inkubation in Fluoranthren (900 µg/l) und Phenanthren (1000 µg/l), $n = 1$; rechts: Inkubation in Phenanthren (1000 µg/l) und nTiO₂ (10 mg/l) als Einzelsubstanz und in kombinierter Exposition, $n = 3$.

Der Vergleich der Geninduktion durch Fluoranthren und Phenanthren hat gezeigt, dass *cyp-35C1* gleichermaßen gut als Indikator für die Aufnahme von Phenanthren geeignet ist. Wie Abb. 4.28 zeigt rufen beide Fremdstoffe im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine 60-fache Expression des Gens hervor. Die Expression von *cyp-35C1* wurde daher als Biomarker für die Verfügbarkeit von Phenanthren unter Einfluss von nTiO₂ verwendet.

Einfluss von nTiO₂ auf die Geninduktion durch Phenanthren

Zur Bestimmung des Einflusses von nTiO₂ auf die Expression von *cyp-35C1* in *C. elegans* als Reaktion auf Phenanthren wurde der Testorganismen beiden Testsubstanzen gegenüber über sechs Stunden ausgesetzt. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zeigen, dass nTiO₂ keinen signifikanten Einfluss auf die *cyp-35C1* Expression hat. Die Anwesenheit der nTiO₂-Partikel führt zu einer erhöhten Variabilität der Genexpression (vgl. Abb. 4.28, rechts).

Betrachtet man die Ergebnisse des Nematodentests, der mit den Testorganismen nach dieser sechsständigen Inkubation durchgeführt wurde, so beobachtet man auch hier eine geringfügige, aber nicht signifikante Abnahme des Effekts von Phenanthren durch die Anwesenheit von $n\text{TiO}_2$ (siehe Abb. 4.29). Auffällig ist jedoch die geringe Toxizität von Phenanthren nach sechsständiger Inkubation: Bei einer Konzentration von bei 1000 μg Phenanthren/l fällt sie mit einer Reproduktionshemmung von unter 10 % nach sechsständiger Inkubation deutlich geringer aus als nach 96-stündiger Inkubation (40 % Hemmung).

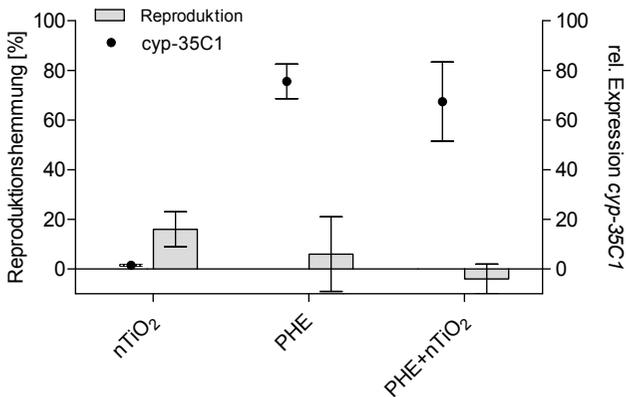


Abb. 4.29 Relative Expression von *cyp-35C1* durch *C. elegans* im Vergleich zu einer Kontrollgruppe und Reproduktionshemmung in % nach 6-stündiger Exposition in Phenanthren (1000 $\mu\text{g}/\text{l}$) und $n\text{TiO}_2$ (10 mg/l) als Einzelsubstanz und in kombinierter Exposition; Mittelwert und STABW, 3-fach Bestimmung, $n = 3$.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl die Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen von $n\text{TiO}_2$ auf Phenanthren in kombinierter Exposition, als auch die Untersuchung der Genexpression von *cyp-35C1* darauf hinweisen, dass $n\text{TiO}_2$ keinen Einfluss auf die Aufnahme und Wirkung von Phenanthren hat. Die ‚Trägererhypothese‘ konnte demnach für diesen Co-Kontaminanten nicht bestätigt werden. Die Tendenzen deuten bei starker Variabilität eher auf eine Abnahme der Verfügbarkeit und der Effekte des Phenanthrens durch die Anwesenheit von $n\text{TiO}_2$ hin.

4.4 Photoaktivierte Effekte von TiO₂ gegenüber *C. elegans*: Chronische Toxizität und akute molekularbiologische Antworten

Titandioxid ist eine photokatalytisch aktive Substanz und hat basierend auf dieser Eigenschaft unter UV-Einwirkung beispielweise antibakterielle Effekte (Maness et al., 1999). Die folgenden Experimente untersuchten den Einfluss von simulierter Sonnenstrahlung auf die Effekte der TiO₂-Materialien gegenüber *C. elegans*. Dazu musste zunächst die Toleranz von *C. elegans* gegenüber der eingesetzten simulierten Sonnenstrahlung (SSR) getestet werden, so dass optimale Testkonditionen festgelegt werden konnten. Anschließend wurde die photokatalytische Aktivität der Testmaterialien unter den gegebenen Testbedingungen bestimmt. In den folgenden Schritten wurden dann die chronischen Effekte der Materialien unter Einfluss von SSR im Nematodentest untersucht und anhand eines Biomarkers geprüft, ob oxidativer Stress der Wirkmechanismus der SSR-induzierten Effekte ist.

4.4.1 Vorversuche zur SSR-Toleranz von *C. elegans*

Zur Entwicklung optimaler Testkonditionen wurde zunächst die Toleranz von *C. elegans* gegenüber der eingesetzten Bestrahlung untersucht. Dabei wurde neben der Strahlungsintensität und –dauer auch der Zeitraum der Bestrahlung im Testverlauf variiert. Die Bestrahlungskonditionen sollten auf der einen Seite die photokatalytische Aktivität der Testmaterialien induzieren, um mögliche Effekte zu erfassen, auf der anderen Seite sollten die Testorganismen möglichst wenig beeinträchtigt werden. Zu diesem Zweck wurden Nematodentests zur Bestimmung der Auswirkung der Bestrahlung auf *C. elegans* durchgeführt.

Optimierung der Bestrahlungsdauer

Im ersten Schritt sollte die optimale Bestrahlungsdauer bestimmt werden. Bei einer Strahlungsintensität von 0,2 W/m² bei 340 nm (Gesamtintensität 231 W/m² bei 300 bis 800 nm) wurden die Würmer ab dem Zeitpunkt t_0 – also unmittelbar nach Teststart - über 30, 60, 120 und 360 Minuten bestrahlt. Bereits bei einer Bestrahlungsdauer von 60 Minuten wurde die Reproduktion gegenüber einer unbestrahlten Kontrollgruppe um 54 % \pm 9 gehemmt (siehe Abb. 4.30). Bestrahlungen von 120 Minuten und länger führten zu einer 100 %igen Hemmung der Reproduktion. Eine Bestrahlungsdauer von 15 und 30 Minuten hatte keine schädigende Wirkung auf Reproduktion, Wachstum und Fertilität von *C. elegans*. Demnach wurde für die Strahlungsdauer für alle folgenden Versuche auf 30 Minuten festgelegt.

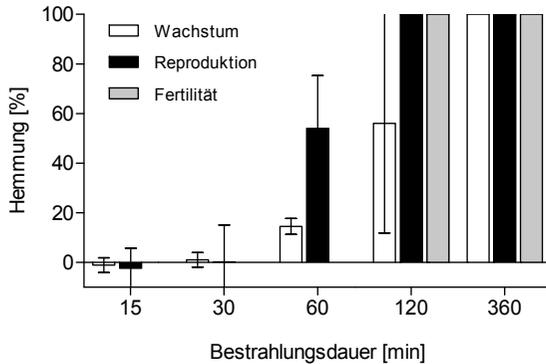


Abb. 4.30 Hemmung von Wachstum, Reproduktion und Fertilität von *C. elegans* durch SSR mit einer Gesamtintensität von 231 W/m^2 bei variierender Bestrahlungsdauer.

Optimierung der Strahlungsintensität

In einem folgenden Test wurde die Strahlungsintensität zwischen $0,2 \text{ W/m}^2$ und $0,25 \text{ W/m}^2$ bei 340 nm zu zwei verschiedenen Bestrahlungszeitpunkten variiert. Die Ergebnisse zeigten eine klare Erhöhung der Reproduktionshemmung von $15 \% \pm 6$ bei $0,2 \text{ W/m}^2$ auf $33 \% \pm 11$ bei $0,25 \text{ W/m}^2$ bei einem Startzeitpunkt der Bestrahlung von t_6 – also sechs Stunden nach Teststart, auch das Wachstum wird bei $0,25 \text{ W/m}^2$ stärker gehemmt (Abb. 4.31 A und B). Die Strahlungsintensität wurde deshalb für alle folgenden Experimente auf $0,2 \text{ W/m}^2$ festgelegt. Insgesamt waren die Hemmungen zum Zeitpunkt t_6 deutlich höher, als zum Zeitpunkt t_0 .

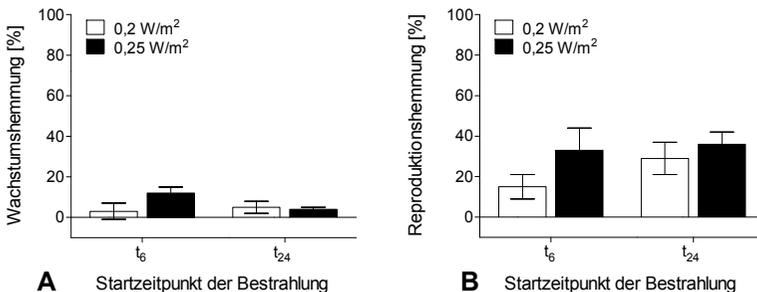


Abb. 4.31 Hemmung des Wachstums (A) und Reproduktion (B) von *C. elegans* durch SSR über 30 Minuten mit variierenden Bestrahlungsintensitäten und Bestrahlungszeitpunkten. $0,2 \text{ W/m}^2$ entspricht einer Gesamtintensität von 231 W/m^2 , $0,25 \text{ W/m}^2$ entspricht 288 W/m^2 .

Bestimmung des Bestrahlungszeitpunktes

Wie die bisherigen Ergebnisse zeigten, hat auch der Zeitraum der Bestrahlung einen Einfluss auf die hemmende Wirkung der SSR. Im folgenden Experiment wurde deshalb die Schadwirkung der SSR in Abhängigkeit vom Bestrahlungszeitraum untersucht.

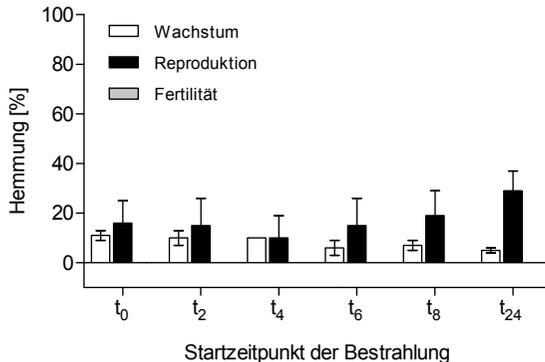


Abb. 4.32 Hemmung von Wachstum, Reproduktion und Fertilität von *C. elegans* durch SSR (30 min, 231 W/m²) zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Bei einer Strahlungsintensität von 0,2 W/m² und einer Dauer von 30 Minuten wurde der Startzeitpunkt der Bestrahlung zwischen 0 und 24 Stunden variiert. In diesem Zeitraum durchläuft *C. elegans* die vier Juvenilstadien L1 bis L4. Anschließend geht er in das Adultenstadium über und ein Einfluss auf seine Entwicklung ist nicht mehr zu erwarten. Aus diesem Grund sollte die Bestrahlung innerhalb der ersten 24 Stunden des Testverlaufs stattfinden. Wie Abb. 4.32 zeigt, war die Hemmung der Reproduktion mit 10 % ± 3 durch eine Bestrahlung ab dem Zeitpunkt t_4 , also 4 Stunden nach Teststart am geringsten. Auch die Abweichungen zwischen den vier Replikaten erreichten hier ihr Minimum. Eine naheliegende Erklärung für dieses Phänomen ist mit dem natürlichen Entwicklungszyklus von *C. elegans* verbunden: Erfolgt die Bestrahlung der Testorganismen während, oder kurz nach einer Häutung, werden die inneren Organe von *C. elegans* der Strahlung vermutlich verstärkt ausgesetzt, da eine junge Kutikula weniger Schutz bietet.

Die Strahlungsbedingungen wurden basierend auf den Auswertungen der Voruntersuchungen zur SSR-Toleranz von *C. elegans* wie folgt festgelegt und für alle folgenden Tests angewandt:

Strahlungsintensität: 0,2 W/m² bei 340 nm, das entspricht 231 W/m² bei 300 bis 800 nm

Strahlungsdauer: 30 min

Strahlungszeitpunkt: t_4 , d.h. 4 Stunden nach Teststart

4.4.2 Photokatalytische Aktivität der TiO₂-Materialien

Zur Bestimmung der photokatalytischen Aktivität der Partikel wurde der Abbau von Methyleneblau unter Bestrahlung mit simulierter Sonnenstrahlung bestimmt. Die Messungen konnten zeigen, dass nTiO₂ unter Einfluss von SSR eine sehr hohe photokatalytische Aktivität aufweist: Über einen Zeitraum von 120 Minuten wurde bis zu 54,7 % ± 3,3 des Methyleneblaus abgebaut. Das nicht nanopartikuläre Referenzmaterial zeigte hingegen eine deutlich geringere photokatalytische Aktivität, maximal 29,7 % ± 1 des Methyleneblaus wurden durch bTiO₂ abgebaut.

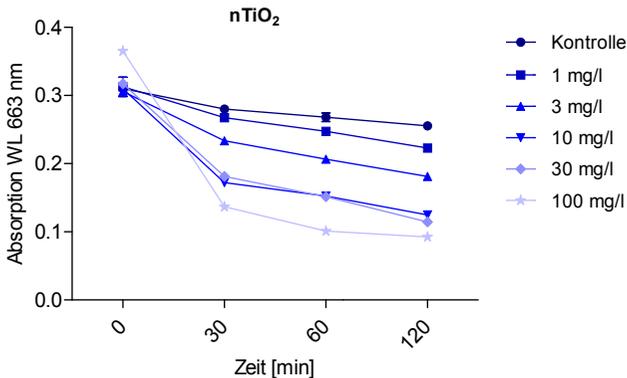


Abb. 4.33 Methyleneblau-Abbau durch nTiO₂ (P25) unter Bestrahlung mit SSR bei 231 W/m² (300-800 nm)

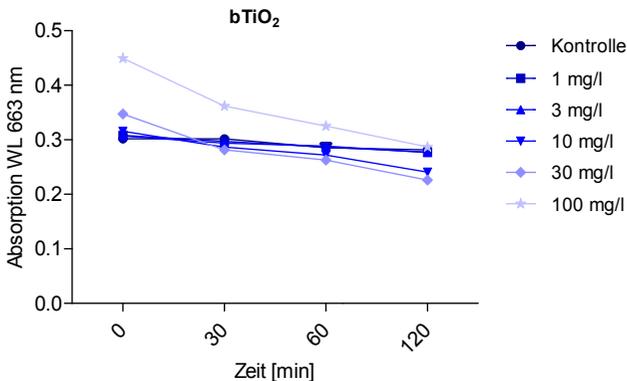


Abb. 4.34 Methyleneblau-Abbau durch bTiO₂ (NM100) unter Bestrahlung mit SSR bei 231 W/m² (300-800 nm).

Betrachtet man die Absorptionen der Suspensionen bei einer Wellenlänge von 663 nm – das entspricht dem Absorptionsmaximum der Methylenblau-TiO₂-Suspensionen- in Abb. 4.33 und Abb. 4.34, so fällt auf, dass die Ausgangsabsorption zum Zeitpunkt t_0 abhängig ist von der Art und Konzentration des TiO₂-Materials. Je höher die Konzentration, desto höher ist die Absorption, wobei bTiO₂ einen stärkeren Einfluss auf die Absorption von Methylenblau hat. Aus diesem Grund wurde für alle Suspensionen die prozentuale Abbaurate von Methylenblau in Relation zu der jeweiligen Ausgangsfluoreszenz der Suspension berechnet.

Tab. 4.1 fasst die prozentualen Abbauraten von Methylenblau nach Blindwertkorrektur (0 mg/l TiO₂) unter den Versuchsbedingungen im Nematodentest, also nach 30 Minuten SSR bei 231W/m² zusammen. Bei der höchsten Testkonzentration von 100 mg/l katalysiert nTiO₂ unter Testbedingungen einen Abbau von 47,1 %, während bTiO₂ einen Abbau von 20,0 % des Methylenblaus über einen Zeitraum von 30 min induziert. Im Dunkeln zeigen beide Materialien keine Methylenblau-degradierenden Effekte.

Tab. 4.11 Prozentualer Abbau von Methylenblau (MB) durch nTiO₂ (P25) und bTiO₂ (NM100) als Indikator für die photokatalytische Aktivität. Bestrahlung: 30 Minuten bei 231 W/m².

Konz.	Abbau MB [%]	
	nTiO ₂	bTiO ₂
1 mg/l	4,8	3,6
3 mg/l	14,0	4,1
10 mg/l	28,0	7,5
30 mg/l	33,5	15,7
100 mg/l	47,1	20,0

Des Weiteren wurde untersucht, ob die photokatalytische Aktivität der TiO₂-Materialien über den Zeitraum der Bestrahlung hinaus anhält. Dazu wurden die Partikel bei einer Konzentration von 100 mg/l zunächst 30 bzw. 90 Minuten bestrahlt. Unmittelbar im Anschluss an die Bestrahlung wurde Methylenblau zugefügt, und die Absorption wurde gegen eine unbestrahlte Kontrolle gemessen. Weder für nTiO₂, noch für bTiO₂ konnte durch Vorbestrahlung der Partikel eine photokatalytische Aktivität induziert werden. Die photokatalytische Aktivität der Partikel ist demnach nur durch simultane Bestrahlung hervorzurufen und ausschließlich zum Zeitpunkt der Bestrahlung wirksam.

4.4.3 Einfluss simulierter Sonnenstrahlung auf die toxischen Effekte von nTiO₂ und bTiO₂

Die photokatalytische Aktivität der TiO₂-Materialien wird verursacht durch die Bildung radikaler Sauerstoffspezies, die schädigend auf Organismen einwirken können. Somit müssten SSR exponierte Organismen - abhängig von ihrer UV-Durchlässigkeit - unterschiedlich stark beeinflusst werden. Eine durch nTiO₂ vermittelte Bildung von

zellschädigenden Sauerstoffradikalen in *C. elegans* ist angesichts der starken Akkumulation des Materials im Darm der Testorganismen und der Transparenz der Würmer zu erwarten. Ein Einfluss von UV-Strahlung auf die Toxizität von $n\text{TiO}_2$ ist daher anzunehmen. Im Nematodentest wurde die Hemmung von Wachstum, Reproduktion und Fertilität durch $n\text{TiO}_2$ unter Bestrahlung mit SSR bestimmt. Als Negativkontrolle diente dabei stets eine SSR-Kontrolle, d.h. eine Kontrollgruppe ohne TiO_2 , die jedoch unter den gleichen Bedingungen wie die TiO_2 -Testgruppen bestrahlt wurde. Zur Überprüfung der SSR-Effekte wurde immer auch eine Dunkel-Kontrollgruppe mitgeführt, die nicht bestrahlt wurde. Die aufgeführten Hemmungen beziehen sich jeweils auf die SSR-Kontrolle.

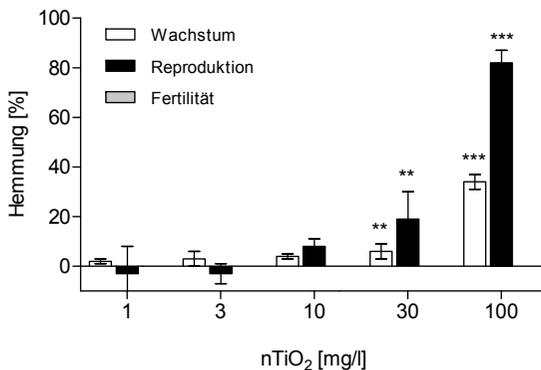


Abb. 4.35 Effekte von $n\text{TiO}_2$ auf Wachstum, Reproduktion und Fertilität von *C. elegans* unter Einfluss von Bestrahlung, Mittelwerte der Hemmungen und Standardabweichung, $n=4$. SSR: 231 W/m^2 bei 300-800 nm für 30 Minuten, 4 h nach Inkubationsstart; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ nach einfaktorieller ANOVA mit Post-hoc-Test Dunnett.

Abb. 4.35 macht deutlich, dass $n\text{TiO}_2$ unter SSR sowohl die Reproduktion, als auch das Wachstum ab Konzentrationen von 30 mg/l signifikant hemmt mit $p < 0,01$ für 30 mg/l und $p < 0,001$ für 100 mg/l. Wie ein Vergleich von Dunkel- und SSR-Behandlung in Abb. 4.36 deutlich macht, führt die Bestrahlung mit SSR zu einer Erhöhung der Reproduktionshemmung durch $n\text{TiO}_2$: Bei 100 mg/l steigt die Reproduktionshemmung signifikant von $45 \% \pm 3$ im Dunkeln auf $82 \% \pm 5$ unter SSR-Einfluss ($p < 0,001$). Auch die Wachstumshemmung steigt durch Bestrahlung bei 100 mg/l um Faktor 2. Die photokatalytische Aktivität von $n\text{TiO}_2$, die als prozentualer Abbau von Methylenblau gemessen wurde (Tab. 4.11), liegt bei dieser Konzentration bei 47 %. Bei 10 und 30 mg/l und einer entsprechenden photokatalytischen Aktivität von 28 bzw. 33 % ist dieser toxizitätssteigernde Effekt hingegen nicht zu beobachten.

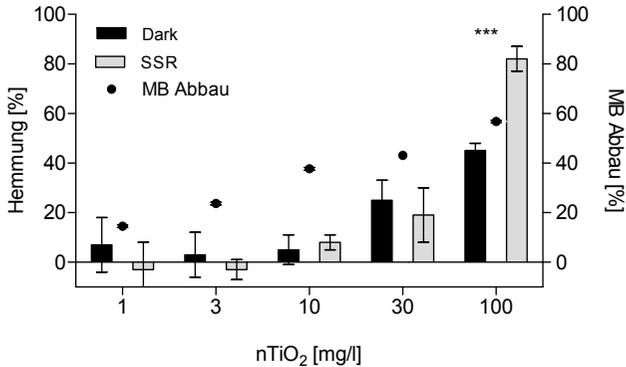


Abb. 4.36 Hemmung der Reproduktion von *C. elegans* durch nTiO₂ in Abhängigkeit der Bestrahlung (mittlere Hemmung und STABW, $n = 4$), dargestellt als Säulen und photokatalytische Aktivität als Methylenblau Abbau nach 30 Minuten Bestrahlung bei 231 W/m² bei 300-800 nm, dargestellt als schwarze Punkte ($n = 3$, mittlerer Abbau in % und STABW; ***: $p=0,001$ in Bezug auf die nicht bestrahlte Behandlung bei gleicher Konzentration nach einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni Multiple Comparison Test).

Die nicht nanopartikuläre Referenzsubstanz bTiO₂ zeigte im Dunkeln bis zu einer Konzentration von 100 mg/l keine Effekte auf *C. elegans*. Auch unter Einfluss simulierter Sonnenstrahlung hat bTiO₂ bis zur höchsten gemessenen Konzentration von keine schädigende Wirkung gegenüber *C. elegans*.

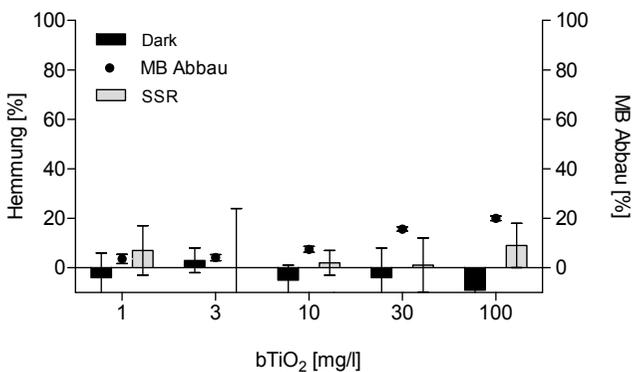


Abb. 4.37 Hemmung der Reproduktion von *C. elegans* durch bTiO₂ in Abhängigkeit der Bestrahlung (mittlere Hemmung und STABW, $n = 4$) dargestellt als Säulen und photokatalytische Aktivität als Methylenblau-Abbau nach 30 Minuten Bestrahlung bei 231 W/m² bei 300-800 nm, dargestellt als schwarze Punkte ($n = 3$, mittlerer Abbau in % und STABW).

Wie gezeigt wurde, ist auch bTiO₂ photokatalytisch aktiv. Bei einer den Testbedingungen entsprechenden Bestrahlung baut das Material bei einer Konzentration von 100 mg/l den Methylenblaugehalt um 20 % ab. Abbauraten von bis zu 33 % zeigten jedoch auch bei nTiO₂ keine photoaktivierte Toxizität.

4.4.4 sod-3-Expression

Superoxidismutasen (SOD) bilden die einzige Enzymgruppe in *C. elegans*, die die sehr reaktive und schädliche Sauerstoffspezies Superoxid (O₂^{·-}) abbauen kann. Bei einer verstärkten Bildung von O₂^{·-} durch nTiO₂ unter Einfluss von simulierter Sonnenstrahlung wurde deshalb eine erhöhte Induktion dieser Gene als Abwehrreaktion erwartet. Die Untersuchung der Expression von *sod-3* als mitochondrial vorliegendes *sod*-Gen sollte daher hier genutzt werden, um die Erhöhung des oxidativen Stresses durch nTiO₂ indirekt nachzuweisen und damit Hinweise über den Wirkmechanismus von nTiO₂ unter Einfluss von Bestrahlung zu gewinnen.

Genexpressionsanalyse

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zeigen jedoch, dass keine signifikante Induktion von *sod-3* erfolgte. Unabhängig von der nTiO₂-Konzentration und den Lichtbedingungen exprimiert *C. elegans sod-3* in vergleichbarem Ausmaß wie die Kontrollgruppen. Bei 100 mg/l kommt es im Dunkeln zu einer geringfügigen Erhöhung der mittleren relativen Expression, die aufgrund der hohen Variabilität jedoch nach einfaktorieller ANOVA mit Post-hoc Test Dunett statistisch nicht signifikant ist.

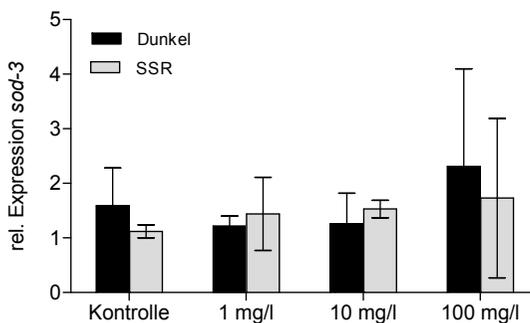


Abb. 4.38 Relative Expression von *sod-3* nach 4,75 h Inkubation in nTiO₂ mit SSR (graue Balken) und ohne SSR (schwarze Balken). Relative Expression gegen *act1*-Expression, Mittelwerte und STABW, n = 3. Bestrahlung: 30 Minuten bei 231 W/m² bei 300-800 nm 4 h nach Teststart.

sod3:gfp-Stamm

Zur Beobachtung der Expression von *sod-3* wurde zudem ein transgener Stamm von *C. elegans* herangezogen, der mit *sod-3* gleichzeitig *gfp* exprimiert. Über die Fluoreszenz der transgenen Organismen, ausgelöst durch das gebildete grün-fluoreszierende-Protein, konnte die Bildung von SOD-3 zu unterschiedlichen Zeitpunkten verfolgt werden. Vorexperimente haben jedoch wiederholt gezeigt, dass die Fluoreszenz bereits bei nicht behandelten Organismen sehr variabel ist.

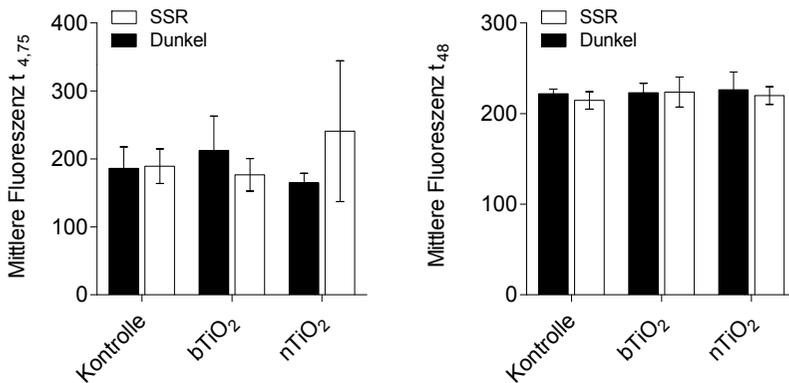


Abb. 4.39 Mittlere Fluoreszenz der transgenen *sod3:gfp* Würmer nach Exposition gegenüber *bTiO₂* und *nTiO₂* über 4 Stunden (links) bzw. 48 Stunden (rechts). Schwarze Balken: ohne SSR; weiße Balken: SSR über 30 min im Anschluss an die Exposition. Ergebnisse dargestellt als mittlere Grauwerte der gesamten Organismen, $n = 20$.

Zur Quantifizierung der Fluoreszenz wurden die Würmer nach 4,75 Stunden, also entsprechend der Inkubationszeit der Genexpressionsanalyse, nach 24 und 48 Stunden Exposition gegenüber *bTiO₂* und *nTiO₂* mit einer konstanten Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Die mittlere Fluoreszenz der gesamten Organismen wurde quantifiziert. Wie Abb. 4.39 zeigt konnten mit Hilfe dieser Methode ebenfalls keine signifikanten Effekte der *TiO₂*-Materialien auf die Expression von *sod-3* nachgewiesen werden.

4.4.5 Inestinale Autofluoreszenz

Als weiterer Parameter für die Induktion von oxidativem Stress durch *nTiO₂* wurde die intestinale Autofluoreszenz von *C. elegans* untersucht. Sie wird verursacht durch die Akkumulation von Lipofuscin in den intestinalen Zellen, das durch Protein- und Lipidperoxidation entsteht und als Indikator für oxidativen Stress angesehen wird (siehe Kapitel 3.10).

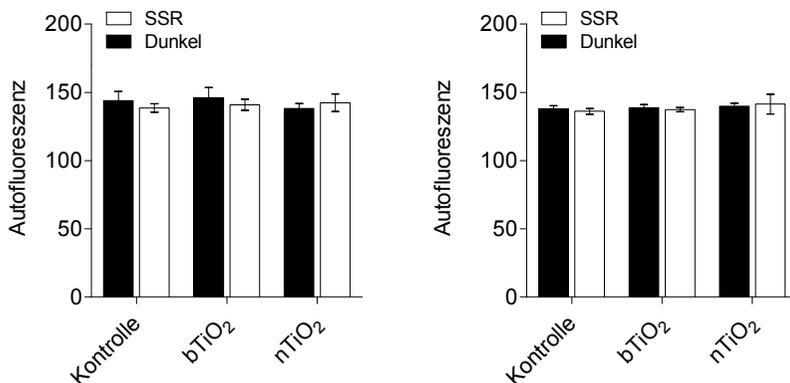


Abb. 4.40 Autofluoreszenz von *C. elegans* bei 525 nm nach 72 Stunden Inkubation mit $n\text{TiO}_2$ bzw. $b\text{TiO}_2$ im Dunkeln (schwarze Balken) und unter SSR-Einfluss (weiße Balken) in zwei unabhängig durchgeführten Tests, dargestellt als mittlere Grauwerte der gesamten Organismen und STABW, $n = 20$.

Die intestinale Autofluoreszenz von *C. elegans* bei 525 nm wurde durch die Exposition gegenüber TiO_2 , unabhängig von der Art des Materials, nicht beeinflusst. Auch die Bestrahlung mit SSR induzierte keine Erhöhung der Autofluoreszenz der Testorganismen.

4.5 Einfluss von $n\text{TiO}_2$ auf die Phototoxizität von Phenanthren in kombinierter Exposition

Basierend auf seinen photokatalytischen Eigenschaften kann nanopartikuläres TiO_2 in der Umwelt potentiell nicht nur direkt auf exponierte Organismen einwirken, sondern auch indirekt, zum Beispiel über die Photomodifikation von Co-Kontaminanten auf die Lebensbedingungen Einfluss nehmen. Im Folgenden wurde daher der Einfluss von simulierter Sonnenstrahlung auf die Effekt von $n\text{TiO}_2$ und Phenanthren in kombinierter Exposition untersucht.

Dabei wurden nach Diamond (2003) folgende photoaktivierte Wirkmechanismen unterschieden:

1. Photomodifikation

Durch Photodegradationsprozesse werden Verbindungen chemisch modifiziert. In der Regel kommt es dabei unter Anwesenheit von Sauerstoff zu einer Oxidation des Kontaminanten, beispielsweise durch Anlagerung einer Hydroxylgruppe und es

entstehen polarere und damit häufig bioverfügbarere Verbindungen, die unter Umständen toxischer sind.

2. Photosensitivierung

Durch UV-Exposition der phototoxischen Verbindungen gehen diese in einen angeregten Zustand über. In einem Organismus können sie so zum einen über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) direkt oxidativen Stress auslösen, zum anderen können sie durch Reaktion mit Biomakromolekülen Radikalbildung oder Ladungstransfer auslösen und dadurch indirekt oxidativen Stress auslösen.

Durch die Anwesenheit von TiO_2 können diese Effekte verstärkt werden. Unter UV-Exposition bilden TiO_2 -Partikel im angeregten Zustand positive Elektronenlücken und freie Elektronen aus (vgl. Kapitel 2.2) und können dadurch die beschriebenen photoaktivierte Prozesse fördern. Die folgenden Experimente untersuchen diese Prozesse. Zur Differenzierung der Wirkmechanismen 1 und 2 wurden folgende Versuchsaufbauten gewählt:

1. Vorbestrahlung: Die Kontaminanten $n\text{TiO}_2$ und Phenanthren wurden unmittelbar vor Teststart ohne Testorganismen über einen Zeitraum von 30 Minuten bestrahlt. Beobachtete Effekte können ausschließlich auf Photomodifikationsprozesse zurückgeführt werden, die auch nach der Bestrahlung noch Wirksamkeit haben.

2. Simultane Bestrahlung: Die Testorganismen wurden zeitgleich mit der Exposition der Kontaminanten bestrahlt, und zwar vier Stunden nach Teststart über einen Zeitraum von 30 Minuten. Beobachtete Effekte sind auf eine Kombination aus Photosensitivierung und auf Photomodifikation zurückzuführen.

Zur Einordnung der Effekte unter Einfluss simulierter Sonnenstrahlung wurde zunächst die Phototoxizität von Phenanthren bestimmt.

Abb. 4.41 zeigt einen Vergleich der Reproduktionshemmung durch Phenanthren auf *C. elegans* im Dunkeln und unter SSR-Einwirkung und belegt eine ausgeprägte Phototoxizität des Phenanthrens. In Bezug auf die Reproduktion ist die Phototoxizität von Phenanthren gegenüber der Toxizität im Dunkeln ab einer Konzentration von $1000 \mu\text{g/l}$ signifikant erhöht ($p < 0,001$). Der EC_{50} für Reproduktion liegt dabei im Dunkeln bei $1230 \mu\text{g/l}$ und unter SSR-Einfluss bei $522 \mu\text{g/l}$.

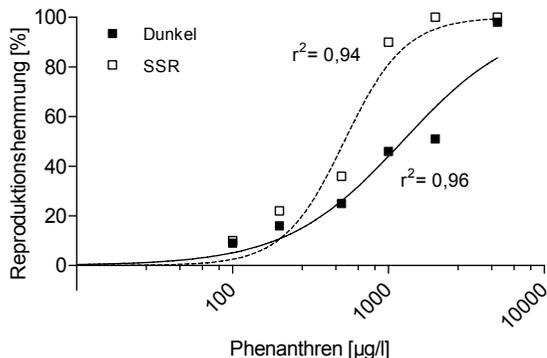


Abb. 4.41 Reproduktionshemmung von *C. elegans* durch Phenanthren in Abhängigkeit der Bestrahlung. Weiße Quadrate: mit SSR (231 W/m² bei 300-800 nm für 30 Minuten, 4 h nach Inkubationsstart); schwarze Quadrate: Dunkelheit. Nicht lineare Regression nach Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Kommt es durch Vorbestrahlung zu einer Photomodifikation von Phenanthren durch nTiO₂?

Für dieses Experiment wurden die Testansätze mit nTiO₂, PHE und nTiO₂ + PHE unmittelbar vor dem Teststart ohne Testorganismen über 30 Minuten bestrahlt. Die Strahlungsintensität entsprach dabei mit 231 W/m² bei 300 bis 800 nm den Testbedingungen aller durchgeführten Nematodentests. Die Vorbestrahlung von Phenanthren als Einzelsubstanz führte gegenüber den Effekten von nicht bestrahltem Phenanthren zu einer Abnahme der Toxizität: Die Reproduktionshemmung sank unter SSR-Einfluss von 11 % im Dunkeln auf 0 %. Die Verminderung der Toxizität der Verbindung kann unterschiedlich Ursachen haben:

- 1) Die Bestrahlung von Phenanthren führt zu einer Photodegradation des Schadstoffes, es entsteht eine weniger toxische Verbindung.
- 2) Die Bestrahlung führt zu einer beschleunigten Verdunstung des Kontaminanten aus dem Testsystem, es kommt zu einer Abnahme der Phenanthrenkonzentrationen (vgl. mit Kapitel 0 zum Verhalten von Phenanthren im Testsystem).

In Kombination mit nTiO₂, in Abb. 4.42 dargestellt als schwarze Balken, kommt es bei einer Konzentration von 10 mg/l zu einer gesteigerten Toxizität gegenüber den addierten Einzelsubstanzeffekten (weiße und gepunktete Balken). Die Hemmung der kombinierten Exposition unter SSR entspricht dabei mit 18 % in etwa den addierten Einzelsubstanzeffekten im Dunkeln von 20 % (9 % für nTiO₂ + 11 % für PHE siehe Abb. 4.27). Bei nTiO₂-Konzentrationen von 1 bzw. 3 mg tritt in kombinierter Exposition mit PHE nach Vorbestrahlung keine Hemmung auf. Die toxische Wirkung der beiden Substanzen, die im

Dunkeln bei etwa 20 % liegt (Abb. 4.27), wird demnach unter Einfluss von SSR abgebaut. Auch Phenanthren als Einzelsubstanz zeigt nach der Vorbestrahlung keine Toxizität mehr.

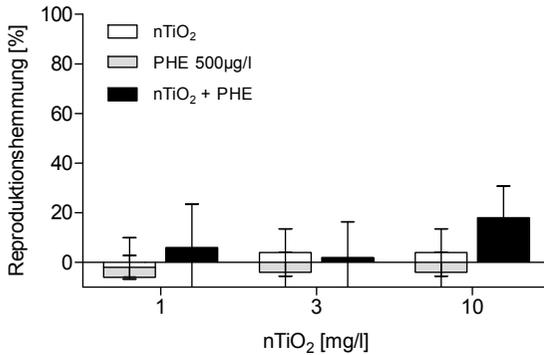


Abb. 4.42 Hemmung der Reproduktion von *C. elegans* durch Phenanthren und nTiO₂ nach Vorbestrahlung der Kontaminanten mit SSR (231 W/m² bei 300-800 nm für 30 Minuten, 4 h nach Inkubationsstart); Mittelwerte und STABW, n = 4. Weiße/grau Säulen: addierte Einzelsubstanzeffekte; schwarze Säulen: Effekte durch kombinierte Exposition.

Führt simultane Bestrahlung zu einer Photosensitivierung von Phenanthren durch nTiO₂?

Zur Untersuchung des Einflusses simultaner Bestrahlung wurde *C. elegans* den Testsubstanzen als Einzelsubstanzen und als Mischsubstanzen exponiert und vier Stunden nach Teststart über 30 Minuten mit SSR bestrahlt. Wie bereits im Vortest zur Untersuchung der photoaktivierten Toxizität von Phenanthren (Abb. 4.41) beobachtet wurde, steigt die Toxizität von Phenanthren durch simultane Bestrahlung. Bei der kombinierten Exposition konnte durch simultane Bestrahlung jedoch für alle nTiO₂-Konzentrationen eine leichte Verminderung der Toxizität gegenüber den addierten Einzelsubstanzeffekten hervorgerufen werden, (Abb. 4.43).

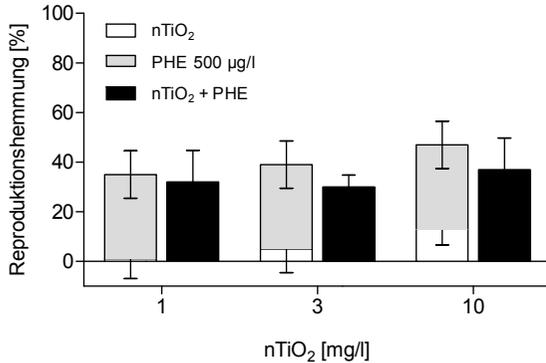


Abb. 4.43 Hemmung der Reproduktion von *C. elegans* durch Phenanthren und $n\text{TiO}_2$ unter simultaner Bestrahlung mit SSR (231 W/m^2 bei 300-800 nm für 30 Minuten, 4 h nach Inkubationsstart); Mittelwerte und STABW, $n=4$. Weiße/grau Säulen: addierte Einzelsubstanzeffekte; schwarze Säulen: Effekte durch kombinierte Exposition.

4.6 Tabellarische Zusammenfassung der Testparameter und Ergebnisse

Die folgende Tabelle fasst alle angewandten Parameter und Methoden zusammen und bietet einen Überblick über die relevanten Ergebnisse.

Tab. 4.12 Zusammenfassung der Testparameter und der beobachteten Effekte; k.A.: keine Angaben.

	Bulk-TiO ₂	Nano-TiO ₂
Charakterisierung durch DLS		
Sekundäre Partikelgröße in H ₂ O	296 - 357 nm	253 - 892 nm
Sekundäre Partikelgröße in M9	306 - 1509 nm	292 - 1474 nm
Agglomeration im Testverlauf	k.A.	Nein
Zetapotentiale in H ₂ O	-48,42 mV	-25,35 mV
Zetapotentiale in M9	-25,39 mV	-28,54 mV
Charakterisierung durch REM		
Sekundäre Partikelgröße in H ₂ O	351 - 514 nm	249 - 897 nm
Sekundäre Partikelgröße in M9	309 - 702 nm	303 - 504 nm
Agglomeration im Testverlauf	k.A.	Nein
Sorption an <i>E.coli</i>	Ja	Ja
Chronische Toxizität		
Hemmung Reproduktion	Nein	LOEC 10 mg/l
Hemmung Wachstum	Nein	LOEC 30 mg/l
Hemmung Fertilität	Nein	Nein
Ingestion der Partikel	Ja	Ja
Hemmung der Nahrungsaufnahme	Ja	Ja
Agglomeration im Darm bei Langzeitexposition über 10 Tage	Nein	Ja
Photoaktivierte Effekte		
Chronische Toxizität		
Hemmung Reproduktion	Nein	Ab 30 mg/l
Hemmung Wachstum	Nein	Ab 30 mg/l
Hemmung Fertilität	Nein	Nein
Indikatoren für oxidativen Stress		
<i>sod-3</i> -Genexpression	k.A.	Keine Effekte
<i>sod-3:gfp</i> -Fluoreszenz	Keine Effekte	Keine Effekte
Intestinale Autofluoreszenz	Keine Effekte	Keine Effekte
Wechselwirkungen mit Phenanthren		
Verfügbarkeit: <i>cyp-35C1</i> -Expression	k.A.	Keine Effekte
Einfluss Toxizität im Dunkeln	k.A.	Keine Effekte
Photoaktivierte Effekte		
Einfluss durch Vorbestrahlung	k.A.	Vermindert Photodegradation
Einfluss durch simultane Bestrahlung	k.A.	Vermindert Phototoxizität

5 Diskussion

Bisherige Kenntnisse der ökotoxikologischen Wirkung von Nanomaterialien sind unzureichend für eine verlässliche Risikobewertung der neuartigen Kontaminanten, wobei sich das Verständnis für deren Wirkung in den stark bedrohten, voraussichtlich hochbelasteten Lebensräumen aquatischer Sedimente besonders lückenhaft darstellt (Gottschalk et al., 2009).

Ziel der vorliegenden Studie war deshalb die Bestimmung der chronischen Toxizität von nanopartikulärem Titandioxid im Vergleich zu einem Bulkmaterial vergleichbarer Materialeigenschaften. Als Testorganismus diente der benthisch und terrestrisch verbreitete Nematode *Caenorhabditis elegans*. Ein besonderer Schwerpunkt der Experimente lag auf der Untersuchung des Einflusses simulierter Sonnenstrahlung auf die Wirkung der photokatalytisch aktiven Materialien. Zudem wurde die Wechselwirkung der Titandioxid-Nanopartikel mit Phenanthren als Co-Kontaminanten im Testsystem untersucht.

Wie in Kapitel 2.8 dargestellt wurde, zeigen bisher gewonnene Daten zur Wirkung von Nanomaterialien gegenüber exponierten Organismen wenig Übereinstimmung. Ergebnisse vergleichbarer Studien zeigen enorme Abweichungen der Effekte, die in der Regel auf eine mangelnde Standardisierung der Testmethoden zurückzuführen sind. Eine Standardisierung der Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel-Suspensionen ist dabei offenbar von besonders großer Relevanz.

Ausgangspunkt der folgenden Diskussion ist daher eine Darstellung und Diskussion der gewählten Suspendierungsmethode, der eine Interpretation der Bedeutung der beobachteten Partikel-Eigenschaften im Testsystem für den Testorganismus *C. elegans* folgt. Die anschließende Diskussion der beobachteten Effekte der TiO₂-Materialien auf *C. elegans* stellt dar, welche Wirkmechanismen basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen in Betracht kommen. Abschließend wird die Umweltrelevanz der Kontamination aquatischer Sedimente durch Titandioxid-Nanopartikel beleuchtet.

5.1 Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel-Suspensionen

5.1.1 Methodentwicklung und Einordnung der sekundären Partikelgrößen nach DLS

Die Herstellung der Partikelsuspensionen erfolgte durch Dispergierung der Partikel nach einer festgelegten SOP durch Rühren der Partikel in Reinstwasser und eine anschließende kurzzeitige Ultraschallbadbehandlung. Der pH-Wert lag dabei stabil bei pH 6,75 in Wasser und bei pH 7 in M9-Medium. Die Ergebnisse der Charakterisierung haben gezeigt, dass

dabei weder für nTiO₂, noch für bTiO₂ eine vollständige Dispergierung der Primärpartikel erreicht wurde. Bereits die Polydispersitätsindizes (PDI) der analysierten Proben machen deutlich, dass keine monodisperse Verteilung der Partikel vorlag. Der PDI ist eine dimensionslose Zahl zwischen 0 und 1 und wird als Maß der Polydispersität der gemessenen Suspension herangezogen. Die Quadratwurzel des PDI entspricht dabei der relativen Standardabweichung der Verteilung. Je höher der PDI, desto breiter ist demnach die Streuung der Partikelgrößen und die Abweichung von einer Gauß'sche Verteilung der Partikel. Die PDIs der hier charakterisierten TiO₂-Suspensionen liegen zwischen 0,34 und 0,67 und deuten damit auf sehr polydisperse Verteilungen hin.

Mittlere Partikelgrößen lagen nach DLS-Analyse vor Einbringung in das Testsystem für nTiO₂ bei etwa 250 bis 900 nm, wobei ein konzentrationsabhängiger Anstieg beobachtet wurde. Für bTiO₂ zeigten sich die Suspensionen bei mittleren Partikelgrößen von 300 bis 360 nm deutlich stabiler. Eine Überführung der wässrigen Suspensionen in das Nematoden-Nährmedium M9 führte den DLS-Messungen zufolge zu einer verstärkten Agglomeration der Partikel mit konzentrationsabhängigen mittleren Partikelgrößen von 300 bis 1500 nm für beide Testmaterialien. Folgt man der weitläufig genutzten Definition, nach der Nanopartikel in mindestens zwei Dimensionen einen Durchmesser von 100 nm nicht überschreiten dürfen (ASTM, 2006), so werden die Partikelagglomerate des hier untersuchten Nanomaterials nicht mehr als Nanopartikel eingeordnet. An diesem Punkt stellt sich daher die Frage, ob mögliche auftretende Effekte überhaupt als nanospezifische Effekte eingeordnet werden können. Literaturhinweisen zufolge ist die Frage nach der Notwendigkeit Nanopartikel in biologischen Testsystemen hochdispergiert zu untersuchen, Bestandteil einer anhaltenden Debatte (Crane et al., 2008). Wie Handy et al. (2012) in seinen praktischen Empfehlungen zur ökotoxikologischen Untersuchung von Nanomaterialien erläutert, ist die Dispergierung bis zu einem gewissen Grad häufig eine Voraussetzung für die akkurate Dosierung von Nanomaterialien in den Testmedien. Eine Überprüfung der Präzision der Dosierung durch die hier eingesetzte Dispergierungsmethode zeigte, dass diese mit einer mittleren Abweichung der TiO₂-Konzentrationen bei maximal 9,5 % liegt. Die Genauigkeit der Dosierung wurde durch Messung der Titankonzentrationen in den Testsystemen mittels ICP-OES bestimmt, wobei der Schwankungsbereich bereits alle analytischen Fehler mit einbezieht.

Da bekannte Dispergierungsmethoden jedoch, abgesehen von der präzisen Kontrollierbarkeit der Testkonditionen, viele Unsicherheiten und Nachteile bergen, sollte hier die Methodenwahl sorgfältig abgewogen werden. Eine besonders gängige Methode zur Herstellung gleichmäßig dispergierter Suspensionen ist beispielsweise der Einsatz dispergierender Substanzen. Synthetische Dispergiermittel, wie Tetrahydrofuran, bringen jedoch häufig zusätzliche Toxizitäten mit und führen dadurch zu einer vermeintlichen

Erhöhung der beobachteten Effekte (Henry et al., 2007). Ein solch drastischer Einfluss auf die Wirkung eines Nanomaterials macht die Interpretation der Ergebnisse in Anbetracht möglicher Mischtoxizitäten oder anderer Wechselwirkungen unmöglich, weshalb auf den Einsatz bewusst verzichtet wurde.

In Anbetracht dessen wird häufig der Einsatz natürlicher Dispergiemittel wie Huminsäuren oder auch Proteinen empfohlen, da diese zum einen auch bei der Exposition unter natürlichen Konditionen vorliegen können und zum anderen in der Regel nicht schädigend auf die Organismen wirken. Dennoch können sie einen massiven Einfluss auf die Funktionalität und Wirkung von Nanomaterialien haben: In den meisten Fällen lagern sich natürliche Dispergiemittel an die Oberfläche der Nanomaterialien an, wodurch die Suspensionen stabiler werden. Das Coating, was diese natürlichen Dispergiemittel ausbilden, ändert jedoch die Oberflächeneigenschaften der Partikel. Ein lipophiles Coating kann beispielsweise die Membrangängigkeit eines Nanomaterials hervorrufen, wodurch es zu einer starken Beeinflussung der Bioverfügbarkeit kommen kann. Zum anderen sind natürliche Dispergiemittel häufig nicht biologisch inert und können im Testsystem biodegradiert werden, wodurch eine Kontrolle der Testbedingungen sehr schwierig wird (Handy et al., 2012). Humin- und Fulvinsäuren sind zudem bekannt, die Toxizität industriell gefertigter Nanopartikel herabzusetzen (Fabrega et al., 2009). Ein Einsatz von Dispergiemitteln wurde deshalb grundsätzlich ausgeschlossen.

Eine Alternative zum Einsatz von Dispergiemitteln ist eine Suspendierung durch mechanische oder physikalische Verfahren, wie Rühren oder Ultraschallbehandlung. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, reicht eine kurzzeitige Ultraschallbadbehandlung nicht aus, um stabile, hochdispergierte Suspensionen herzustellen. Eine Verwendung direkter Ultraschallbehandlung durch Ultraschallsonden zur effizienteren Suspendierung der Nanopartikel-Suspensionen wurde hier jedoch ebenfalls bewusst ausgeschlossen. Im Vergleich zu Ultraschallbadbehandlungen tauchen Ultraschallsonden direkt in die Suspensionen ein und erzeugen dabei Energieeinträge, die jegliche umweltrelevante Energieexpositionen mit großer Wahrscheinlichkeit überschreiten. Zudem konnten Betts et al. (2013) in einer Studie beobachten, dass eine direkte Ultraschallbehandlung mit Ultraschallsonden zu einer Kontamination der Suspensionen mit Aluminium führen kann. Bei einem Energieeintrag von 75 W wurden in den dispergierten TiO_2 -Partikeln - bezogen auf ihre Masse - bis zu 8 % Aluminium nachgewiesen. Diese Kontamination beeinflusste das Zetapotential der Partikel und wirkte sich erkennbar auf ihr Agglomerationsverhalten aus. Zudem könnte der Aluminiumanteil der Partikel ebenfalls eine toxische Wirkung auf Testorganismen haben, wie Pobofílová et al. (2013) sie beispielsweise für Aluminiumoxid Nanopartikel nachweisen konnten. Eine Dispergierung der TiO_2 -Partikel mit Hilfe einer

Ultraschallsonde könnte ihre Effekte demnach sowohl direkt über die chemischen Partikeleigenschaften, als auch indirekt über Partikelladung und –größe modifizieren.

Eine Verlängerung der Ultraschalldauer zur Verbesserung der Dispergierung wurde ebenfalls vermieden, da diese den Energieeintrag wiederum stark erhöhen würde und zudem nachweislich auch zu einer Reaggregation der Partikel führen kann (Delgado and Matijević, 1991).

Eine verbesserte Dispergierung geht demnach unabhängig von der Wahl der Methode mit einer Manipulation der ursprünglichen Testmaterialien einher und wurde aus diesem Grund explizit nicht angestrebt. Bezüglich der sekundären Partikelgrößen wurde zudem beobachtet, dass die Überführung der Suspensionen in das Nährmedium M9 mit einer weiteren Agglomeration der Partikel verbunden war. Dieses Phänomen erklärt sich durch die erhöhte Ionenstärke des Mediums nach Überführung in das Nährmedium M9. M9 hat eine Gesamtionenstärke von 443 mmol/l und kritische Koagulations-Konzentrationen (CCC) liegen bei Fullerenen für NaCl beispielsweise bei 120 mM, für CaCl₂ bei nur 4,8 mM (Chen and Elimelech, 2006). Bei unbeschichteten Hämatit-Nanopartikeln (Fe₂O₃) wurde eine kritische Koagulations-Konzentration für NaCl von 20 mM nachgewiesen (Chen et al., 2006). Die starke Agglomeration der TiO₂-Partikel, die in dieser Studie beobachtet wurde, entspricht demnach den Erwartungen.

Auch für nTiO₂ konnte bereits gezeigt werden, dass besonders divalente Ionen, wie im M9-Medium Mg²⁺ und SO₄²⁻, in höheren Konzentrationen aber auch monovalente Ionen, zu einer verstärkten Agglomeration der Partikel führen (Ottofuelling et al., 2011). Es ist davon auszugehen, dass diese durch das Nährmedium induzierte Agglomeration unabhängig von dem Grad der Dispergierung der Partikel in der wässrigen Stocksuspension eingetreten wäre. Eine verbesserte Suspendierung der Partikel in den wässrigen Stocksuspensionen hätte die Partikelgrößenverteilung im Testsystem demnach vermutlich nicht beeinflusst. Eine direkte Suspendierung der Partikel im Nährmedium wurde nicht durchgeführt, da auch hier zusätzliche Einflüsse auftreten. So berichtet Handy et al. (2012) beispielsweise von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Ultraschallbehandlung von Nanopartikel-suspensionen in Anwesenheit von organischem Kohlenstoff. Das Testmedium für *C. elegans* enthält neben einer Vielzahl anorganischer Ionen auch Cholesterol und ist damit auch anfällig für einen solchen Effekt.

5.1.2 Bedeutung der sekundären Partikelgrößen für den Modellorganismus

C. elegans

Um die Ergebnisse der DLS-Analyse zu validieren, wurden die Partikelgrößen auch visuell ermittelt mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie. Die Auswertung der elektronen-

mikroskopischen Aufnahmen von Partikelsuspensionen bestätigte die beobachteten Größenbereiche der Agglomerate in Wasser, wobei hier abweichend zu den DLS-Ergebnissen keine klare Abhängigkeit von der Konzentration beobachtet wurde. Eine verstärkte Agglomeration der Partikel durch Überführung in M9-Medium konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Für die nTiO₂-Suspensionen zeigten sich vielmehr in M9-Medium mit etwa 300 bis 500 nm geringere Partikelgrößen als in H₂O mit 350 bis 900 nm (Tab. 4.4). Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen der DLS-Messungen, wo sich in M9-Medium in Abhängigkeit von der Konzentration mittlere Partikelgrößen von etwa 300 nm bis 1500 nm zeigten. Die beobachteten Unterschiede könnten methodisch bedingt sein: Die Filter der M9-Suspensionen wurden im Gegensatz zu den Filtern der H₂O-Suspensionen mit Wasser gespült, um die Salze von der Filteroberfläche abzuspuhlen. Die Salze des Mediums kristallisieren sonst aus und bedecken die Partikel, wodurch eine Auswertung der Partikelgröße unmöglich wird. Das Abspülen kann jedoch bereits zu einer Auftrennung großer, lockerer nTiO₂-Agglomerate führen, die durch DLS-Messung als ein Partikel identifiziert werden, auf dem Filter jedoch nach dem Waschvorgang als mehrere kleinere Partikel vorliegen. Bei derart lockerer Agglomeration ist jedoch anzunehmen, dass eine Lösung solcher Agglomerate auch im toxikologischen Testsystem, beispielsweise durch Verdauungsenzyme im Darmtrakt der Testorganismen oder durch einfache mechanische Einwirkung bei der Partikelaufnahme möglich ist. Zudem ist das Milieu im Darmlumen von *C. elegans* kontrolliert und weicht vom Umgebungsmedium ab: So oszilliert der pH-Wert einer Studie von Pfeiffer et al. (2008) zufolge beispielsweise im Rhythmus der Defäkation etwa von 7,6 bis 6,2 und schwankt damit um den pH-Wert des Umgebungsmediums von 7.

Als toxikologisch relevante Partikelgröße bezüglich der Wirkung der Partikel und der zellulären Aufnahme der Partikel wäre demnach die elektronenmikroskopisch gewonnene Größe zu betrachten. Bezüglich der oralen Aufnahme der Partikel durch den Testorganismus müsste die Größe der im Medium vorliegenden Agglomerate nach DLS-Messung herangezogen werden.

Beide Methoden erlauben jedoch folgende Schlußfolgerung: Mit mittleren Partikelgrößen von etwa 300 bis 500 nm nach REM-Auswertung und 300 bis 1500 nm nach DLS-Messung fallen die agglomerierten Nanopartikel insgesamt ins Größenspektrum aufgenommener Nahrungspartikel der Testorganismen, die besonders Bakterien einer Größe von ein bis zwei Mikrometern als natürlich Nahrungspartikel aufnehmen. Fang-Yen et al. (2009) zeigten eine effiziente Aufnahme von Partikeln im Größenbereich von 500 bis 3000 nm. Größere Partikel werden offenbar nicht aufgenommen, während kleinere zwar zum Großteil auch aufgenommen werden, jedoch auch vor Aufnahme in den Mitteldarm offenbar selektiv durch zwei exkretorische Kanäle am Pharynx ausgeschieden werden können.

5.1.3 Zusammenhang zwischen Zetapotentialen und dem Agglomerationsverhalten der Partikel im Testsystem

Titandioxid weist eine geladene Oberfläche auf, an der es in salzhaltigen Medien zu einer Anlagerung von Ionen kommt. Es bilden sich sogenannte elektrische Doppelschichten aus Anionen und Kationen aus. Wie Abb. 3.6 darstellt beschreibt das Zetapotential die Ladung an der Abscherschicht eines Partikels. Die Abscherschicht ist genau die Grenzschicht zwischen Ionen, die sich elektrostatisch fest an den geladenen Partikel anlagern und mit ihm durch das Umgebungsmedium diffundieren, und solchen, die zwar durch den Partikel und dessen Ladungsumfeld angezogen werden, bei Bewegung des Partikels jedoch im Medium zurückbleiben. Das Zetapotential wird deshalb neben der Ladung des Partikels selbst von der Ionenstärke und der Ionenzusammensetzung des Umgebungsmediums bestimmt und hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten von Partikeln.

Für die nTiO₂-Suspensionen wurden in dieser Studie unabhängig vom Medium kontante Zetapotentiale von etwa -25 mV nachgewiesen, wobei die Überführung in das Nährmedium zu einer Agglomeration der Partikel führte. Für bTiO₂ wurde durch die Überführung von Wasser in M9-Medium jedoch ein Anstieg des Zetapotentials von -48 mV auf -25 mV beobachtet, der ebenfalls mit einer Agglomeration der Partikel zu vergleichbaren Partikelgrößen einherging. Im Folgenden werden mögliche Wirkmechanismen diskutiert.

Theoretischer Hintergrund

Nach DLVO⁵-Theorie (Derjaguin and Landau, 1941, Verwey and Overbeek, 1948) werden die Interaktionen zwischen Partikeln durch zwei gegensätzliche Kräfte angetrieben: Elektrostatische Abstoßungskräfte wirken Anziehungskräften wie z.B. van der Waals-Kräften entgegen. Erhöht man die Ionenstärke eines Mediums, so lagern sich verstärkt Ionen an die Oberfläche der Partikel an. Nähert sich das Zetapotential dadurch dem isoelektrischen Punkt, also einer Nettoladung von 0 mV an der Abscherschicht, so sind die elektrostatischen Abstoßungseffekte zwischen den Partikeln aufgehoben. Zudem werden die elektrischen Doppelschichten der Partikel durch die enge Ionenbindung kompakter und dadurch dünner. Die Partikel können sich nun stärker einander annähern, wodurch Anziehungskräfte wirksam werden, die über geringe Distanzen wirken, wie z.B. die genannten van der Waals-Kräfte. Beide Effekte unterstützen dadurch eine zunehmende Agglomeration der Partikel (Handy et al., 2008). Der isoelektrische Punkt von P25 (nTiO₂) liegt Ottofuelling et al. (2011) zufolge bei pH 5. Mit einem pH-Wert von 6,75 in Wasser und pH 7 in M9-Medium müssten die in dieser Studie verwendeten Suspensionen daher ein negatives Zetapotential aufweisen.

⁵ DLVO-Theorie nach Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek beschreibt die Stabilität dispergierter Teilchen in Suspension und basiert auf zwei interpartikulären Interaktionen: Abstoßung durch elektrostatische Effekte und Anziehung durch van-der-Waals-Kräfte.

Verhalten der TiO₂-Materialien in Wasser und M9-Medium

Nach den durchgeführten Messungen der vorliegenden Studie bestätigten sich diese theoretischen Annahmen für das untersuchte Bulkmaterial NM100: In wässriger Suspension wies bTiO₂ ein Zetapotential von -48,42 mV, das nach Überführung in das ionenhaltige M9-Medium auf -28,54 mV sinkt und sich damit dem isoelektrischen Punkt nähert. Diese Erhöhung des Zetapotentials geht den Vorhersagen entsprechend mit einer verstärkten Agglomeration der Partikel einher. Die mittleren Partikelgrößen stiegen nach DLS-Messung von 300 bis 360 nm in Wasser auf 300 bis 1500 nm im Nährmedium.

Anders verhält es sich für das nTiO₂ P25: Hier hat der Ionengehalt des Mediums entgegen der Erwartung keinen Einfluss auf das Zetapotential, das unabhängig vom Medium bei -25 mV liegt. Die bTiO₂-Partikel sind demnach in Wasser deutlich stärker negativ polarisiert als die nTiO₂-Partikel, was zunächst die deutlich stabileren wässrigen bTiO₂-Suspensionen erklärt: bTiO₂ hat einen mittleren PDI von 0,21 und Partikelgrößen von 296 bis 357 nm, während nTiO₂ mit 253 bis 892 nm und einem mittleren PDI von 0,42 in Wasser deutlich höhere sekundäre Partikelgrößen und polydispersere Verteilungen aufweist. In Bezug auf die Partikelanzahl pro Agglomerat entspricht das für bTiO₂ bei einer gemessenen Primärpartikelgröße von 90 bis 230 nm maximal 2-3 Primärpartikeln und für nTiO₂ mit einer Primärpartikelgröße von 21 nm etwa 12 bis 42 Primärpartikeln pro Agglomerat. Aufgrund des negativeren Zetapotentials kommt es bei bTiO₂ also zu stärkeren Abstoßungseffekten, die die Suspensionen stärker stabilisieren.

Agglomeration von nTiO₂ in M9-Medium bei konstantem Zetapotential durch SO₄²⁻-Ionen?

Überraschend bleibt dabei die Beobachtung, dass die Ionenstärke des Mediums keine Veränderung des Zetapotentials der nTiO₂-Partikel hervorrief. Trotz des konstanten Zetapotentials von -25 mV agglomerierten die nTiO₂-Partikel durch Zugabe des Nährmediums sehr stark: Ähnlich wie für bTiO₂ stieg die Agglomeratgröße für nTiO₂ in M9 auf etwa 300 bis 1500 nm.

Eine ausführliche Studie zum Verhalten von P25, dem hier getesteten nTiO₂, in Abhängigkeit vom Ionengehalt des Wassers von Ottouellling et al. (2011) beschreibt ähnliche Effekte im Zusammenhang mit Sulfat-Ionen. Die Autoren beobachteten für Na⁺, Ca²⁺ und Cl⁻ klare Korrelationen zwischen den Zetapotentialen der nTiO₂-Partikel und der Stabilität der entsprechenden Suspension, genau wie dies nach DLVO-Theorie erwartet wurde. Für SO₄²⁻ zeigte sich jedoch ein völlig anderes Bild: Das Zetapotential von P25 verhielt sich völlig unbeeinflusst von der Konzentration der Sulfat-Ionen im Medium und wurde ausschließlich durch den pH-Wert gesteuert. Trotz der konstanten Zetapotentiale führte die Anwesenheit von Sulfat bei Konzentrationen von 0,01 bis 10 mM jedoch zu einer starken Agglomeration der P25 Partikel: Etwa 80 % des stabilen TiO₂ aus der wässrigen Suspension aggregierte

und fiel aus dem Überstand aus. Da die herrschenden elektrostatischen Kräfte unverändert bei -30 mV lagen und abstoßend wirkten, muss die Ursache der Agglomeration durch das Zufügen von SO_4^{2-} -Ionen in der Wirkung anderer Kräfte liegen.

Im Medium der vorliegenden Studie – M9 – liegt Sulfat mit einer Konzentration von 1 mM. Dieser Konzentrationsbereich entspricht genau dem wirksamen Bereich der Testkonzentrationen, die Ottofuelling et al. untersuchten. Die durch Ottofuelling und Coautoren beschriebenen Effekte, die vom erwarteten Verhalten nach DLVO abweichen, können also auch für die Agglomeration von nTiO_2 in M9-Medium der Auslöser sein. Den Autoren zufolge könnten hier möglicherweise Brückeneffekte eine Rolle spielen, wie sie für Hämatit-Nanopartikel beobachtet werden konnten (Chen et al., 2006). Chen et al. beziehen die von ihnen beobachteten Brückeneffekte jedoch auf eine Komplexierung von Ca^{2+} -Ionen durch das Alginat-Coating der untersuchten Hämatitpartikel. Für das unbeschichtete P25 wird diese Erklärung daher weder auf die Ergebnisse der Studie von Ottofuelling et al., noch auf die der vorliegenden Studie zutreffen. Der Mechanismus der Sulfat-Partikel-Wechselwirkung bleibt damit vorerst ungeklärt. Weiterhin bleibt es angesichts des derzeitigen Wissensstands Spekulation, weshalb diese Effekte für nTiO_2 , nicht aber für bTiO_2 wirksam sind, wo es erwartungsgemäß zu einer Erhöhung des Zetapotentials durch M9-Medium kam. Möglicherweise handelt es sich um einen Effekt, der von der Größe der suspendierten Partikel abhängt.

Insgesamt hat die Charakterisierung der TiO_2 -Suspensionen gezeigt, dass beide Materialien in Abhängigkeit der Konzentration im Testsystem zu einer sekundären Partikelgröße von 300 bis 1500 nm agglomerieren, wobei sich die Mechanismen dabei möglicherweise unterscheiden. Die Ladung an der Abscherschicht liegt für beide Materialien im Testmedium bei etwa -25 mV.

5.2 Effekte von TiO_2 -Partikeln in Abhängigkeit ihrer primären und sekundären Partikelgröße

Zur Bestimmung der nanospezifischen Effekte von Titandioxidpartikeln wurde die Toxizität zweier Materialien mit unterschiedlicher Partikelgröße durch den Nematodenkontakttest bestimmt. Das nanopartikuläre TiO_2 P25 mit einer Primärpartikelgröße von 21 nm wurde dabei einem Bulkmaterial, NM100, mit einer Primärpartikelgrößenverteilung von 90 bis 230 nm gegenüber gestellt. Wie die Charakterisierung der Materialien gezeigt hat, agglomerierten beide Materialien im Testsystem in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer mittleren sekundären Partikelgröße von etwa 300 bis 1500 nm. Trotz vergleichbarer Agglomeratgröße stellte sich das nanopartikuläre TiO_2 -Material gegenüber dem Bulkmaterial als toxischer dar. Durch eine Untersuchung der Ingestion der TiO_2 -Partikel und deren

Einfluss auf die Nahrungsaufnahme des Organismus konnten mögliche Wirkmechanismen der beobachteten Toxizität des Nanomaterials aufgedeckt werden, die den folgenden Kapiteln erläutert werden.

5.2.1 Toxizität der TiO₂-Materialien gegenüber *C. elegans*

Die toxikologischen Untersuchungen wiesen eine signifikante chronische Schädigung von nTiO₂ gegenüber *C. elegans* mit einem LOEC von 10 mg/l und einem NOEC von 3 mg/l nach. Das Bulkmaterial bTiO₂ zeigte dagegen bis zur höchsten getesteten Konzentration von 100 mg/l keine signifikanten Effekte auf den Testorganismus *C. elegans*. Weder Wachstum, noch Reproduktion und Fertilität wurden durch das Bulkmaterial beeinträchtigt. Es gibt weitere Studien die daraufhin deuten, dass nanopartikuläres TiO₂ höhere Toxizitäten aufweist als entsprechende Bulkmaterialien: Für den Nematoden *Caenorhabditis elegans* beobachteten Wang et al. (2009) nach 24-stündiger Exposition lethale Effektkonzentrationen (LC₅₀-Werte) von 80 mg/l für nano-TiO₂, während der LC₅₀ von bulk-TiO₂ bei 136 mg/l lag. Die beobachteten Toxizitäten liegen damit deutlich über den beobachteten Effekten der vorliegenden Studie mit EC₅₀-Werten für Wachstum und Reproduktion von über 100 mg/l, was durch den Einsatz unterschiedlicher Testmedien verursacht sein könnte: Die Autoren nutzten im Gegensatz zu der vorliegenden Studie in ihrem akuten Test vollentsalztes Wasser als Medium. Damit unterscheiden sich die physikalisch-chemischen Bedingungen in den Testsystemen der beiden Studien sehr deutlich. Auch Untersuchungen von Roh et al. (2010) an *C. elegans* deuten auf eine Abhängigkeit der Toxizität von TiO₂-Materialien von ihrer Primärpartikelgröße hin.

Da beide Materialien der Partikelcharakterisierung zufolge eine vergleichbare sekundäre Partikelgröße aufweisen, kann dieser Parameter hier nicht ausschlaggebend sein für die Schädigung der Partikel. Betrachtet man die größenunabhängigen Materialeigenschaften der beiden TiO₂-Partikel, so unterscheiden sich diese bezüglich ihrer kristallinen Zusammensetzung: NM100 besteht zu 98 % aus Anatas, während P25 zu 86 % aus Anatas besteht und zusätzlich einen Rutilanteil von 14 % hat. Rutil ist gegenüber Anatas lipophiler, wodurch es nach DLVO-Theorie größere Agglomerate ausbildet. Eine Untersuchung von Clément et al. (2013) bestätigt genau diese Erwartung. Zudem zeigten die Autoren, dass reines Rutil gegenüber Cladoceren, Algen, Rotiferen und Pflanzen eine geringere Toxizität hat als Anatas. Bezüglich der Materialeigenschaften müsste daher das untersuchte nTiO₂ ganz im Gegensatz zu den Beobachtungen der vorliegenden Studie eine geringere Toxizität haben als das bTiO₂. Der Unterschied in den Effekten kann somit nur auf die Größe der Primärpartikel und die damit verbundenen Eigenschaften der beiden Testsubstanzen zurückgeführt werden.

5.2.2 Bedeutung der Ingestion und Akkumulation der Partikel für ihre Toxizität

Um festzustellen, ob der ausgeprägte Unterschied in den Effekten schlichtweg durch eine partikelgrößenbedingte Verfügbarkeit zurückzuführen ist, wurde die orale Aufnahme der beiden Partikelarten durch den *C. elegans* untersucht. Sowohl stereo- als auch lichtmikroskopische Aufnahmen der Testorganismen nach Exposition gegenüber den Testmaterialien konnten zeigen, dass beide Materialien in das Darmlumen von *C. elegans* aufgenommen wurden. Eine Untersuchung des energiedispersiven Röntgenspektrums am Elektronenmikroskop lieferte auch den elementaren Nachweis für die Akkumulation der Partikel im Darm. Die orale Aufnahme der TiO₂-Materialien über den Pharynx in den Mittel- und Enddarm von *C. elegans* entspricht den Erwartungen: Mit Partikelgrößen im Testsystem von etwa 300 bis 1500 nm fallen die Agglomerate beider Materialien in den Größenbereich bevorzugter Nahrungspartikel von *C. elegans* (Fang-Yen et al., 2009).

Beeinflusst wurde die Aufnahme dabei offenbar von der Anwesenheit von *E. coli* als Nahrungspartikel im Nährmedium. Eine Exposition ohne *E. coli*-Bakterien im Medium führte bereits nach wenigen Stunden zu einer Aufnahme beider Materialien, die dabei teilweise den gesamten Darmtrakt der Organismen ausfüllten. Nach Exposition unter Anwesenheit der Bakterien waren in der Regel nur Teile des Darmtrakts ausgefüllt. Die anorganischen Partikel wurden also entweder in geringerem Ausmaß aufgenommen, als in Abwesenheit der Nahrungspartikel, oder schneller wieder ausgeschieden.

Im Vergleich der beiden Testmaterialien fiel nach Langzeitexposition über einen Zeitraum von zehn Tagen auf, dass sich das Verhalten der Partikel im Darmlumen deutlich unterscheidet: nTiO₂ agglomerierte im Darm von *C. elegans* zu sehr kompakten Agglomeraten mit einer Größe von bis zu 130 µm. Der Umfang des Darms wurde durch diese in Bezug auf die Körpergröße des Wurms enorm großen Partikel sichtlich ausgeweitet. Die bTiO₂-Partikel lagen hingegen auch nach 10-tägiger Exposition im Darm von *C. elegans* als fein verteilte Agglomerate vor, die rein optisch beurteilt in ihrer Größe etwa den Ausgangsagglomeraten in der Testsuspension von maximal 1,5 µm entsprachen.

5.2.3 Einfluss der TiO₂-Partikel auf die Nahrungsaufnahme von *C. elegans*

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine derartig starke Akkumulation von TiO₂ im Darm der Organismen die Nahrungsaufnahme hemmt und so eine Schädigung hervorruft. Die beobachtete Akkumulation der nTiO₂-Partikel im Darm müsste die Aufnahmekapazität von *C. elegans* für *E. coli*-Bakterien als Nahrungspartikel vermindern. Eine folglich verringerte Aufnahme von Nährstoffen würde bei langfristigem Auftreten zu Mangelerscheinungen führen, die Ursache für die beobachtete Hemmung der Reproduktion und des Wachstums der Testorganismen sein könnte.

Zur Untersuchung der Nahrungsaufnahme wurden die Testorganismen zunächst über unterschiedliche Zeiträume gegenüber den TiO₂-Materialien exponiert. Anschließend wurden fluoreszierende Mikropartikel einer Größe von 0,84 µm zugefügt, die Nahrungspartikel simulierten. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten und länger wurde die Aufnahme dieser Partikel fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass sowohl nTiO₂, als auch bTiO₂ einen hemmenden Einfluss auf die Nahrungsaufnahme von *C. elegans* haben: Nach einer Exposition von *C. elegans* gegenüber den TiO₂-Materialien ohne *E. coli*-Bakterien konnte beobachtet werden, dass der gesamte gastrointestinale Trakt, unabhängig von der Art des Testmaterials, durch TiO₂-Agglomerate blockiert war. Die Mikropartikel konnten nur im Pharynx der Testorganismen nachgewiesen werden. Nach Avery and Thomas (1997) benötigt *C. elegans* für die Defäkation des gesamten Darminhalts in der Regel nur etwa 45 bis 50 Sekunden. Demzufolge hätten nach zehn Minuten bereits mehrere vollständige Defäkationen stattgefunden haben müssen, wodurch eine Aufnahme der im Pharynx akkumulierten Nahrungspartikel in den Mitteldarm von *C. elegans* erfolgt wäre. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten müssten TiO₂-Partikel und Mikropartikel dann gleichermaßen im Darm sichtbar sein. Schlussfolgerung dieser Beobachtung ist, dass weder n- noch bTiO₂ in dieser agglomerierten Form effektiv ausgeschieden werden können, wodurch sie die weitere Aufnahme von Nahrungspartikeln unterbinden. Auch nach Inkubationszeiten von bis zu 60 Minuten wurden noch einige vollständig blockierte Organismen beobachtet.

In Anwesenheit von *E. coli* bei der Exposition gegenüber den TiO₂-Materialien verhielt es sich anders. Gegenüber der Kontrollgruppe ohne Exposition gegenüber TiO₂, deren Verdauungstrakte nach bereits zehn Minuten fast komplett mit Mikropartikeln gefüllt waren, hatten die TiO₂-exponierten Organismen gleichermaßen TiO₂-Agglomerate und Mikropartikel im Darm. Durch die Anwesenheit der Bakterien kam es offenbar nicht zu einer kompletten Blockierung des Darmtraktes durch die TiO₂-Partikel. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass hier sowohl die Aufnahme als auch die Ausscheidung der TiO₂-Partikel erfolgte. Erst durch eine Defäkation wird eine erneute Partikelaufnahme möglich, die hier durch die Aufnahme der Mikropartikel in den Darm bestätigt wurde.

Nach Kiyama et al. (2012) selektiert *C. elegans* seine Nahrung neben der physikalischen Selektion über die Größe der Partikel auch chemisch. *E. coli* Bakterien werden der Studie zufolge gegenüber Polystyren-Partikeln bevorzugt aufgenommen, wobei die Oberflächenmodifikation der künstlichen Partikel einen Einfluss auf die Effizienz der Aufnahme hat. *C. elegans* kann den Anteil aufgenommener TiO₂-Partikel also möglicherweise aktiv reduzieren, die Aufnahme jedoch nicht gänzlich verhindern. Im Darmlumen selbst kam es dann jedoch nicht zu einer so starken Agglomeration der Partikel, dass diese zu einer kompletten Hemmung der Defäkation führten. Die Anwesenheit der Bakterien kann die

Agglomeration der Nanopartikel im Darm offenbar einschränken, wodurch die Defäkation der Agglomerate erleichtert wurde. Ursache einer solchen Stabilisierung der Nanopartikel könnten beispielsweise Exopolymere sein, die von den Bakterien ausgeschieden werden und sich an die polarisierte Oberfläche der Nanopartikel anlagern, wodurch diese weniger untereinander und mit der Zelloberfläche der intestinalen Zellen agglomerieren. Ähnliches zeigten Horst et al. (2010) für *Pseudomonas aeruginosa*: TiO₂-Nanopartikel sorbierten an der Oberfläche der Bakterien, wodurch die Stabilität der Dispersion erhöht wurde. Die Autoren vermuten deshalb einen starken Einfluss von Bakterien auf den Transport der Nanopartikel in der Umwelt. Die Tatsache, dass Bakterien zudem die Nahrungsaufnahme durch *C.elegans* fördern (Ahlf et al., 2009, Offermann et al., 2009) deutet daraufhin, dass entsprechende Effekte hier bedonders stark zur Wirkung kommen werden.

Eine Auswirkung anwesender Bakterien auf den Transport von Nanopartikeln wird auch durch die Agglomeration der TiO₂-Partikel an *E.coli* gestützt, die in dieser Studie beobachtet wurde. Die Hypothese, dass die ingestierten TiO₂-Partikel durch die Biosorption an *E.coli* besser ausgeschieden werden können, erklärt auch die Beobachtungen der Akkumulation der Partikel im Gastrointestinaltrakt, die im vorherigen Kapitel diskutiert wurde.

Die simultane Exposition gegenüber TiO₂ und *E. coli* führt deshalb zwar nicht zu einer vollständigen Blockierung der Nahrungsaufnahme von *C. elegans*, aber dennoch zu einer Minderung ihrer Effizienz. Diese eingeschränkte Effizienz der Nahrungsaufnahme wird den Ergebnissen zufolge durch beide Materialien verursacht. Ein Effekt, der sich zumindest bei bTiO₂ nicht auf die chronischen Schadwirkungen des Materials auswirkt, da hier Reproduktion und Wachstum im Nematodentest nicht gehemmt werden. Nach der Beobachtung des unterschiedlichen Agglomerationsverhaltens der Partikel im Darm des Nematoden ist jedoch anzunehmen, dass sich das Ausmaß der Hemmung der Nahrungsaufnahme für die Materialien unterscheidet, was auch die Unterschiede in den chronischen Effekte der Materialien erklären würde.

Ursache der erhöhten Toxizität von nTiO₂ gegenüber bTiO₂ könnte auch eine unterschiedlich ausgeprägte Koagulation der Partikel mit *E. coli* im Nährmedium sein. Eine starke Verklumpung der Partikel mit den Bakterien könnte zur Bildung von Agglomerate mit einem Durchmesser über 3 µm führen, die *C. elegans* nicht mehr aufnehmen kann (Fang-Yen et al., 2009). Die Verfügbarkeit der Bakterien als Nahrungspartikel für *C. elegans* würde damit enorm sinken. Ähnliches konnten Gratzter and Ahlf (2001) für Tonbestandteile eines OECD Standardsediments im Sediment-Kontakt-Test mit *C. elegans* beobachten, insbesondere für Kaolinit. Kaolinit hat wie viele Tone eine hohe Kationenaustausch-Kapazität und koagulierte stark mit *E. coli* in der Testsuspension. Die Autoren führten die Hemmung des Wachstums und der Fertilität von *C. elegans* durch Kaolinit auf das Koagulationsverhalten des Materials zurück. Elektronenmikroskopische Bilder dieser Studie belegten eine Koagulation der TiO₂-

Partikel in Suspension mit den *E. coli*-Bakterien. Sowohl nTiO₂-, als auch bTiO₂-Partikel hefteten sich dabei eng an die Oberflächen der Bakterien an. Insgesamt schien es jedoch nicht zu einer Ausbildung besonders großer Agglomerate aus Titandioxidpartikeln und Bakterien gekommen zu sein. Vielmehr trat eine Anlagerung einzelner TiO₂-Agglomerate an die Bakterien auf. Vermutlich nehmen die Testorganismen die Kontaminanten dadurch zusammen mit *E. coli* als Nahrungspartikeln auf. Eine derartige Agglomeration müsste die chemische Selektion der Nahrungspartikel durch *C. elegans*, wie Kiyama et al. (2012) sie beschrieben hat, erschweren. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung deuten jedoch auf eine unspezifische Aufnahme der angebotenen Partikel hin.

5.2.4 Mögliche Wirkmechanismen der nTiO₂-Partikel

Das Verhalten der beiden TiO₂-Materialien im Testsystem ist demnach abgesehen von geringfügigen Unterschieden im Agglomerationsverhalten der Partikel im Darmlumen des Organismus vergleichbar: Beide Partikel liegen mit mittleren sekundären Partikelgrößen von 300 bis 1500 nm im Testsystem vor und werden von *C. elegans* sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von *E. coli* oral aufgenommen. Durch eine teilweise bis komplette Blockierung des Darmlumens, die in Abwesenheit von *E. coli* ausgeprägter ist, hemmen die Partikel hier die Effizienz der Nahrungsaufnahme. In Gegenwart von *E. coli* binden sowohl nTiO₂ als auch bTiO₂ binden an die Oberfläche Bakterien und werden vermutlich zusammen mit den Nahrungspartikeln aufgenommen.

Da das Verhalten von Nano- und Bulkmaterial vergleichbar ist, müssen die toxischen Effekte, die ausschließlich für das Nanomaterial beobachtet wurden, auf nanospezifische Wirkmechanismen zurückzuführen sein. Im Vergleich zu bTiO₂ hat nTiO₂ eine deutlich größere Oberfläche und kann damit, agglomeriert im Darmlumen von *C. elegans*, viel stärker mit den Darmepithelzellen in Kontakt treten. Geht man davon aus, dass nTiO₂ nicht in die Zellen von *C. elegans* aufgenommen wird, so müssen die schädigenden Effekte an der Membran der Zellen wirken. Für Bakterien wurde bereits eine Vielzahl entsprechender Wirkmechanismen durch Nanopartikel beobachtet, die Klaine et al. (2008) zusammenfassten. So können sich Silikon-Nanopartikel beispielsweise in die Phospholipid-Doppelschichten einlagern und so potentiell die Integrität der Membran stören (Jang et al., 2003). Die organisch-beschichteten Silikonpartikel sind jedoch im Gegensatz zu TiO₂ sehr lipophil, was eine Einlagerung in Phospholipidmembranen fördert. Goldnanopartikel hingegen schwächen die Membranen von *E. coli*-Bakterien, wodurch Hitzeschock-Reaktionen ausgelöst werden (Hwang et al., 2007). Ein ähnlicher Effekt wäre auch durch die Wirkung von nTiO₂ an den Membranen des Darmepithels von *C. elegans* möglich, wurde bisher den Kenntnissen der Autorin zufolge jedoch noch nicht untersucht.

Für Coelomocyten des Regenwurms *Eisena fetida* konnten Bigorgne et al. (2012) nach Exposition gegenüber TiO₂-Nanopartikeln eine erhöhte Expression von Metallothionin in Folge der zellulären Aufnahme der Partikel nachweisen. Metallothionine sind in die Detoxifikation von Metallen eingebunden und dienen gleichzeitig der Abwehr von oxidativem Stress. Für *C. elegans* konnte eine entsprechende Erhöhung der Expression des *mtl-1* Gens durch 7 und 20 nm TiO₂-Partikel nicht nachgewiesen werden (Roh et al., 2010). Möglichweise kommt es nur bei einer Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen zu einer Induktion dieser Gene. Roh et al. untersuchten zudem weitere Stress-Antwort-Gene, wie *sod-1* und *ctl-1* als antioxidantische Enzyme, *cyp-35a2* und *gst-1* als Enzyme des Fremdstoffmetabolismus und die Tumorsuppressor bzw. Apoptose-Gene *cep-1* und *ape-1*. Unter allen getesteten Genen reagierte ausschließlich *cyp-35a2* mit einer erhöhten Expression auf die TiO₂-Exposition, wobei dieser Effekt wiederum nur durch die kleineren 7 nm Partikel induziert wurde, nicht hingegen durch die 20 nm Partikel. Das Protein CYP-35A2 ist, wie die gesamte Gruppe der Cytochrom-abhängigen Monooxygenasen, bekannt für seine Beteiligung an der Metabolisierung von Xenobiotika, besonders organischer Substanzen wie z.B. PAKs (Menzel et al., 2001). Die Funktion dieses Proteins im Zusammenhang mit den durch nTiO₂ hervorgerufenen chronischen Schadwirkungen, die Roh et al. beobachtet haben, ist bis heute nicht geklärt. Die Studie belegt jedoch eine Abhängigkeit der Effekte von der primären Partikelgröße der TiO₂-Materialien. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Expression von *cyp-35C1*, einem Verwandten Gen der CYP-Familie, nach Exposition gegenüber nTiO₂-Partikeln einer Größe von 21 nm bestimmt. Das Nanomaterial induzierte hier keinen signifikanten Effekt auf die Monooxygenase CYP-35C1

Bezüglich der beobachteten Reproduktionshemmung ist die Untersuchung der Expression der Vitellogenine *vit-2* und *vit-6* von Bedeutung, die Roh et al. 2010 veröffentlichten. Beide Proteine sind an der Bildung des Eidotters beteiligt und können den Erfolg der Reproduktion der Organismen beeinflussen. Die Autoren konnten jedoch keine Änderung der Genexpression nach TiO₂-Exposition beobachten, weshalb dieser Wirkmechanismus als Erklärung für die beobachtete Reproduktionshemmung zunächst nicht in Betracht gezogen wird.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, der der Reproduktionshemmung zu Grunde liegen könnte, wurde von Pluskota et al. (2009) für Silikat-Nanopartikel vorgeschlagen. Die Autoren fanden hier eine drastische Erhöhung der Anzahl von Hermaphroditen, die aufgrund degenerierter Reproduktionsorgane ihre Eier nicht mehr ablegen konnten, wodurch sich die Anzahl der Nachkommen reduzierte. Dieses sogenannte „Bag of worms“-Phänomen tritt mit zunehmendem Alter auch bei unbehandelten Vertretern des Wildtyps von *C. elegans* auf und führt zu einem Schlüpfen der Nachkommen im Körper der Hermaphroditen. Verursacht wird dieses Defizit durch eine Fehlentwicklung der Vulva oder eine eingeschränkte Funktionalität

der Muskeln der Vulva. Entsprechende *Bag-of worms*-Effekte, die über das übliche Maß beim Wildtyp hinausgingen, wurden in der vorliegenden Studie für nTiO₂ jedoch nicht beobachtet und werden daher nicht als möglicher Wirkmechanismus betrachtet.

Der bekannteste Wirkmechanismus von nTiO₂ ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die eine Vielzahl zellulärer Strukturen beschädigen können. Die Annahme, dass oxidativer Stress durch TiO₂ nur durch die Induktion über UV-Strahlung hervorgerufen werden kann, wurde bereits durch einige Studien widerlegt. So konnten unter anderem Gurr et al. (2005) sowie Reeves et al. (2008) nachweisen, dass entsprechende Wirkmechanismen durch TiO₂ im nanoskaligen Größenbereich auch ohne Photoaktivierung der Partikel ausgelöst werden können. Für Partikel außerhalb des nanoskaligen Bereichs wurde ein solcher Effekt hingegen nicht beobachtet. Damit ist oxidativer Stress - auch unter Abwesenheit von UV-Strahlung - eine mögliche Ursache für die beobachtete chronische Schädigung des nanopartikulären TiO₂. Wu et al. (2012) beobachteten tatsächlich einen Einfluss von TiO₂-Nanopartikeln verschiedener Größen von 4 bis 90 nm auf Wachstum, Reproduktion und Bewegungsverhalten von *C. elegans*, die mit der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen korrelierten. Da unter den Testbedingungen der vorliegenden Studie in Dunkelheit jedoch keine photokatalytische Aktivität der Nanopartikel nachgewiesen werden konnte, ist dieser Wirkmechanismus hier wiederum unwahrscheinlich.

Agglomeration von nTiO₂ an der apikalen Membran der intestinalen Zellen von *C. elegans* als möglicher Auslöser der toxischen Wirkung

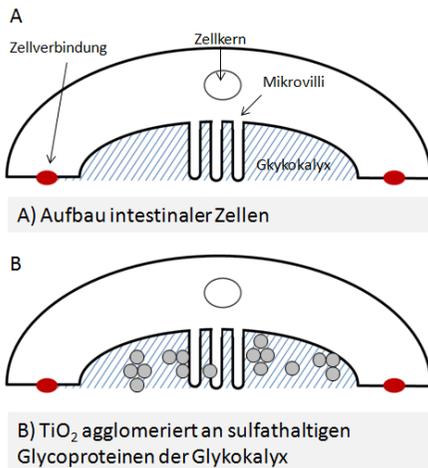


Abb. 5.1 Schematische Darstellung des Aufbaus einer intestinalen Zelle von *C. elegans* und der Agglomeration von TiO₂ in der sulfathaltigen Glykokalyx.

Betrachtet man jedoch den Aufbau der Darmepithelzellen von *C. elegans* im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Partikelgrößen und dem Agglomerationsverhalten der beiden untersuchten TiO₂-Materialien, so lässt sich hier ein möglicher Wirkmechanismus ableiten. nTiO₂ hat eine sehr hohe Oberflächenreaktivität und agglomiert stark im Nährmedium M9. Wie die Diskussion des Agglomerationsverhaltens von nTiO₂ gezeigt hat, lösen auch Sulfate eine starke Agglomeration von P25 aus. Das Darmepithel von *C. elegans* ist aus etwa 20 paarweise angeordneten Enterozyten aufgebaut, die das intestinale Lumen ringförmig umschließen und mit apikalen

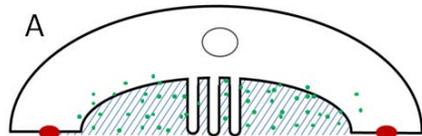
Zellverbindungen (Adherens-Junctions) verbunden sind.

Die apikale Membran der Enterozyten weist einen Bürstensaum auf, der aus Mikrovilli aufgebaut ist. Die Mikrovilli sind eingebettet in eine Glykokalyx aus hochmodifizierten Glycoproteinen (McGhee, 2007). Der Bereich des Bürstensaums und des sogenannten ‚terminalen Netzes‘, der die Epithelzellen an der apikalen Seite auskleidet, ist reich an Dermatan- und Heparinsulfaten (Schimpf et al., 1999). Diese Glykosaminoglykane zeichnen sich besonders durch randständige Sulfatgruppen aus, die eine starke Agglomeration der Nanopartikel hervorrufen könnten. Eine derartige Agglomeration im ‚terminalen Netz‘ der Darmepithelzellen von *C. elegans* ist demnach sehr wahrscheinlich und könnte zu einer Störung der Funktion dieser Struktur führen. Nach McGhee (2007) fungiert diese Struktur zum einen als Schutz vor mechanischer Verletzung und als Filter für die Selektion der Nährstoffe, die von der Zelle aufgenommen werden, zum anderen jedoch auch als Gerüst für Verdauungsenzyme, die dem Inhalt des Verdauungstraktes so verfügbar gemacht werden. Eine Blockierung dieser Struktur durch Bindung der Nanopartikel an die funktionellen Gruppen der Glykoproteine würde die Effizienz der Verdauung enorm herabsetzen und könnte so Nahrungsmangel hervorrufen.

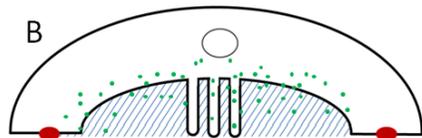
*Wechselwirkungen mit Ca^{2+} -Ionen könnte die Defäkation von *C. elegans* beeinflussen*

Kationen, insbesondere divalente Kationen wie Ca^{2+} werden durch die negativ polarisierten TiO_2 -Nanopartikel (Zetapotential – 25 mV) besonders stark gebunden. Besonders an der Grenzschicht zu Epithelzellen, die durch Strukturen der Zelloberfläche oder abgeschiedene Exopolymere hochviskos sind und eine unbewegte Zone ausbilden, kann es verstärkt zu einer Sorption der Ionen durch aggregierte Nanopartikel kommen (Shaw and Handy, 2011). Divalente Kationen spielen in vielen Zellen eine bedeutende Rolle bei der Steuerung physiologischer Funktionen, und so nimmt in *C. elegans* Calcium offenbar die steuernde Rolle bei der Ausscheidung des Darminhalts ein. Dal Santo et al. (1999) konnten zeigen, dass die rhythmische Muskel-

Steuerung der Defäkation durch Ca^{2+} nach Dal Santo et al. (1999)



A) Minimale interne Ca^{2+} Konzentration
→ Interphase Defäkation (keine Kontraktion)



B) Maximale interne Ca^{2+} Konzentration
→ Induktion der Defäkation durch pBoc-Phase (posterior body muscle contraction)

Abb. 5.2 Schematische Darstellung der Steuerung der Defäkation in *C. elegans* durch Ca^{2+} -Ionen nach Dal Santo et al. 1999.

kontraktion, die die Defäkation in *C. elegans* auslöst, durch eine Oszillation des Calcium-Niveaus in den intestinalen Zellen gesteuert wird. Der Inositol-Triphosphat-Rezeptor ITR-1 scheint dabei maßgeblich verantwortlich zu sein für die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentrationen. Auch die Phospholipase EGL-8, die besonders konzentriert in der Nähe der apikalen Zellverbindungen auftritt (Miller et al., 1999), scheint bei der Steuerung der Defäkation von Bedeutung zu sein (Espelt et al., 2005). Erreichen die Ca^{2+} -Konzentrationen in den intestinalen Zellen ihr Maximum, wird die erste Muskelkontraktion der periodischen Kontraktionswelle zur Defäkation ausgelöst. Espelt et al. (2005) konnten zudem zeigen, dass die Calciumoszillation an der apikalen Membran der intestinalen Zellen konzentriert ist, was darauf hindeutet, dass Calciumionen aus dem intestinalen Lumen aufgenommen werden. Eine Minderung der Verfügbarkeit der Calciumionen im intestinalen Lumen von *C. elegans* durch Bindung an agglomerierte TiO_2 -Nanopartikel würde auch die Aufnahme der Kationen in die Zellen einschränken und so die Defäkation hemmen. Kann *C. elegans* seinen nicht verdaubaren Darminhalt nicht mehr ausscheiden, so wird auch die Aufnahme neuer Nahrung gehemmt. Diese Hypothese deckt sich mit der Beobachtung, dass die Agglomeration der $n\text{TiO}_2$ -Partikel im Darm eine Ausscheidung der Nahrung erschwert und so die Aufnahme weiterer Nahrungspartikel hemmt.

Demnach wird vermutet, dass die Aufnahme von TiO_2 -Materialien sowohl mechanisch, als auch physiologisch zu einer Hemmung der Defäkation der Partikel und folglich auch zu einer Hemmung der erneuten Nahrungsaufnahme führt. Ein so induzierter Nährstoffmangel würde letztendlich auch eine chronische Schädigung des Organismus hervorrufen, die sich in Form des eingeschränkten Wachstums und des verminderten Reproduktionserfolgs von *C. elegans* manifestiert.

5.3 Einfluss von TiO_2 -Nanopartikeln auf die Toxizität von PAKs als Co-Kontaminanten

Aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften gelten industriell gefertigte Nanopartikel als potentiell bedeutende Interaktoren in ihrer Umwelt: Ihre extrem großen, reaktiven Oberflächen können Sorption und Interaktion mit anderen Kontaminanten ihrer Umgebung begünstigen. Ihre Größe ermöglicht ihnen zudem das Eindringen in bakterielle aber auch tierische und pflanzliche Zellen und macht sie damit zu potentiellen Transportvehikeln für adsorbierte Co-Kontaminanten in Organismen (Hartmann and Baun, 2010). Speziell für *C. elegans* als filtrierenden Organismus wurde die Bedeutung der Schadstoffexposition über die partikuläre Phase für nicht nanoskalige Partikel bereits eindeutig belegt. So wird einer Untersuchung von Offermann et al. (2009) zufolge die Verfügbarkeit von Cadmium für *C. elegans* durch die Anwesenheit von *E. coli*-Bakterien als Nahrungspartikel um das 430-fache erhöht. Auch künstliche Mikropartikel einer Größe von 1 μm erhöhten die

Cadmiumverfügbarkeit und -akkumulation gegenüber der Exposition über die Flüssigphase, wobei Beschichtungen aus Carboxylgruppen einen höheren Einfluss zeigten als Sulfat- oder Aminogruppen. Auch die Verfügbarkeit des PAKs Fluoranthen wurde durch die partikuläre Exposition über Bakterien deutlich erhöht (Ahlf et al., 2009).

In der vorliegenden Studie wurde deshalb der Einfluss von nTiO₂ auf Phenanthren als Vertreter der hochrelevanten Schadstoffgruppe der PAKs untersucht. Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der Untersuchung der physikalischen Wechselwirkungen der beiden Materialien, so ist ein Trägereffekt von nTiO₂ für Phenanthren kaum zu erwarten: Nur ein Bruchteil des Phenanthrens (unter 1 %) sorbierte nach einer Inkubation von 30 Minuten an die Oberfläche der Nanopartikel. Die Studie von Offermann et al. (2009) machte jedoch deutlich, dass weniger die Konzentration des sorbierten Kontaminanten, als vielmehr die Quantität und Qualität der Partikel als maßgeblich steuernder Faktor einzuordnen ist.

Die Untersuchung der Mischtoxizität von nTiO₂ und Phenanthren in der vorliegenden Studie konnte jedoch keinen signifikanten Einfluss des Nanomaterials auf die toxische Wirkung des PAKs nachweisen: Die Effekte durch kombinierte Exposition waren für drei unabhängige Tests additiv und entsprachen damit der Summe der Einzelsubstanzeffekte von nTiO₂ und Phenanthren. Zur Untersuchung des Einflusses von nTiO₂ auf die Bioverfügbarkeit des PAKs für *C. elegans* wurde zudem die Genexpression von *cyp-35C1* untersucht. Die Expression von *cyp-35C1* in *C. elegans* wird durch PAKs, wie z.B. Fluoranthen induziert und kann damit als Biomarker für die interne Verfügbarkeit von PAKs genutzt werden (Menzel et al., 2001). Ein Vergleich der *cyp-35C1*-Induktion durch Fluoranthen bzw. Phenanthren in dieser Studie konnte die Eignung von *cyp-35C1* als Biomarker für die Verfügbarkeit von Phenanthren nachweisen: Beide PAKs induzierten die Genexpression nach sechsstündiger Inkubation gleichermaßen und erhöhten sie gegenüber der Kontrollgruppe etwa um das 60-fache. Ein Einfluss von nTiO₂ auf die durch Phenanthren induzierte *cyp-35C1*-Expression konnte hier nicht nachgewiesen werden. Die Expression erfolgt nach kombinierter Exposition bei erhöhter Variabilität gleichermaßen wie nach Exposition gegenüber Phenanthren als Einzelsubstanz. Demzufolge hat nTiO₂ keinen Einfluss auf die interne Verfügbarkeit des PAKs Phenanthren.

C₆₀-Fullerene zeigten eine andere Wechselwirkung mit Phenanthren: Wie Baun et al. (2008) belegen konnten, sorbierten 80 % des vorliegenden Schadstoffs an Partikel einer Größe < 200 nm. Zudem war der sorbierte Anteil des Phenanthrens für *Daphnia magna* verfügbar. Fullerene bestehen aus reinem Kohlenstoff und sind demnach attraktiv für lipophile Kontaminanten wie PAKs. Titandioxid ist hingegen hydrophil, für die hier untersuchten Partikel wurde eine negative Nettoladung von - 25 mV bestimmt. Trotzdem gibt es in der Literatur Hinweise auf eine Sorption von Phenanthren an TiO₂-Partikel, die jedoch nicht als konkrete Nachweise gewertet werden können (Wen et al., 2002, Dong et al., 2010). Die

Wechselwirkung zwischen Schadstoffen ist ein komplexer Prozess, wobei der Nachweis von Bindungsaffinitäten nicht trivial ist. Farkas et al. (2012) konnten beispielsweise über radioaktiv markierte Substrate die Bindung von Phenanthren an Goldnanopartikel mit Citratcoating nachweisen, während für Silbernanopartikel mit dem entsprechenden Citratcoating keine Bindungskapazität für Phenanthren nachgewiesen wurde.

Die Wechselwirkungen von Titandioxid-Nanopartikeln mit hydrophilen Kontaminanten wie Schwermetallionen wurden in verschiedenen Studien untersucht und zeigten sich höchst variabel. So erhöht die Anwesenheit von TiO₂-Nanopartikeln beispielsweise die Akkumulation von Cadmium und Arsen im Karpfen, *Cyprinus carpio* (Sun et al., 2007, Zhang et al., 2007). Eine aktuelle Studie von Rosenfeldt et al. (2012) deutet jedoch daraufhin, dass die Toxizität von Arsen und Kupfer gegenüber *D. magna* durch die Anwesenheit von nTiO₂ abnimmt, während die Toxizität von Silber ansteigt. Die Wirkmechanismen sind demnach nicht einheitlich und werden neben der Oberflächenbeschaffenheit der Nanopartikel von den Eigenschaften des Co-Kontaminanten abhängen. Ein relevanter Einfluss von Titandioxid-Nanopartikeln auf die Verfügbarkeit und Toxizität von PAKs ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie nicht zu erwarten.

Kritische Methodenbetrachtung

Da Phenanthren mit einer Löslichkeit von 0,0011 g/l bei 25°C schlecht wasserlöslich ist, wurde es mit Hilfe des Lösevermittlers DMSO in das Testsystem eingebracht. Die Untersuchung der Phenanthrenkonzentrationen im Testsystem über die Testlaufzeit von 96 Stunden hat gezeigt, dass – in Abhängigkeit von der Testkonzentration und dem Testvolumen - nach 24 bis 48 Stunden bereits kein Phenanthren mehr nachweisbar war. Da ausgeschlossen werden konnte, dass das Phenanthren an den Wänden der Testgefäße aus Glas adsorbierte, wurde geschlossen, dass das PAK mit einem Dampfdruck von 0,022 Pa bei 25°C durch Verdunstung aus der Testlösung entwichen ist. Es ist demnach zu berücksichtigen, dass die tatsächliche Exposition gegenüber Phenanthren nicht über die gesamte Testlaufzeit von 96 Stunden erfolgte, sondern lediglich über einen Zeitraum von maximal 48 Stunden, wobei die Konzentration in diesem Zeitraum stetig abnahm. Dieser Umstand ist für die Interpretation der Ergebnisse kritisch. Da eine Dosierung mit Hilfe von Lösevermittlern wie DMSO jedoch bis heute ein gängiges Verfahren bei der ökotoxikologischen Untersuchung lipophiler Kontaminanten ist, ermöglicht die Anwendung dieses Verfahrens den Vergleich der Ergebnisse mit einer Vielzahl vorliegender Publikationen. Rasante Entwicklungen bei passiven Dosierungsmethoden ermöglichen hier jedoch in Zukunft vielversprechende Methoden für eine bessere Kontrollierbarkeit der Testkonditionen. Die Methode des passiven Dosierens hat sich aus den Verfahren der Passivsammler abgeleitet und basiert auf bekannten Verteilungskoeffizienten der unpolaren

Substanzen zwischen der wässrigen Phase und einem Trägermaterial, dass zuvor mit der lipophiler Testsubstanz inkubiert wurde. Die Trägermaterialien müssen daher lipophil, häufig werden hier Silikone eingesetzt (Smith et al., 2009).

Die Bestimmung der Toxizität von Phenanthren gegenüber *C. elegans* lieferte im Rahmen dieser methodischen Einschränkungen verlässliche Ergebnisse: Der EC_{50} von Phenanthren für die Reproduktion lag nach 96-stündiger Exposition bei 1230 $\mu\text{g/L}$. Dieses Ergebnis stimmt mit Literaturangaben gut überein: Sese et al. (2009) bestimmten für die Reproduktion von *C. elegans* einen EC_{50} von 1214 $\mu\text{g/l}$ nach 72-stündiger Exposition, wobei sie Aceton als Lösevermittler einsetzten. Eine Beobachtung der Entwicklung der Testkonzentrationen erfolgte in dieser Studie nicht, eine Abnahme der Konzentrationen wird aber mit großer Wahrscheinlichkeit auch hier aufgetreten sein. Hinsichtlich der beobachteten Abnahme der Testkonzentration innerhalb der ersten 24 bis 48 Stunden muss also davon ausgegangen werden, dass der EC_{50} bei konstanten Phenanthrenkonzentrationen deutlich unter den hier bestimmten Werten liegen wird. Die folgenden Experimente zeigten zudem, dass die Phenanthreneffekte von Testansatz zu Testansatz bei einer konstanten Konzentration von 500 $\mu\text{g/l}$ mit Hemmungen zwischen 9 % und 25 % durchaus stark schwankten.

5.4 Effekte der TiO_2 -Partikeln unter Einfluss simulierter Sonnenstrahlung

Im Folgenden wurde der Einfluss simulierter Sonnenstrahlung (SSR) auf die chronische Wirkung der TiO_2 -Materialien auf *C. elegans* untersucht. Die Hypothese, dass Titandioxid-Nanopartikel aufgrund ihrer vergrößerten Oberfläche eine höhere photokatalytische Aktivität aufweisen und deshalb unter Einwirkung von UV-Strahlung toxischer wirken, konnte bestätigt werden. Eine Untersuchung der Genexpression einer Superoxiddismutase, die als Indikator für oxidativen Stress diente, erlaubt auch hier indirekt Rückschlüsse auf mögliche Wirkmechanismen, die im Folgenden im Anschluss an die Diskussion der beobachteten Effekte erläutert werden.

Die eingesetzte simulierte Sonnenstrahlung hat ein Spektrum von etwa 300 bis 800 nm und umfasst damit auch den Strahlungsbereich, der die photokatalytische Aktivität von TiO_2 anregt und etwa bei 390 nm liegt. Ein Vergleich der Effekte von $n\text{TiO}_2$ in Dunkelheit und unter SSR-Exposition konnte zeigen, dass eine Bestrahlung einer Gesamtintensität von 231 W/m^2 über 30 Minuten zu einer signifikanten Erhöhung der Schadwirkung des Materials führt. Die Reproduktionshemmung bei 100 mg/l stieg durch SSR-Einfluss von $45\% \pm 3$ auf $82\% \pm 5$. Auch die Wachstumshemmung stieg durch die Bestrahlung bei 100 mg/l um Faktor 2. Die photokatalytische Aktivität des Materials, die indirekt über den Abbau von Metylenblau als Indikatorfarbstoff bestimmt wurde, lag bei dieser höchsten getesteten Konzentration bei 47 %. Bei Konzentrationen von 30 mg/l und niedriger war der toxizitätssteigernde Effekt durch SSR hingegen nicht zu beobachten. Die photokatalytische

Aktivität lag hier bei 33 % und darunter. Vergleicht man die Effekte des nanopartikulären TiO₂ nun wiederum mit den Effekten des Bulkmaterials, so zeigt sich hier dasselbe Phänomen wie bereits im Dunkeln: Für bTiO₂ konnte bis zur höchsten getesteten Konzentration von 100 mg/l keine photoaktivierte Toxizität nachgewiesen werden. Die photokatalytische Aktivität des Bulkmaterials ist jedoch mit 20 % auch deutlich geringer als die des Nanomaterials mit 47 %.

Auch Ma et al. (2012) zeigten eine Abhängigkeit der Toxizität von nTiO₂ gegenüber *Daphnia magna* von der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Durch gezielte Entfernung der UV-A Wellen aus dem Spektrum der einwirkenden Strahlung wurde eine Minderung der ROS-Bildung erreicht, die mit einer Verminderung der Toxizität einherging. Die ROS-Bildung korrelierte demnach auch hier mit der Toxizität von nTiO₂ gegenüber *D. magna*.

Eine naheliegende Ursache der Steigerung der Toxizität von nTiO₂ ist daher die photokatalytische Aktivität des Materials. Die photoinduzierte Bildung von freien Elektronen und Elektron-Fehlstellen führt zu einer Bildung von Sauerstoffradikalen wie Superoxid, die schädigend auf den Organismus einwirken. Aufgrund der stark vergrößerten Oberfläche ist die Reaktivität des Nanomaterials gegenüber der Reaktivität des Bulkmaterials enorm erhöht. Bezogen auf die Primärpartikelgröße hat nTiO₂ mit 6,9 m² pro 100 mg etwa die zehnfache Gesamtoberfläche von bTiO₂ mit 0,7 m² pro 100 mg.

Es gibt folglich zunächst zwei mögliche Interpretationen für die Unterschiede der Effekte der beiden TiO₂-Materialien:

1. nTiO₂ dringt gegenüber bTiO₂ tiefer in das Gewebe des Testorganismus ein und wird in den intrazellulären Raum aufgenommen. Die ROS-Bildung innerhalb der Zellen und der Gewebe führt zu einer chronischen Schädigung des Organismus.
2. Durch die vergrößerte Oberfläche von nTiO₂ weist das nanopartikuläre Material nicht nur eine höhere Reaktivität auf, es wird auch großflächiger in direkten Kontakt mit der Zelloberfläche des Darmepithels treten und an die Glykokalyx der apikalen Membran binden, wie bereits unter Kapitel 5.2 diskutiert wurde. Der direkte Kontakt mit der reaktiven nTiO₂ Oberfläche erhöht die Schadwirkung des Materials, auch wenn dieses nicht in die Zellen aufgenommen wird. Auch bTiO₂ induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im extrazellulären Raum. Die ROS-Konzentrationen sind jedoch so gering, dass sie durch den Abwehrmechanismus von *C. elegans* unschädlich gemacht werden. Zudem stehen die gebildeten ROS nicht in direktem Kontakt mit der Zellmembran der exponierten Zellen und reagieren zu großen Anteilen bereits im Darmlumen ab, ohne dass sie die Zellmembran schädigen.

Im Folgenden sollen die möglichen Interpretationen diskutiert werden.

5.4.1 Effekte intrazellulärer ROS-Bildung

Die Wirkmechanismen reaktiver Sauerstoffspezies sind vielfältig und können neben Lipiden und Proteinen auch Nukleinsäuren angreifen. Geht man zunächst davon aus, dass das nanopartikuläre TiO₂ im Gegensatz zu dem Bulkmaterial über die Zellmembran in die Epithelzellen aufgenommen wird, so wird es auch innerhalb der Zellen zu einer ROS-Bildung kommen. Neben intrazellulären Proteinen und Lipiden, z.B. der inneren Membranen verschiedener Zellorganellen, sind unter diesen Umständen auch DNA oder RNA-Moleküle des exponierten Organismus gefährdet. Reaktive Sauerstoffspezies greifen sowohl am Zucker-Phosphat-Rückgrat, als auch an den Basen der Nukleinsäuren an. Dadurch können sie beispielsweise Einzel- oder Doppelstrangbrüche hervorrufen, die Ausbildung von DNA-Addukten induzieren oder Läsionen einfügen, die die Replikation der DNA verhindern (Sies and Menck, 1992, Sies, 1993, Cabisco et al., 2000). Für nTiO₂ konnte in vitro bereits nachgewiesen werden, dass sie über die Bildung von Hydroxylradikalen unter UV-Einfluss Guaninbasen hydroxylieren (Wamer et al., 1997).

Bisherige Erkenntnisse über die mutagene und teratogene Wirkung von Nanomaterialien wurden bereits in Kapitel 2.3.1 detailliert erläutert. Für TiO₂-Nanopartikel wurde bereits mehrfach eine genotoxische Wirkung durch oxidative DNA-Schädigung nachgewiesen. Eine Untersuchung weist dabei bereits in Abwesenheit photokatalytischer Prozesse Genotoxizität nach (Gurr et al., 2005), während die genotoxische Wirkung in den übrigen Studien erst durch UV-Einwirkung induziert wurde (Dunford et al., 1997, Chen et al., 2007, Bar-Ilan et al., 2013). Auch für P25, das auch in der vorliegenden Arbeit als Testmaterial eingesetzt wurde, konnte an Lymphomzellen der Maus eine photoinduzierte Genotoxizität gezeigt werden (Nakagawa et al., 1997).

Die genotoxischen Wirkungen, die nTiO₂ unter UV-Exposition offenbar hervorrufen kann, würden auch eine reproduktionstoxische Wirkung induzieren und kommen damit als Wirkmechanismus der beobachteten Reproduktionshemmung in *C. elegans* in Betracht. Voraussetzung einer derartigen Wirkung ist jedoch eine intrazelluläre Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies, die erst in Folge einer zellulären Aufnahme der ROS-Bildner eintritt. Die vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass sowohl nTiO₂, als auch bTiO₂ in das intestinale Lumen von *C. elegans* aufgenommen wurden. Ein Nachweis über die Aufnahme der Partikel aus dem extrazellulären Raum in das intestinale Gewebe bis hin zu tiefer liegenden Geweben und Organen konnte nicht erbracht werden.

Die Aufnahme von Nanopartikeln über das Darmepithel oder andere Epithelien wie Haut- und Lungenepithel wird für viele Modellorganismen untersucht und zählt zu einer der Schlüsselfragen für die Bewertung der Risiken von Nanopartikeln für Mensch und Umwelt. Erst die Klärung dieser Frage ermöglicht Vorhersagen zur potentiellen Genotoxizität der

Materialien. Die Ergebnisse vieler Studien zeigen bisher Vergleichbares wie die Beobachtungen der vorliegenden Studie: Für *D. magna* wurde beispielsweise die Aufnahme von Fullerenen in Darmtrakt nachgewiesen, während ein Übertritt in das Gewebe des Wasserfloh nicht beobachtet wurde (Tervonen et al., 2010). Ähnliches zeigten Waissi-Leinonen et al. (2012) für *Chironomus riparius*. Pluskota et al. (2009) belegten für *C. elegans* die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten SiO₂-Partikeln einer Größe von 50 nm in das Darmlumen, wobei ein Transport in die tieferliegenden Gewebe und Organe des Nematoden jedoch nur für fluoreszierende Polystyren-Nanopartikel derselben Größe nachgewiesen werden konnte. Die künstlichen Partikel einer Größe von 50 nm gelangten dabei in Abhängigkeit von ihrer Oberflächenmodifikation in das interstitielle Gewebe und in die Gonaden.

Der Frage nach der Bedeutung der Oberflächenbeschaffenheit für die Aufnahme von Nanopartikeln in die Gewebe von *C. elegans* sind auch Meyer et al. (2010) mit ihrer Untersuchung von Silbernanopartikeln unterschiedlicher Oberflächenmodifikationen nachgegangen. Ein eindeutiger Nachweis für den Transport der Nanopartikel über die Zellmembran der Testorganismen gelang ihnen ausschließlich für zitratbeschichtete Nanopartikel, die sie in den Eiern von *C. elegans* nachweisen konnten. Diese Beobachtung legt nahe, dass - abgesehen von der Partikelgröße - im Besonderen die Beschichtung, und damit die Oberfläche der Partikel eine maßgebliche Rolle bei der Aufnahme der Partikel über die Zellmembran spielt. In diesem Fall wird die Aufnahme offenbar durch Zitrat als organisches Coating ermöglicht. Insgesamt lassen Nanopartikel mit lipophilen Eigenschaften durch ihren kleinen Durchmesser einen Gewebetransfer erwarten. In der vorliegenden Arbeit zu Titandioxid-Nanomaterialien wurden ausschließlich unbeschichtete Partikel eingesetzt, die eine negative Nettoladung aufweisen. Es ist demnach durchaus denkbar, dass weder bTiO₂, noch nTiO₂ zellulär aufgenommen wurden.

5.4.2 Superoxiddismutasen als Indikator für intrazelluläre ROS-Bildung

Als indirekter Nachweis für die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies – und damit auch für die Aufnahme der Partikel in die exponierten Zellen - wurde die Expression eines Superoxiddismutase-Gens, *sod-3*, untersucht. Superoxiddismutasen sind bekannt als Antioxidantien, die Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxid abbauen und damit der Abwehr von oxidativem Stress in Zellen dienen. SOD-3 gehört in *C. elegans* zur Gruppe der Mangan-SODs und wird in den Mitochondrien gebildet (Johnston and Ebert, 2012). In *E. coli*-Bakterien werden die Mangan-SODs mit insgesamt mindestens zehn Genen zur Abwehr von Superoxid durch einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor – SoxR – kontrolliert. SoxR liegt in allen *E. coli*-Zellen vor, ist in seiner Grundform jedoch inaktiv (Cabiscol et al., 2000). Die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors erfolgt Hidalgo et al. (1997) zufolge durch eine

reversible Oxidation des Eisen-Schwefel-Clusters im Zentrum des Proteins, die wie bereits beschrieben durch Superoxid ausgelöst wird. Ein erhöhter Level an Superoxid in der Zelle würde so zu einer Erhöhung der Expression dieser Gruppe von Genen führen, die gemeinsam den durch Superoxid verursachten oxidativen Stress abwehren. Die Kontrolle und Funktion der *sod*-Gene bei *C. elegans* ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt.

Setzt man eine entsprechende Regulation des *sod-3* Gens voraus, so müsste eine erhöhte Superoxidkonzentration, gebildet durch photoaktivierte nTiO₂-Partikel, zu einer Erhöhung des mRNA-Levels dieses Gens führen.

SOD-Aktivität nach nTiO₂-Exposition

Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zeigen, dass die Exposition gegenüber nTiO₂ sehr unterschiedliche Antworten der SOD-Aktivität hervorruft. Wie Tab. 5.1 verdeutlicht, ändern sich die Reaktionen dabei in Abhängigkeit der exponierten Testorganismen und der applizierten Testkonzentrationen.

Sowohl für *C. carpio*, als auch für *H. diversicolor supertexta* wurde eine erhöhte SOD-Aktivität bei niedrigen nTiO₂-Konzentrationen nachgewiesen, während höhere Konzentrationen eine Verminderung der Aktivität hervorriefen (Hao et al., 2009, Zhu et al., 2011). Diese Beobachtung legt nahe, dass geringe nTiO₂-Konzentrationen eine Aktivierung oder Neubildung von SOD induzieren, während erhöhte Konzentrationen zu einer Überlastung des Abwehrsystems für Superoxid führen. Eine derartige Überlastung würde zu anhaltendem oxidativem Stress führen, der chronische Schäden hervorrufen kann. Eine vergleichbare Reaktion wurde auch für menschlich Nierenzellen (HEK-293) beobachtet: Die Autoren wiesen eine von der Dosis abhängige Abnahme der SOD-Konzentration nach, die negativ mit der intrazellulären ROS Konzentration korrelierte (Meena et al., 2012).

Eine lokale Erhöhung der SOD-Aktivität im Magen, wie sie für *D. rerio* nachgewiesen werden konnte, deutet auf eine lokale Kontrolle der Enzym-Aktivität hin. Die Exposition der Fische gegenüber nTiO₂ führt vermutlich zu einer Akkumulation der Partikel im Magen der Organismen. Eine lokale Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird dann gezielt mit einer lokalen Erhöhung der SOD-Aktivität beantwortet (Xiong et al., 2011). Exposition gegenüber nano-TiO₂ scheint demnach die Aktivität von SOD zu beeinflussen. Für *C. elegans* wurde bisher kein Einfluss auf die Expression des *sod-3*-Gens beobachtet (Roh et al., 2010).

Tab. 5.1 Effekte von $n\text{TiO}_2$ auf Aktivität bzw. Konzentration von Superoxiddismutase in verschiedenen Testorganismen

Testorganismus	Partikelgröße	C (TiO_2)	Enzymatische Aktivität (Ort)	Referenz
<i>Cyprinus carpio</i>	50 nm	10 mg/l 50 mg/l 100 – 200 mg/l	SOD-Aktivität steigt (Leber) Keine Effekte SOD-Aktivität sinkt (Leber)	Hao et al. (2009)
<i>Danio rerio</i>	30 nm 1000 nm	50 mg/l 50 mg/l	SOD Aktivität sinkt (Leber) bzw. steigt (Magen) Kein Effekt	Xiong et al. (2011)
Fibrblasten Maus	5 nm	60 – 600 $\mu\text{g/l}$	SOD-Level sinkt (Fibroblasten)	Jin et al. (2008)
menschliche Nierenzellen	10 – 20 nm	50 – 200 mg/l	SOD-Level sinkt, negativ korreliert mit ROS-Level	Meena et al. (2012)
<i>Daphnia magna</i>	40 nm	5 – 10 mg/l	Kein Effekt auf SOD, Erhöhung CAT, GPX und GST-Aktivität	Kim et al. (2010)
<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	< 10 nm	1 mg/l > 1mg/l	SOD-Aktivität steigt SOD-Aktivität sinkt	Zhu et al. (2011)
<i>Eisenia fetida</i>	10 – 20 nm	Bis 5 g/kg	SOD-Aktivität sinkt geringfügig, kein Effekt auf CAT u. MDA	Hu et al. (2010)
<i>Eisenia fetida</i>	21 nm	25 mg/l	Kein Effekt	Bigorgne et al. (2012)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	7 nm u. 20 nm	1 mg/l	Kein Effekt auf <i>sod-3</i> -Expression	Roh et al. (2010)

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls keinen Einfluss von $n\text{TiO}_2$ auf die *sod-3* Expression: Weder in Dunkelheit, noch unter Einfluss von SSR änderte sich die Genexpression in *C. elegans* nach 4 stündiger Exposition gegenüber $n\text{TiO}_2$ und anschließender Bestrahlung über 30 Minuten. Um die Expositionsbedingungen besser variieren zu können, wurde die *sod-3*-Expression zusätzlich an einem transgenen *C. elegans*-Stamm beobachtet, der mit der Expression von *sod-3* gleichzeitig ein transfiziertes *gfp*-Gen exprimiert. So konnte die Expression des Zielgens nach unterschiedlichen Expositionszeiten von vier bis 48 Stunden bestimmt werden. Unabhängig von der Expositionszeit konnte auch hier kein Einfluss der Titandioxid-Nanopartikel auf die Expression der Superoxiddismutase erkannt werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Partikel aus dem Darmlumen von *C. elegans* nicht in die intestinalen Zellen aufgenommen werden, wodurch intrazellulär auch keine Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgt. Da *sod-3* mitochondrial vorliegt und vermutlich nur durch intrazellulär auftretende ROS induziert werden kann, wird hier keine genetische Antwort auf ROS-Bildung beobachtet. Eine extrazellulär auftretende ROS-Bildung ist aufgrund der nachgewiesenen photokatalytischen Reaktivität der Partikel jedoch zu erwarten.

5.4.3 Effekte extrazelluläre ROS-Bildung

Auch bei einer extrazellulären Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im interstitiellen Lumen von *C. elegans* bieten sich den radikalischen Verbindungen empfindliche Angriffsflächen:

Abgesehen von DNA oder RNA greifen ROS auch Lipide, wie beispielsweise Phospholipide der Membranen und Proteine an. Bei der Lipidperoxidation kommt es beispielsweise bevorzugt an den Doppelbindungen der Fettsäureketten von Membran-Phospholipiden zu einer oxidativen Degradation der Moleküle, die zu einer Schädigung der Membranintegrität führt. Häufig wird dabei die Fluidität der Membran gesenkt (Klaine et al., 2008). Auch membrangebundene Proteine können durch die Peroxidation der Phospholipide indirekt beeinflusst werden und ihre Funktionalität verlieren. Peroxydierte Fettsäuren können zudem die Bildung weiterer Sauerstoffradikale anregen, wodurch eine Kettenreaktion in Gang gesetzt wird, die das Ausmaß der Membranschädigung enorm steigert (Cabiscol et al., 2000). Durch Proteinperoxidation können Membranproteine auch einer direkten Schädigung durch ROS ausgesetzt sein: Über die Bildung von Disulfidbrücken zwischen schwefelhaltigen Aminosäuren modifizieren sie die Struktur und damit häufig auch die Funktionalität der Proteine (Klaine et al., 2008). Speziell für Superoxid-Radikale ist außerdem bekannt, dass sie Eisen-Schwefel-Cluster von Proteinen angreifen können, die vielen Enzymen als Cofaktoren dienen. Das katalytische Eisenatom wird dabei aus dem Eisen-Schwefel-Cluster der funktionellen Gruppe gelöst und als Fe^{2+} freigesetzt. Das Enzym verliert so seine Funktionalität. Zudem kommt erschwerend hinzu, dass das freigesetzte Fe^{2+} daraufhin in Anwesenheit von H_2O_2 die Fenton-Reaktion in Gang setzen kann, bei der neben Hydroxid auch Hydroxylradikale und Fe^{3+} freigesetzt werden. Hydroxylradikale sind wiederum die reaktivste radikalische Sauerstoffspezies und können nahezu alle biologischen Makromoleküle direkt schädigen (Imlay, 2003).

Die aufgeführten Reaktionen können ausnahmslos bereits an der extrazellulären Seite der apikalen Epithelmembranen wirksam werden und enorme Auswirkung auf die Funktionalität der Membran haben. Durch ein Herabsetzen der Membranfluidität wird auch die Permeabilität der Membran herabgesetzt, wodurch die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Darmlumen von *C. elegans* gestört würde. Eine zusätzliche Schädigung von Membranproteinen durch Schädigung von Eisen-Schwefel-Clustern oder die Ausbildung von Disulfidbrücken, die mit einer Strukturänderung der Proteine einhergeht, wird zudem auch die selektive und aktive Aufnahme von Nährstoffen eingeschränkt, die diese Proteine im unbeschädigten Zustand bewerkstelligen. Insbesondere an der apikalen Membran der intestinalen Epithelzellen hat eine derartige Schädigung der Membran enorme Effekte auf die Verfügbarkeit der im Darmlumen vorliegenden Nährstoffe für den Organismus. Eine eingeschränkte Nährstoffaufnahme durch eine ROS-induzierte Schädigung der Membranfunktionen der Darmepithelzellen von *C. elegans* könnte die beobachteten Schädigungen des nanopartikulären TiO_2 demnach erklären. Hinzu kommt die mögliche Schädigung weiterer Membranproteine, die verschiedenste physiologische Funktionen der Epithelzellen regulieren.

Der direkte Kontakt der Partikeloberflächen mit den Zellmembranen wäre hierbei der regulierende Parameter. Ein geringerer Oberflächenkontakt mit dem Bulkmaterial bTiO₂, setzt seine Effekte gegenüber denen von nTiO₂ stark herab. Hinzu kommt, dass bTiO₂ ohnehin eine deutlich geringere Reaktivität zeigt als nTiO₂, sodass es hier im Gegensatz zu dem Nanomaterial keine chronische Schädigung ausgelöst wird.

Photokatalytische Aktivität und interne ROS-Bildung

Die Untersuchung der photokatalytischen Aktivität der getesteten TiO₂-Materialien hat gezeigt, dass sowohl nTiO₂, als auch bTiO₂ reaktive Sauerstoffspezies bilden, die Methyleneblau als Indikatorfarbstoff abbauen können. Ob diese reaktiven Verbindungen in den exponierten Testorganismen nun Effekte wie Lipidperoxidation oder Proteinoxidation hervorrufen, wurde anhand der intestinalen Autofluoreszenz untersucht. Die Autofluoreszenz von *C. elegans* bei einer Wellenlänge 530 nm wird durch die Akkumulation von Lipofuscin in den intestinalen Zellen verursacht. Da Lipofuscin als nicht abbaubares Abfallprodukt durch Protein- und Lipidperoxidation gebildet wird, kann die Intensität der Fluoreszenz bei dieser Wellenlänge als Indikator für oxidativen Stress eingesetzt werden (Garigan et al., 2002). Li et al. (2012) beobachteten bereits in Dunkelheit bei nTiO₂-Konzentrationen von 1 µg/l eine Erhöhung der Autofluoreszenz von *C. elegans*. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie nicht reproduziert werden. Bei Konzentrationen von 100 mg/l wurde weder durch bTiO₂, noch durch nTiO₂ eine Erhöhung der Autofluoreszenz nachgewiesen. Auch die simultane Exposition gegenüber simulierter Sonnenstrahlung, die nachweislich zu einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, zeigte keinen signifikanten Einfluss auf diesen Parameter. Möglicherweise ist die Fluoreszenz von Lipofuscin als Indikator für oxidativen Stress nicht ausreichend sensitiv gegenüber extrazellulärer Lipid- und Proteinperoxidation.

Die hohen photokatalytischen Aktivitäten, die durch den Abbau von Methyleneblau außerhalb des Testorganismus nachgewiesen werden konnten, lassen jedoch darauf schließen, dass es auch in *C. elegans* zu einer Aktivität der Partikel kommt. Der Organismus ist transparent und damit durchlässig ist für einen großen Anteil der applizierten Strahlung. Ein direkter Nachweis der Sauerstoffradikale im interstitiellen Lumen von *C. elegans* erscheint hier zunächst sinnvoll. Erfahrene Autoren wie Klaine et al. 2008 raten von einem solchen Nachweis der ROS-Bildung in Zellen oder Geweben von Organismen durch redoxsensitive Fluoreszenzfarbstoffe wie H₂DCFDA jedoch eindeutig ab, da sie sehr fehleranfällig sind: So konnte eine Studie von Lyon et al. (2008) diesbezüglich zeigen, dass diese Methoden sehr häufig falschpositive Signale detektieren. Von einem entsprechenden Nachweis wurde daher in der vorliegenden Arbeit abgesehen.

5.4.4 Erhöhung der Effekte durch photoinduzierte Disaggregation der Partikel

Eine mögliche Erklärung für die erhöhten Effekte durch nTiO₂ unter Einwirkung von SSR, die höchstens indirekt im Zusammenhang mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies steht, ist die photoinduzierte Disaggregation der Partikel, wie Bennett et al. sie 2012 beschrieben haben. Die Autoren beobachteten eine Abnahme des mittleren hydrodynamischen Radius von TiO₂-Nanopartikeln nach Bestrahlung um 50 nm (von 280 auf 230 nm) und eine damit einhergehende Zunahme der transdermalen Penetration der Partikel in die Haut von Schweinen. Die Bestrahlung verursacht demnach eine Verminderung der Partikelgröße, die zu einer verstärkten Aufnahme der Partikel führt. Übertragen auf die vorliegende Studie könnte eine verminderte sekundäre Partikelgröße mit einer Erhöhung der Schädigung einhergehen, die möglicherweise durch einen stärkeren Kontakt der Partikel mit der Zelloberfläche der Epithelzellen verursacht wird. Diese Hypothese konnte aufgrund der räumlichen Trennung der DLS-Analytik und des Sonnensimulationsgerätes nicht experimentell für die eingesetzten Testkonditionen überprüft werden. Vergleicht man jedoch die Studie von Bennett et al. mit der vorliegenden Arbeit, so finden sich ähnliche Testkonditionen: Bennett et al. nutzen 27 nm-Partikel mit einer Konzentration von 100 mg/l bei einer Strahlungsintensität von 300 W/m². In der vorliegenden Studie wurden 21 nm-Partikel mit einer Konzentration von 100 mg/l bei einer Strahlungsintensität von 231 W/m² verwendet.

Die erforderliche Energie zur Disaggregation der TiO₂-Partikeln entspricht nach Berechnungen von Bennett et al. (2012) entsprechend der DLVO-Theorie etwa $3,96 \times 10^{-21}$ J/Partikel. Eine Strahlungsintensität von 231 W/m² über 30 Minuten im hier durchgeführten Nematodentest liefert pro Testgefäß eine Energie von 943 J. Bei einer angenommenen 100 %igen Absorption der einwirkenden Strahlung kann damit jeder Primärpartikel eine Energie von $4,2 \times 10^{-14}$ J absorbieren, weit mehr, als für die Disaggregation der Partikel notwendig ist. Von einer Disaggregation der Partikel, wie Bennett et al. sie beobachteten, ist also für die hier diskutierten Ergebnisse auszugehen. Die Autoren konnten jedoch auch zeigen, dass die Partikel nach der Bestrahlung in nur wenigen Minuten wieder vollständig reaggregieren. Eine Erhöhung der Toxizität der Partikel durch kleinere Partikeldurchmesser kann demzufolge nur während des Bestrahlungszeitraums von 30 Minuten innerhalb der ersten fünf Stunden der Exposition verursacht werden. Im Darmlumen von *C. elegans* könnte es sich jedoch anders verhalten: Möglicherweise kommt es durch die Expolymere der Darmepithelzellen zu einer Stabilisierung der disaggregierten Partikel. Quik et al. (2010) und Yang et al. (2009) belegten beispielsweise die Stabilisierung verschiedener Metalloxid-Nanopartikel durch die Anwesenheit von natürlichem organischem Material (NOM). Shaw and Handy (2011) beschrieben zudem die Bindung von Nanopartikeln an Mucoproteine der Kiemenzellen von

Fischen. Eine vergleichbare Reaktion an Exopolymeren der Darmepithelzellen könnte eine stabilisierende Wirkung auf die durch UV-Einwirkung vereinzelt Nanopartikel haben.

Durch den Wirkmechanismus der photoinduzierten Disaggregation der $n\text{TiO}_2$ -Partikel läßt sich somit die Erhöhung der Schädigung des Materials durch UV-Strahlung unabhängig von der Wirkung des oxidativen Stresses erklären.

5.5 Effekte photoaktivierter TiO_2 -Partikeln auf die Toxizität von Phenanthren

Obwohl eine Sorption von Phenanthren an TiO_2 -Partikel in wässriger Suspension bisher nicht belegt werden konnte, gibt es Nachweise über starke Wechselwirkungen der beiden Substanzen unter dem Einfluss von UV-Strahlung (Wen et al., 2002, Dong et al., 2010). Beide Studien konnten eine Photodegradation des Phenanthrens unter Anwesenheit von TiO_2 -Partikeln nachweisen. Dong und Coautoren sprechen sogar von einem möglichen Einsatz von nanopartikulären TiO_2 für die Sanierung PAK belasteter Böden. Die photoaktivierte Degradation von PAKs geht in der Regel mit einer Bildung oxidierter PAKs, sogenannter oxy-PAKs einher. Lundstedt et al. (2007) konnten zeigen, dass eben diese modifizierten PAKs signifikante Toxizitäten zeigen, sowohl in vivo gegenüber aquatischen Organismen, als auch in vitro gegenüber Säugerzellen. Die Autoren postulieren die Hypothese, dass oxy-PAKs aufgrund ihrer Struktur in ihrer Umwelt mobiler sind als ihre Ausgangsstoffe, wodurch sie ein höheres ökotoxikologisches Gefährdungspotential aufweisen. Besonders die Sanierung PAK-belasteter Lebensräume könnte die Bildung und Verbreitung dieser Gefahrstoffe auslösen.

Durch UV-Exposition der phototoxischen Verbindungen gehen diese in einen angeregten Zustand über. In einem Organismus können sie so über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oxidativen Stress auslösen. Durch Reaktion mit biologischen Makromolekülen lösen sie Radikalbildung oder Ladungstransfer aus, wodurch wiederum oxidativer Stress induziert wird.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen der vorliegenden Studie die Effekte von $n\text{TiO}_2$ -Partikeln auf die Toxizität von Phenanthren unter dem Einfluss von simulierter Sonnenstrahlung untersucht.

Dabei wurden nach Diamond (2003) folgende photoaktivierte Wirkmechanismen unterschieden:

1. Photomodifikation:

Durch Photodegradationsprozesse werden Verbindungen chemisch modifiziert. In der Regel kommt es dabei unter Anwesenheit von Sauerstoff zu einer Oxidation des Kontaminanten, beispielsweise durch Anlagerung einer Hydroxylgruppe. Es entstehen stärker polare und damit häufig besser bioverfügbare Verbindungen, die unter Umständen toxischer sind.

2. Photosensitivierung:

Durch UV-Exposition der phototoxischen Verbindungen gehen diese in einen angeregten Zustand über. In einem Organismus können sie so über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oxidativen Stress auslösen. Durch Reaktion mit biologischen Makromolekülen lösen sie Radikalbildung oder Ladungstransfer aus, wodurch wiederum oxidativer Stress induziert wird.

Photomodifikation durch Vorbestrahlung

Durch Bestrahlung von nTiO₂ und Phenanthren vor dem Einbringen der Testorganismen in das Testsystem wurde zunächst überprüft, ob es zu einer photoaktivierten Modifikation des Schadstoffs kommt, die eine Veränderung der Toxizität hervorruft. Der Test zeigte zunächst, dass eine Bestrahlung von Phenanthren als Einzelsubstanz vor Testbeginn zu einer signifikanten Abnahme der Toxizität führt: Bei einer Konzentration von 500 µg/l wurde die Reproduktion von *C. elegans* im Dunkeln um 9 bis 25 % gehemmt. Nach einer 30-minütige Bestrahlung vor Teststart zeigt Phenanthren bei dieser Konzentration keine Toxizität mehr. Diese Toxizitätsabnahme spricht für eine photoaktivierte Degradation der Verbindung zu einem weniger toxischen Produkt. In Kombination mit nTiO₂ in einer Konzentration von 1 und 3 mg/l wird derselbe Effekt beobachtet. Bei einer nTiO₂-Konzentration von 10 mg/l kommt es jedoch zu einer überadditiven Steigerung der Reproduktionshemmung von 0 % auf 18 %. Diese Beobachtung lässt zwei Interpretationen zu:

1) Unter Anwesenheit von nTiO₂ führt die Bestrahlung mit SSR zu einer Photomodifikation von Phenanthren, die zur Bildung eines stärker toxischen Metaboliten führt;

oder

2) Die Anwesenheit von nTiO₂ führt bei einer Konzentration von 10 mg/l zu einer so starken Reflektion der einwirkenden Strahlung, dass es nicht zu einer Photodegradation des Phenanthrens kommt. nTiO₂ wirkt dann also als UV-Blocker.

Interpretation 1 setzt voraus, dass die Photomodifikation, die durch nTiO₂ und SSR induziert wird, eine andere chemische Reaktion auslöst, als die Photomodifikation die alleine durch

SSR induziert wird. Im ersten Fall entsteht dabei eine Verbindung erhöhter Toxizität, während im zweiten Fall eine weniger toxische Verbindung entsteht. Die Literatur bietet derzeit keinerlei Hinweise auf eine derartige TiO₂-spezifische Photomodifikation. Angesichts der Tatsache, dass die Hemmung der kombinierten Exposition unter SSR mit 18 % in etwa den addierten Einzelsubstanzeffekten im Dunkeln von 20 % (9 % für nTiO₂ + 11 % für PHE) entspricht, ist Interpretation 2 daher schlüssig: Durch die starke durch TiO₂ verursachte Trübung der Suspension und den hohen Brechungsindex von TiO₂ wird Phenanthren vor einer Photodegradation geschützt, die Schädigung des PAKs bleibt während der Bestrahlung erhalten.

Vergleichbare Effekte fanden Becker et al. (2002) für suspendierte Sedimente: Eine Bestrahlung von Phenanthren in wässriger Lösung führte hier zu einer Erhöhung seiner Toxizität gegenüber *Lemna minor* durch photomodifizierende und photosensibilisierende Effekte. Unter Anwesenheit suspendierter Sedimente im Testsystem wurde die UV-Intensität jedoch offenbar so stark reduziert, dass keine photoaktivierte Toxizität auftrat.

nTiO₂ wirkt hier demnach als UV-Schutz für Phenanthren und verhindert somit den photokatalytischen Abbau des PAKs. Die Anwesenheit von nTiO₂ führt also nicht zu einer verstärkten Induktion der Photomodifikation, die durch die einwirkende simulierte Sonnenstrahlung ausgelöst wird.

Dong et al. (2010) konnten einen photokatalytischen Abbau von Phenanthren durch die Anwesenheit von nTiO₂ an der Oberfläche von Böden nachweisen. Die Halbwertszeit von Phenanthren lag dabei jedoch bis zu einer Konzentration von 4 Gewichtsprozent bei etwa 50 Stunden, die Bestrahlung erfolgte zudem mit reinem UV-Licht einer Wellenlänge von 253,7 nm bei 20 W. Wen et al. (2002) beobachteten nach 50 Stunden UV-Exposition einen nahezu vollständigen Abbau von Phenanthren in wässriger Phase. Die UV-Intensität lag hier bei 30 W/m² bei 320 bis 400 nm, das Volumen der exponierten Lösung betrug 50 ml. Das Phenanthren wurde für eine effiziente Wechselwirkung zuvor an die Oberfläche der nTiO₂-Partikel adsorbiert. Die zugeführte Strahlungsenergie ist bei Dong et al., sowie Wen und Coautoren demnach deutlich höher, als in der vorliegenden Studie mit einer Bestrahlungsdauer von 30 Minuten bei einer UV-Intensität von etwa 20 W/m² (300 bis 400 nm).

Photosensitivierung durch simultane Bestrahlung

Die Bestrahlung der Testsubstanzen vor dem Teststart bezieht das mögliche Auftreten einer Photosensitivierung der Komponenten nicht mit ein, da sie nur bei einer simultanen Bestrahlung der exponierten Organismen wirksam wird. Zur Bestimmung der photosensitivierenden Effekte von $n\text{TiO}_2$ gegenüber Phenanthren wurde zunächst die Phototoxizität des PAKs als Einzelsubstanz unter Einfluss simultaner Bestrahlung bestimmt. Der EC_{50} für Reproduktion, der im Dunkeln bei $1230 \mu\text{g/l}$ lag, sank durch Bestrahlung der Testorganismen während der Exposition auf $522 \mu\text{g/l}$. Vergleichbare Phototoxizitäten von Phenanthren fanden auch Wernersson (2003) für *Daphnia magna*: Eine simultane Bestrahlung senkte den EC_{50} - Wertes von über $1024 \mu\text{g/l}$ ohne Bestrahlung auf $378 \mu\text{g/l}$ nach Bestrahlung. Die hier beobachtete Erhöhung der Toxizität muss durch eine Photosensitivierung des Phenanthrens ausgelöst worden sein, da die vorhergehenden Experimente zeigen konnten, dass die Photomodifikation von Phenanthren zu einer Abnahme der Toxizität führt. Interessanterweise führte die Anwesenheit von $n\text{TiO}_2$ bei der Bestrahlung nicht zu einer Erhöhung dieser photosensitivierenden Effekte, was aufgrund der photokatalytischen Reaktivität des Materials durchaus erwartet wurde, sondern vielmehr zu einer Abnahme der toxisitätssteigernden Effekte der Sonnenstrahlung. Gegenüber den addierten Einzelsubstanzeffekten von $n\text{TiO}_2$ und Phenanthren unter simultaner Bestrahlung fällt die Hemmung bei kombinierter Exposition geringer aus. Auffällig ist hier auch eine Konzentrationsabhängigkeit: Je höher die $n\text{TiO}_2$ -Konzentration ist, desto stärker sinkt die Hemmung im kombinierten Ansatz. Diese Beobachtung deutet erneut auf einen UV-blockierenden Effekt des TiO_2 -Nanomaterials hin.

5.6 Umweltrelevanz

Aktuellen Modellierungen der Umweltkonzentrationen von TiO₂-Nanopartikeln von Gottschalk et al. (2009) zufolge liegen die Konzentrationen im Sediment aquatischer Ökosysteme in den USA im Jahr 2012 bei bis zu 0,6 mg/kg. Hemmungen gegenüber benthischen Organismen ab Konzentrationen von 10 mg/l, wie sie hier für *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen wurden, indizieren unter diesen Bedingungen kein akutes Risiko für die aquatische Umwelt. Ein erwarteter Anstieg der Konzentrationen nanopartikulären Titandioxids in europäischen Sedimenten von 0,27 bis 1,4 mg/kg jährlich weist jedoch auf drastisch steigende Konzentrationen in den nächsten Jahrzehnten hin (Gottschalk et al. 2009). Ein von industriell hergestellten Nanopartikeln ausgehendes Risiko für aquatische Ökosysteme und insbesondere für benthische Lebensräume ist auf der Grundlage der aufgeführten Ergebnisse damit durchaus in Betracht zu ziehen. Die beobachtete Aufnahme und Agglomeration der TiO₂-Nanopartikel im gastrointestinalen Trakt der Testorganismen ist von außerordentlicher Relevanz für die Organismen höherer Trophiestufen. *C. elegans* bildet in terrestrischen und benthischen Lebensräumen nach Bakterien die Basis der Nahrungskette und wird als Träger akkumulierter Nanopartikel fungieren. Eine koreanische Studie an nTiO₂-exponierten Reisfeld-Mikrokosmen bestätigt die Bedeutung von Nematoden für den Transfer von nTiO₂ durch die Trophieebenen der Nahrungskette. Die Autoren belegten einen Transfer der Nanopartikel aus der Wassersäule über die Wurzeln des Wasserfenchels (*Oenanthe lachenalii*) in Nematoden der Gattung *Meloidogyne*. Für die Pflanzenparasiten wurde ein Biokonzentrationsfaktor von 337,5 nachgewiesen, der Bioakkumulationsfaktor stieg nach 17 Tagen Exposition um 200 % (Yeo and Nam, 2013). Der Transfer in höhere Trophieebenen wurde in dieser Studie nicht berücksichtigt. Eine vergleichbare Rolle spielt *Daphnia magna* offenbar im aquatischen Nahrungsnetz. Für den Flohkrebs wurde wiederholt eine Anreicherung von Nanomaterialien im Darm gezeigt (Roberts et al., 2007, Baun et al., 2008, Tervonen et al., 2010). Ein Transfer der akkumulierten Nanomaterialien in Konsumenten der Daphnien ist anzunehmen.

Für eine Bewertung des ökologischen Risikos industriell gefertigter Nanomaterialien muss zudem berücksichtigt werden, dass Umweltparameter, die auf die emittierten Kontaminanten einwirken, einen erheblichen Einfluss auf deren Wirkung gegenüber exponierten Organismen haben. Wie neben der vorliegenden Studie auch weitere Untersuchungen bestätigen, spielt unter den abiotischen Faktoren für TiO₂-Nanopartikel hierbei insbesondere die UV-Strahlung eine bedeutende Rolle. Die Toxizität von nTiO₂ gegenüber *C. elegans* erhöht sich dieser Studie zufolge durch die Einwirkung simulierter Sonnenstrahlung um Faktor zwei zu einem EC₅₀ von 53 mg/l. Hund-Rinke and Simon (2006) konnten Ähnliches für *Daphnia magna* zeigen: Die Bestrahlung von nTiO₂ mit simulierter Sonnenstrahlung einer Intensität von 250 W/m² über 30 Minuten erhöhte die Immobilisierung der Flohkrebse signifikant. Auch Amiano

et al. (2012) fanden eine Erhöhung der Immobilisierung von *D. magna* durch nTiO₂ unter gezielter UV A-Bestrahlung von einem EC₅₀ von 29,7 mg/l in Dunkelheit auf 1,2 mg/l unter UV-A Einwirkung.

Studien an *D. magna* konnten zudem zeigen, dass das Testdesign einen enormen Einfluss auf die Toxizität von Nanomaterialien hat: Die Reproduktion des Testorganismus wurde hier durch ein 6 nm nTiO₂ (A-100) im semi-statischen Experiment ab Konzentrationen von 0,06 mg/l signifikant gehemmt, während im Durchfluss-Experiment keine signifikanten Effekte auftraten (Seitz et al., 2013). Auch physikalische Parameter wie die Strömungsbedingungen werden demnach einen Einfluss auf die Wirkung der Nanomaterialien haben.

Desweiteren kann die Anwesenheit von organischen Materialien die Wirkung von Nanomaterialien extrem beeinflussen. Wie bereits zu Beginn der Diskussion in Kapitel 5.1.1 erläutert wurde, haben organische Verbindungen wie beispielsweise Humin- und Fluvinsäuren einen starken Einfluss auf das Agglomerationsverhalten der Nanopartikel, was sich indirekt auch auf die Toxizität der Materialien auswirkt. Yang et al. (2013) konnte speziell für nTiO₂ zeigen, dass dessen Toxizität gegenüber *Danio rerio* durch die Anwesenheit von Huminsäuren erhöht wird, besonders unter Einfluss von simulierter Sonnenstrahlung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bekräftigen die Bedeutung der primären Partikelgröße für die toxische Wirkung der Materialien und belegen nanospezifische Risiken. Zudem konnte die Arbeit eine signifikante Erhöhung der Toxizität von nano-TiO₂ durch die Einwirkung von simulierter Sonnenstrahlung nachweisen. Physikalisch-chemische Umweltparameter haben damit einen relevanten Einfluss auf die Toxizität von Nanomaterialien und müssen in die Bewertung der Umweltrisiken dieser modernen Kontaminanten einbezogen werden. Weitere Untersuchungen der ökotoxikologischen Effekte synthetischer Nanomaterialien unter dem Einfluss variierender Umweltbedingungen sind in Anbetracht der gewonnenen Erkenntnisse unerlässlich.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Durch die Untersuchung der Ingestion und des Agglomerationsverhaltens der TiO₂-Partikel in *C. elegans* und dem Einfluss akkumulierter Partikel auf die Nahrungsaufnahme des Organismus konnten mögliche Wirkmechanismen der beobachteten Toxizität des Nanomaterials aufgedeckt werden. Durch eine Agglomeration an den sulfathaltigen Glycoproteinen der Glykokalyx agglomerieren die TiO₂-Partikel danach an den intestinalen Zellen im Darmlumen von *C. elegans*. Durch ihre negative Nettoladung binden sie dort bevorzugt divalente Ionen wie Ca²⁺, die für die Steuerung der Defäkation in *C. elegans* verantwortlich sind. Sorbieren die Partikel Ca²⁺ so stark, dass deren Verfügbarkeit gesenkt wird, so kommt es nicht mehr zu einer Induktion der Defäkation und folglich zu einer Hemmung der weiteren Nahrungsaufnahme. Eine Untersuchung der zellinternen Ca²⁺-Konzentration unter Einwirkung im Darm akkumulierter TiO₂-Partikel könnte diese Hypothese stützen. Teramoto and Iwasaki (2006) gelang die Aufzeichnung der Entwicklung der internen Calciumkonzentration im Rhythmus der Defäkation beispielsweise durch ein Ca²⁺-sensitives Fluoreszenzsystem (Ca²⁺-sensitive-fluorescent cameleon system).

Die Studie konnte zudem belegen, dass die Einwirkung simulierter Sonnenstrahlung die Toxizität des Nanomaterials erhöht, während Hinweise auf eine intrazelluläre Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies ausblieben. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass die photokatalytisch aktiven Nanopartikel extrazellulär eine chronische Schädigung der Organismen induzieren. Als Nachweis der hier postulierten These, dass die Bildung von ROS an der apikalen Membran der Epithelzellen von *C. elegans* zu einer Peroxidation der Lipide und Proteine führt, könnte die Untersuchung der Malonaldehyd- und Protein-carbonylkonzentration herangezogen werden. Malonaldehyd ist ein Produkt der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wie sie besonders in den Phospholipiden von Zellmembranen vorliegen und kann als Indikator für Lipidperoxidation durch oxidativen Stress eingesetzt werden. Proteincarbonyle sind Oxidationsprodukte von Proteinen, die ebenfalls unter Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies gebildet werden. Xiong et al. (2011) konnten im Zebrafisch (*Danio rerio*) eine Erhöhung beider Parameter durch Exposition gegenüber nTiO₂ nachweisen, die durch Einwirkung von Licht verstärkt wurde. Eine vergleichbare Reaktion wird für *C. elegans* erwartet und könnte die Hypothese dieser Arbeit belegen.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass es von großer Bedeutung ist, die Effekte der Nanomaterialien unter variierenden Umweltbedingungen zu testen. Tyne et al. (2013) entwickelten jüngst ein neues Testmedium für die Untersuchung der Effekte von Nanomaterialien an *C. elegans*, das die Eigenschaften von natürlichem Porenwasser

simuliert und eine Anpassung umweltrelevanter Parameter erlaubt. Auf diese Weise können Parameter wie beispielsweise der pH-Wert oder der organische Kohlenstoffgehalt variiert werden und ermöglichen eine Bestimmung der Effekte unter umweltnahen Bedingungen.

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann nun auch eine weiterführende Untersuchung der Effekte von Nanopartikeln auf *C. elegans* in einer partikulären Matrix durchgeführt werden, also als Sediment- oder Bodentest. Erkenntnisse der Effekte in diesen Kompartimenten sind bis heute sehr lückenhaft und müssen dringend ergänzt werden, um die Risiken von Nanomaterialien für diese potentiell hochbelasteten Lebensräume zu bewerten.

7 Referenzen

- Ahlf W, Matthäi A, Offermann K (2009) Bedeutung der Expositionswege auf Bioakkumulation und Wirkung in *C. elegans*. Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung: 245-247.
- Altun ZF, Hall DH (2009) Introduction. WormAtlas.
- Amiano I, Olabarrieta J, Vitorica J, Zorita S (2012) Acute toxicity of nanosize TiO₂ to *Daphnia magna* under UVA irradiation. Environmental Toxicology and Chemistry 31: 2564-2566.
- American Society for Testing and Materials. (2006) Standard terminology relating to nanotechnology. E 2456-06. West Conshohocken, PA.
- Avery L, Shtonda BB (2003) Food transport in the *C. elegans* pharynx. Journal of Experimental Biology 206:2441-2457.
- Avery L, Thomas JH (1997) Feeding and Defecation. In: The Nematode *Celegans* II (Riddle, D., ed), pp 679-716 Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bar-Ilan O, Chuang CC, Schwahn DJ, Yang S, Joshi S, Pedersen JA, Hamers RJ, Peterson RE, Heideman W (2013) TiO₂ Nanoparticle Exposure and Illumination during Zebrafish Development: Mortality at Parts per Billion Concentrations. Environmental Science & Technology.
- Baun A, Sørensen SN, Rasmussen RF, Hartmann NB, 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.
- Becker AM, Heise S, Ahlf W (2002) Effects of Phenanthrene on *Lemna minor* in a Sediment-Water System and the Impacts of UVB. Ecotoxicology and Environmental Safety 11:343-348.
- Bennett SW, Zhou D, Mielke R, Keller AA (2012) Photoinduced Disaggregation of TiO₂ Nanoparticles Enables Transdermal Penetration. PLoS ONE 7:e48719.
- Betts JN, Johnson MG, Rygielwicz PT, King GA, Andersen CP (2013) Potential for metal contamination by direct sonication of nanoparticle suspensions. Environmental Toxicology and Chemistry.
- Bickley RI, Gonzalez-Carreño T, Lees JS, Palmisano L, Tilley RJD (1991) A structural investigation of titanium dioxide photocatalysts. Journal of Solid State Chemistry 92:178-190.

- Bigorgne E, Foucaud L, Caillet C, Giambérini L, Nahmani J, Thomas F, Rodius F (2012) Cellular and molecular responses of *E. fetida* coelomocytes exposed to TiO₂ nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 14:1-17.
- Brenner S (1994) The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.
- British Standards Institution (BSI). (2007) Terminology for nanomaterials. PAS 136:2007. London, UK.
- BUND (2008) "Aus dem Labor auf dem Teller" - Studie zu Nanotechnologie im Lebensmittelsektor.
- Caballero-Díaz E, Simonet B, Valcárcel M (2013) The social responsibility of Nanoscience and Nanotechnology: an integral approach. *Journal of Nanoparticle Research* 15:1-13.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3:3-8.
- Chen G, Zhao J, Liu X, Gao G, Huang J, Li G (2007) Electrochemical sensing DNA damage with nano-titanium dioxide and repair with a medicinal herb species resveratrol. *Journal of Biotechnology* 127:653-656.
- Chen J, Dong X, Xin Y, Zhao M (2011) Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. *Aquatic Toxicology* 101:493-499.
- Chen KL, Elimelech M (2006) Aggregation and Deposition Kinetics of Fullerene (C₆₀) Nanoparticles. *Langmuir* 22:10994-11001.
- Chen KL, Mylon SE, Elimelech M (2006) Aggregation Kinetics of Alginate-Coated Hematite Nanoparticles in Monovalent and Divalent Electrolytes. *Environmental Science & Technology* 40:1516-1523.
- Clément L, Hurel C, Marmier N (2013) Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants – Effects of size and crystalline structure. *Chemosphere* 90:1083-1090.
- Clokey GV, Jacobson LA (1986) The autofluorescent "lipofuscin granules" in the intestinal cells of *Caenorhabditis elegans* are secondary lysosomes. *Mechanisms of Ageing and Development* 35:79-94.
- Colvin VL (2003) The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology* 21:1166-1170.
- Crane M, Handy R, Garrod J, Owen R (2008) Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* 17:421-437.

- Cushen M, Kerry J, Morris M, Cruz-Romero M, Cummins E (2012) Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology* 24:30-46.
- Dal Santo P, Logan MA, Chisholm AD, Jorgensen EM (1999) The Inositol Trisphosphate Receptor Regulates a 50-Second Behavioral Rhythm in *C. elegans*. *Cell* 98:757-767.
- Delgado A, Matijević E (1991) Particle Size Distribution of Inorganic Colloidal Dispersions: A comparison of different techniques. *Particle & Particle Systems Characterization* 8:128-135.
- Derjaguin B, Landau L (1941) Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physico Chimica* 14:733–762.
- Diamond SA (2003) Photoactivated toxicity in aquatic environments. In: *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*(Helbling, E. W. and Zagarese, H., eds), pp 221-249 Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Dong D, Li P, Li X, Xu C, Gong D, Zhang Y, Zhao Q, Li P (2010) Photocatalytic degradation of phenanthrene and pyrene on soil surfaces in the presence of nanometer rutile TiO₂ under UV-irradiation. *Chemical Engineering Journal* 158:378-383.
- Dunford R, Salinaro A, Cai L, Serpone N, Horikoshi S, Hidaka H, Knowland J (1997) Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Letters* 418:87-90.
- Espelt MV, Estevez AY, Yin X, Strange K (2005) Oscillatory Ca²⁺ Signaling in the Isolated *Caenorhabditis elegans* Intestine: Role of the Inositol-1,4,5-trisphosphate Receptor and Phospholipases C β and γ. *The Journal of General Physiology* 126:379-392.
- Fabrega J, Fawcett SR, Renshaw JC, Lead JR (2009) Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology* 43:7285-7290.
- Fang-Yen C, Avery L, Samuel ADT (2009) Two size-selective mechanisms specifically trap bacteria-sized food particles in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:20093-20096.
- Farkas J, Nizzetto L, Thomas KV (2012) The binding of phenanthrene to engineered silver and gold nanoparticles. *Science of The Total Environment* 425:283-288.
- Farrell REJ (1993) *RNA Methodologies*. pp 47-92 San Diego New York: Academic Press.
- Fent K (2007) *Ökotoxikologie* 3. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.

- Garigan D, Hsu A-L, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Kenyon C (2002) Genetic Analysis of Tissue Aging in *Caenorhabditis elegans*: A Role for Heat-Shock Factor and Bacterial Proliferation. *Genetics* 161:1101-1112.
- 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.
- Gratzer H, Ahlf W (2001) Adjustment of a Formulated Sediment for Sediment Testing with *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 29:41-46.
- Gurr J-R, Wang ASS, Chen C-H, Jan K-Y (2005) Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213:66-73.
- Handy RD, Cornelis G, Fernandes T, Tsyusko O, Decho A, Sabo-Attwood T, Metcalfe C, Steevens JA, Klaine SJ, Koelmans AA, Horne N (2012) Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: Practical experiences and recommendations from the bench. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31:15-31.
- Handy RD, Kammer F, Lead J, Hassellöv M, Owen R, Crane M (2008) The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology* 17:287-314.
- Hao L, Wang Z, Xing B (2009) Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences* 21:1459-1466.
- Hartmann NB, Baun A (2010) The nano cocktail: Ecotoxicological effects of engineered nanoparticles in chemical mixtures. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6:311-313.
- Henry TB, Menn F-M, Fleming JT, Wilgus J, Compton RN, Sayler GS (2007) Attributing Effects of Aqueous C₆₀ Nano-Aggregates to Tetrahydrofuran Decomposition Products in Larval Zebrafish by Assessment of Gene Expression. *Environmental Health Perspectives* 115:1059-1065.
- Hidalgo E, Ding H, Dimple B (1997) Redox Signal Transduction: Mutations Shifting [2Fe-2S] Centers of the SoxR Sensor-Regulator to the Oxidized Form. *Cell* 88:121-129.
- Hirschmann H (1952) Die Nematoden der Wassergrenze mittelfränkischer Gewässer. *Zoologische Jahrbücher Systematik* 81:313-436.
- Hope IA (1999) Background on *Caenorhabditis elegans*. In: *C. elegans - A Practical Approach* (Hope, I. A., ed), pp 1-15: Oxford University Press.

- Horst AM, Neal AC, Mielke RE, Sislian PR, Suh WH, Mädler L, Stucky GD, Holden PA (2010) Dispersion of TiO₂ Nanoparticle Agglomerates by *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology 76:7292-7298.
- Hu CW, Li M, Cui YB, Li DS, Chen J, Yang LY (2010) Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. Soil Biology and Biochemistry 42:586-591.
- Huang K, Chen L, Xiong J, Liao M (2012) Preparation and Characterization of Visible-Light-Activated Fe-N Co-Doped TiO₂ and Its Photocatalytic Inactivation Effect on Leukemia Tumors. International Journal of Photoenergy 2012:1-9.
- Hund-Rinke K, Simon M (2006) Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO₂) on Algae and Daphnids (8 pp). Environmental Science and Pollution Research 13:225-232.
- Hwang ET, Lee JH, Chae YJ, Kim BC, Sang B-I, Gu MB (2007) Analysis of nanoparticles' toxic modes of actions by using recombinant bioluminescent bacteria. Abstract. In: American Institute of Chemical Engineers Meeting Salt Lake City, UT, USA.
- Imlay JA (2003) Pathways of Oxidative Damage. Annual Review of Microbiology 57:395-418.
- ISO 10872 (2010) Water quality — Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda).
- Jang H, Pell LE, Korgel BA, English DS (2003) Photoluminescence quenching of silicon nanoparticles in phospholipid vesicle bilayers. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 158:111-117.
- Jin C-Y, Zhu B-S, Wang X-F, Lu Q-H (2008) Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. Chemical Research in Toxicology 21:1871-1877.
- Johnston AD, Ebert PR (2012) The Redox System in *C. elegans*, a Phylogenetic Approach. Journal of Toxicology 2012:20.
- Kaegi R, Ulrich A, Sinnert B, Vonbank R, Wichser A, Zuleeg S, Simmler H, Brunner S, Vonmont H, Burkhardt M, Boller M (2008) Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. Environmental Pollution 156:233-239.
- Kahru A, Dubourguier H-C (2010) From ecotoxicology to nanoecotoxicology. Toxicology 269:105-119.
- Kahru A, Ivask A (2012) Mapping the Dawn of Nanoecotoxicological Research. Accounts of Chemical Research 46: 823–833.
- Kato H, Suzuki M, Fujita K, Horie M, Endoh S, Yoshida Y, Iwashashi H, Takahashi K, Nakamura A, Kinugasa S (2009) Reliable size determination of nanoparticles using

- dynamic light scattering method for in vitro toxicology assessment. *Toxicology in Vitro* 23:927-934.
- Kharu A, Dubourguier HC (2009) From ecotoxicology to nanoecotoxicology.
- Kim JS, Yoon T-J, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee J-K, Cho MH (2006) Toxicity and Tissue Distribution of Magnetic Nanoparticles in Mice. *Toxicological Sciences* 89:338-347.
- Kim KT, Klaine SJ, Cho J, Kim S-H, Kim SD (2010) Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Science of The Total Environment* 408:2268-2272.
- Kiyama Y, Miyahara K, Ohshima Y (2012) Active uptake of artificial particles in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Experimental Biology* 215:1178-1183.
- Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR (2008) Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27:1825-1851.
- Klaine SJ, Koelmans AA, Horne N, Carley S, Handy RD, Kapustka L, Nowack B, von der Kammer F (2012) Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31:3-14.
- Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F (2009) Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations—Many questions, some answers. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681:241-258.
- Li Y, Wang W, Wu Q, Li Y, Tang M, Ye B, Wang D (2012) Molecular Control of TiO₂ NPs Toxicity Formation at Predicted Environmental Relevant Concentrations by Mn-SODs Proteins. *PLoS ONE* 7:e44688.
- Lin S, Keskar G, Wu Y, Wang X, Mount AS, Klaine SJ, Moore JM, Rao AM, Ke P-C (2006) Detection of phospholipid-carbon nanotube translocation using fluorescence energy transfer. *Applied Physics Letters* 89:143118-143118-143113.
- Lovern SB, Klaper R (2006) *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:1132-1137.
- Lundstedt S, White PA, Lemieux CL, Lynes KD, Lambert IB, Öberg L, Haglund P, Tysklind M (2007) Sources, Fate, and Toxic Hazards of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) at PAH- contaminated Sites. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 36:475-485.

- Lyon DY, Brunet L, Hinkal GW, Wiesner MR, Alvarez PJJ (2008) Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions (nC₆₀) Is Not Due to ROS-Mediated Damage. *Nano Letters* 8:1539-1543.
- 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.
- Maness PC, Smolinski S, Blake DM, Huang Z, Wolfrum EJ, Jacoby W (1999) Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and environmental microbiology* 65: 4094-4098.
- Matthäi A (2009) Zur Bedeutung der Schadstoffexposition auf die Genexpression und Reproduktion von *Caenorhabditis elegans*. Dissertation.
- McGhee JD (2007) The *C. elegans* intestine. In: *WormBook*, (The *C. elegans* Research Community, ed) <http://www.wormbook.org>.
- Medebach M, Moitzi C, Freiburger N, Glatter O (2007) Dynamic light scattering in turbid colloidal dispersions: A comparison between the modified flat-cell light-scattering instrument and 3D dynamic light-scattering instrument. *Journal of Colloid and Interface Science* 305:88-93.
- Meena R, Pal R, Pradhan SN, Rani M, Paulraj R (2012) Comparative study of TiO₂ and TiSiO₄ nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis of HEK-293 cells. *Advanced Material Letters* 3:459-465.
- Menzel R, Bogaert T, Achazi R (2001) A Systematic Gene Expression Screen of *Caenorhabditis elegans* Cytochrome P450 Genes Reveals CYP35 as Strongly Xenobiotic Inducible. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 395:158-168.
- Meyer JN, Lord CA, Yang XY, Turner EA, Badireddy AR, Marinakos SM, Chilkoti A, Wiesner MR, Auffan M (2010) Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquatic Toxicology* 100:140-150.
- Miller KG, Emerson MD, Rand JB (1999) Gα and Diacylglycerol Kinase Negatively Regulate the Gα Pathway in *C. elegans*. *Neuron* 24:323-333.
- Minelli C, Tantra R (2012) Metal oxide particles catalyze photo-oxidation in environmental media. *Nanomaterials and the Environment* 3.
- Nakagawa Y, Wakuri S, Sakamoto K, Tanaka N (1997) The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 394:125-132.

- Oberdörster E, Zhu S, Blickley TM, McClellan-Green P, Haasch ML (2006) Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms. *Carbon* 44:1112-1120.
- Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H, (2005) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology* 2:1-8.
- Offermann K (2009) Die Bedeutung partikel-assoziierten Cadmiums für die Bioverfügbarkeit und Bioakkumulation im Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Dissertation.
- Offermann K, Matthäi A, Ahlf W (2009) Assessing the importance of dietborne cadmium and particle characteristics on bioavailability and bioaccumulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28:1149-1158.
- Office of the Federal Registration (OFR) Appendix A: priority pollutants. Fed Reg. 1982; 47:52309.
- Ottoufelling S, Von Der Kammer F, Hofmann T (2011) Commercial Titanium Dioxide Nanoparticles in Both Natural and Synthetic Water: Comprehensive Multidimensional Testing and Prediction of Aggregation Behavior. *Environmental Science & Technology* 45:10045-10052.
- Pfeiffer J, Johnson D, Nehrke K (2008) Oscillatory Transepithelial H⁺ Flux Regulates a Rhythmic Behavior in *C. elegans*. *Current Biology* 18:297-302.
- Pluskota A, Horzowski E, Bossinger O, von Mikecz A (2009) In *Caenorhabditis elegans* Nanoparticle-Bio-Interactions Become Transparent: Silica-Nanoparticles Induce Reproductive Senescence. *PLoS ONE* 4:1-9.
- Pobořilová Z, Opatrilova R, Babula P (2013) Toxicity of aluminium oxide nanoparticles demonstrated using a BY-2 plant cell suspension culture model. *Environmental and Experimental Botany*.
- Quik JTK, Lynch I, Hoecke KV, Miermans CJH, Schamphelaere KACD, Janssen CR, Dawson KA, Stuart MAC, Meent DVD (2010) Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. *Chemosphere* 81:711-715.
- Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJF, Jha AN (2008) Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 640:113-122.
- Rendic S (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metabolism Reviews* 34:83-448.

- Roberts AP, Mount AS, Seda B, Souther J, Qiao R, Lin S, Ke PC, Rao AM, Klaine SJ (2007) In vivo Biomodification of Lipid-Coated Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology* 41:3025-3029.
- Robichaud CO, Uyar AE, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR (2009) Estimates of Upper Bounds and Trends in Nano-TiO₂ Production As a Basis for Exposure Assessment. *Environmental Science & Technology* 43:4227-4233.
- Roh J-Y, Park Y-K, Park K, Choi J (2010) Ecotoxicological investigation of CeO₂ and TiO₂ nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29:167-172.
- Rosenfeldt RR, Bundschuh M, Seitz F, Schulz R (2012) Do TiO₂ nanoparticles alter heavy metal toxicity? – A factorial approach using *Daphnia magna* (Poster). In: 6th SETAC World Congress, p 477 Berlin.
- Sass J (2007) Nanotechnology's invisible threat: Small science big consequences. NRDC Issue Paper Natural Resources Defense Council, New York, NY, USA.
- Schimpf J, Sames K, Zwilling R (1999) Proteoglycan Distribution Pattern During Aging in the Nematode *Caenorhabditis elegans*: An Ultrastructural Histochemical Study. *Histochem J* 31:285-292.
- Schmid O, Möller W, Semmler-Behnke M, A. Ferron G, Karg E, Lipka J, Schulz H, Kreyling WG, Stoeger T (2009) Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers* 14:67-73.
- Seitz F, Bundschuh M, Rosenfeldt RR, Schulz R (2013) Nanoparticle toxicity in *Daphnia magna* reproduction studies: The importance of test design. *Aquatic Toxicology* 126:163-168.
- Sese BT, Grant A, Reid BJ (2009) Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 72:1168-1180.
- Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Laird Forrest M, Stroeve P, Mahmoudi M (2012) Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews* 41:2323-2343.
- Shaw BJ, Handy RD (2011) Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. *Environment International* 37:1083-1097.
- Shi JP, Evans DE, Khan AA, Harrison RM (2001) Sources and concentration of nanoparticles (< 10 nm diameter) in the urban atmosphere. *Atmospheric Environment* 35:1193-1202.

- Sies H (1993) Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 299:183-191.
- Sies H, Menck CFM (1992) Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research/DNAging* 275:367-375.
- Smith KEC, Oostingh GJ, Mayer P (2009) Passive Dosing for Producing Defined and Constant Exposure of Hydrophobic Organic Compounds during in Vitro Toxicity Tests. *Chemical Research in Toxicology* 23:55-65.
- Spohn P, Hirsch C, Hasler F, Bruinink A, Krug HF, Wick P (2009) C₆₀ fullerene: A powerful antioxidant or a damaging agent? The importance of an in-depth material characterization prior to toxicity assays. *Environmental Pollution* 157:1134-1139.
- Sun H, Zhang X, Niu Q, Chen Y, Crittenden J (2007) Enhanced Accumulation of Arsenate in Carp in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Water Air Soil Pollution* 178:245-254.
- Teramoto T, Iwasaki K (2006) Intestinal calcium waves coordinate a behavioral motor program in *C. elegans*. *Cell Calcium* 40:319-327.
- Tervonen K, Waissi G, Petersen EJ, Akkanen J, Kukkonen JVK (2010) Analysis of fullerene-C₆₀ and kinetic measurements for its accumulation and depuration in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:1072-1078.
- Tiede K, Boxall ABA, Tiede D, Tear SP, David H, Lewis J (2009) A robust size-characterisation methodology for studying nanoparticle behaviour in 'real' environmental samples, using hydrodynamic chromatography coupled to ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24:964-972.
- Traunspurger W (1997) Bathymetric, seasonal and vertical distribution of feeding-type of nematodes in an oligotrophic lake. *Vie et Milieu* 47:1-7.
- Traunspurger W, Steinberg C, Bongers T (1995) Nematoden in der ökotoxikologischen Forschung. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 7:74-83.
- Tyne W, Lofts S, Spurgeon DJ, Jurkschat K, Svendsen C (2013) A new medium for *Caenorhabditis elegans* toxicology and nanotoxicology studies, designed to better reflect natural soil conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Valsami-Jones E, Berhanu D, Dybowska A, Misra S, Boccaccini AR, Tetley TD, Luoma SN, Plant JA (2008) Nanomaterial synthesis and characterization for toxicological studies: TiO₂ case study. *Mineralogical Magazine* 72:515-519.
- Van Raamsdonk JM, Hekimi S (2012) Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:5785-5790.

- Verwey E, Overbeek J (1948) Theory of the stability of lyophobic colloids: the interaction of sol particles having an electric double layer. Elsevir, New York 205 pp.
- Waissi-Leinonen GC, Petersen EJ, Pakarinen K, Akkanen J, Leppänen MT, Kukkonen JVK (2012) Toxicity of fullerene (C60) to sediment-dwelling invertebrate *Chironomus riparius* larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31:2108-2116.
- Wamer WG, Yin J-J, Wei RR (1997) Oxidative Damage to Nucleic Acids Photosensitized by Titanium Dioxide. *Free Radical Biology and Medicine* 23:851-858.
- Wang H, Wick RL, Xing B (2009) Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution* 157:1171-1177.
- Wang J (2009) Can Man-Made Nanomachines Compete with Nature Biomotors? *ACS Nano* 3:4-9.
- Wen S, Zhao J, Sheng G, Fu J, Peng Pa (2002) Photocatalytic reactions of phenanthrene at TiO₂/water interfaces. *Chemosphere* 46:871-877.
- Wernersson A-S (2003) Predicting petroleum phototoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54:355-365
- Wu Q, Wang W, Li Y, Li Y, Ye B, Tang M, Wang D (2012) Small sizes of TiO₂-NPs exhibit adverse effects at predicted environmental relevant concentrations on nematodes in a modified chronic toxicity assay system. *Journal of Hazardous Materials* 243:161-168.
- Xiong D, Fang T, Yu L, Sima X, Zhu W (2011) Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of The Total Environment* 409:1444-1452.
- Yan J, Wang L, Fub PP, Yu H (2004) Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutat Res* 10:99-108.
- Yang K, Lin D, Xing B (2009) Interactions of Humic Acid with Nanosized Inorganic Oxides. *Langmuir* 25:3571-3576.
- Yang S, Bar-Ilan O, Peterson RE, Heideman W, Hamers RJ, Pedersen JA (2013) Influence of Humic Acid on Titanium Dioxide Nanoparticle Toxicity to Developing Zebrafish. *Environmental Science & Technology*.
- Yeates GW, Bongers T, De Goede RGM, Freckman DW, Georgieva SS (1993) Feeding Habits in Soil Nematode Families and Genera-An Outline for Soil Ecologists. *Journal of Nematology* 25:315-331.
- Yeo M-K, Nam D-H (2013) Influence of different types of nanomaterials on their bioaccumulation in a paddy microcosm: A comparison of TiO₂ nanoparticles and nanotubes. *Environmental Pollution* 178:166-172.

- Zhang T, Oyama T, Aoshima A, Hidaka H, Zhao J, Serpone N (2001) Photooxidative N-demethylation of methylene blue in aqueous TiO₂ dispersions under UV irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 140:163-172.
- Zhang X, Sun H, Zhang Z, Niu Q, Chen Y, Crittenden JC (2007) Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere* 67:160-166.
- Zhu X, Zhou J, Cai Z (2011) The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Marine Pollution Bulletin* 63:334-338.
- Zullini A (1988) The ecology of the Lambro River. *Rivista di Idrobiologia* 27:39-58.

8 Anhang

1. Geräte

- Ultraschallbad Bandelin Sonorex Digitex, Typ DT 100 H (Leistung 80/320W; Frequenz 35 kHz)
- UV-HPLC von Merck Hatichi
 - Pumpe: L-7100
 - Interface: D-7000
 - UV-Detektor: L-7400
 - Säule: LiChroCart 125-4, Lichrosphere® 100, RP-18 (5µm)
- GC-MS von Agilent Technologies
 - MS: 5975C inert XL MSD with triple axis Detector
 - GC: 7890A GC-System
 - Sampler: MPS 2 XL (Multi Purpose Sampler), Gerstel
 - Software: Gerstel Maestro Version 1.3.7.69/3.5
- Zetasizer Nano ZS, Malvern
- Elektronenmikroskop Leo Gemini 1530 mit EDX
- Eppendorf Biophotometer
- Eppendorf Bio Zentrifuge
- Biorad iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System
- Q-Sun Xe - 1-B mit Chiller, Q-Labs Deutschland,
 - Filterausstattung: Daylight Q
- Vakuumpumpe N86KN.18, KNF LAB Laboport
- Cell density meter Ultrospec 10, Amerham Biosciences
- Photometer UV-1800 240 V IVDD, Shimadzu
- pH-Meter Seven Easy pH, Méttrler Toledo
- Zentrifuge Heraeus Multifuge 1S-R, Thermo Scientific
- Inkubator APT.Line™ KB53, Binder
- Kern 770, Feinwaage

Mikroskope

- Wiloskop, Hund Wetzlar mit Schwanenhalslampe FLQ 150
- Olympus SZ61 mit Lampe KL1500LCD von Olympus
 - Kamera: ALTRA₂₀ Soft Imaging System
- Wilovert®, Hund Wetzlar
- Fluoreszenzmikroskop I: **Olympus BX 41 TF**

Brenner: Olympus U-RFL-T

Kamera: Olympus D71

Objektive: UPLFLN10x, 40x und 100xO2

- Fluoreszenzmikroskop II: **Olympus IX 81** mit Steuerkarte IX2-UCB
Controller: STC_MC
Brenner: cell IR MT20
Prozessor: CTR_R_DIG Olympus (Siemens)
Software: Olympus ‚xcellence‘ mit Erweiterung zur Partikelanalyse
Objektive: - UPLanFLN 10x/0.33
- UPlanSApo 20x/0.75
- UPlan 40x/0.13
- UPlanSApo 40x/0.95

2. Einstellungen für die DLS-Messungen

Name:

nTiO₂: TiO₂ P25

bTiO₂: Anatas

Brechungsindex RI:

nTiO₂: 2,7

bTiO₂:

Absorption:

0,01

Dispersant

Dispersant: Water

Temperature: 25°C

Viscosity: 0,8872

RI: 1,33

General Options

Sample viscosity options: use dispersant viscosity as sample

Temperature

Temperature: 25°C

Equilibration time: 15min

Cell

Cell type: Disposable sizing cuvette

Measurement

Measurement angle: 173 Backscatter

Measurement duration: 1*60sec

Number of Measurements: 10

Delay between measurements: 2 sec

Advanced

Measurement duration

Extend duration for large particles: No

Measurement setting

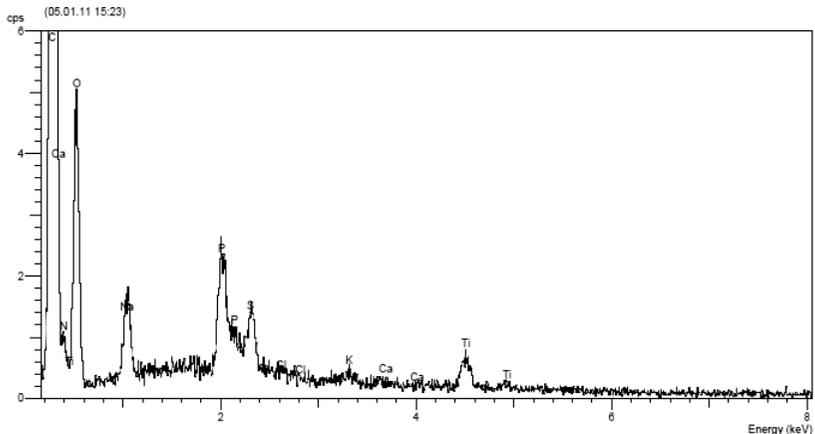
Positioning method: seek for optimal position

Automatic attenuation selection: Yes

Data processing

Analysis model: General purpose

3. EDX-Spektrum der TiO₂-Agglomeration in *C. elegans*



3. Gensequenzen und Positionen der ausgewählten Primer

Im folgenden sind die codierenden Sequenzen (CDS) der untersuchten Gene aufgeführt, die über die Homepage des ‚National Center for Biotechnology Information (NCBI)‘⁶ bezogen wurden. Farblich abgesetzt sind die ausgewählten Primerpaare, die die amplifizierte Region umschließen.

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

act-1 CDS

```

1 atgtgtgacg acgaggttgc cgctcttgtt gtagacaatg gatccggaat gtgcaaggcc
61 ggatttcgcc gagacgacgc tccacgcgcc gtgttcccat ccattgtcgg aagaccacgt
121 catcaaggag tcatggtcgg tatgggacag aaggactcgt acgtcggaga cgaggcccaa
181 tccaagagag gtatccttac cctcaagtac ccaattgagc acggtatcgt caccaactgg
241 gatgatattg agaagatctg gcatcacacc ttctacaatg agcttcgtgt tgccccagaa
301 gagcacccag tcctcctcac tgaagcccca ctcaatccaa aggctaaccg tgaagaatg
361 acccaaatca tgttcgagac cttcaacacc ccagccatgt atgtcgccat ccaagctgtc
421 ctctcccctc acgcttccgg acgtaccacc ggagtctgcc tcgactctgg agatgggtgc
481 acccacaccg tcccaatcta cgaaggatat gccctccac acgccatcct ccgtcttgac
541 ttggctggac gtgatcttac tgattacctc atgaagatcc ttaccgagcg tggttactct
601 ttaccacca ccgctgagcg tgaatcgtc cgtgacatca aggagaagct ctgctacgtc
661 gccctcgact tcgagcaaga aatggccacc gccgcttctt cctcttccct cgagaagtcc
721 tacgaacttc ctgacggaca agtcatcacc gtcggaaacg aacgtttccg ttgccagag
781 gctatgttcc agccatcctt cttgggtatg gagtccgccc gaatccacga gacttctac
841 aactccatca tgaagtgcga cattgatatc cgtaaggact tgtacgcaa cactgttctt
901 tccggaggaa ccacatgta ccaggaatt gctgatgta tgcagaagga aatcaccgct
961 cttgcccat caacatgaa gatcaagatc atcgcccac cagagcgcaa gtactccgtc
1021 tggatcggag gatctatcct cgcttccctc tccaccttcc aacagatgtg gatctccaag
1081 caagaatcag acgagtcggg cccatccatc gttcaccgca agtgccttcta a

```

Primer

pro.: **ccccaccagagcgaagtaactccgtct**

rev.: **tggtggaagggtggagaggggaagcg**

sod-3 CDS

```

1 gttcgagaaa agtgaccgtt tgtcaaatct tctaattttc agtgaataaa atgctgcaat
61 ctactgctcg cactgcttca aagcttgctc aaccggttgc gggagttctc gccgtccgct
121 ccaagcacac tctcccagat ctcccattcg actatgcaga tttggaacct gtaatcagcc
181 atgaaatcat gcagcttcat catcaaaaagc atcatgccac ctacgtgaaac aatctcaatc
241 agatcgagga gaaacttcac gaggctgttt cgaaggggaa tctaaaagaa gcaattgtctc
301 tccaaccagc gctgaaattc aatgggtggtg gacacatcaa tcattctatc ttctggacca
361 acttggctaa ggatggtgga gaaccttcaa aggagctgat ggacactatt aagcgcgact
421 tcggttccct ggataacttg caaaaacgtc tttctgacat cactattgcg gttcaagggt
481 ctggctgggg atggttggga tattgcaaga aagacaaaat cttgaagatc gccacctgtg
541 caaaccagga tcctttggaa ggaatggctc cactttttgg aattgacgtt tgggagcacg
601 cctactactt gcagtacaaa aatgtccgcc cagactatgt ccatgctatt tggaaagattg
661 ccaactggaa gaatatcagc gagagatttg ccaatgctcg acaataaaag caggaaatat
721 tggaaatttc ggttttacga aaatattgaa gataattcag atgtagtta aaacgctgag
781 aattgtatt tttgtaattg tttaataaaa agaaccgaca gtttttctt atg

```

Primer

for: **aatgctgcaatctactgctcgca**

rev: **gtgtgcttgagcggacggc**

cyp35c1 CDS

```

1 atgtttttca ttctactatt tgtttccata atttcgttcc tgactgcccg tcaatttctg
61 aaggcaaaaa gacttccacc tggacctttt tcgctcccat taattggaaa tgctcatcaa
121 gttgtttatc aattgtggag aactggagga gttacaaata tgcttaatca tttcagaag
181 gaatatggag acattttcac attgtggttg ggaccaattc ctcatgtaaa tattacaac
241 tatgagctct cgcatagaag ttttgtgaaa aattccacaa aatatgccga taagcatgtt
301 tccccgatga ttgactatgt tagaaaagga aatggagtgt tcttctcgaa tggcgacaaa
361 tggcaggaaat tgagaagatt ctccatgta acgatgagaa atatgggaaat gggaagagat
421 ttgatggagg agaagattct aagtgaact gatgcaagat gtgctgaaat caatgaaaa
481 tctattgatg ggaccactgt ttacaagtg aatgaattct ttgatttaac tgttggaaat
541 atcattaaca atatgctctt aggatttca tttgatgaaa gaacaaaatc ccgatttctc
601 acaatgaac acatgtttga tgaaggaatg gataagatga caccactatt tttactctt
661 ccagtttggg ctcttcaaaa gtttctcgct aaagatttta attccattat aaaagatcag
721 tttgagataa ttgattatgt gtcagtggat gctataaaaa gatcaagaga tttcatgaat
781 ggtgactatg aaattgatcc aaataacgtt gaggatatcg ttgatgcctt tttattgaag
841 atgaaacaaa atccgaaaag tgatgtttat gatgagaaca atttgaaat gttgataact
901 gatctatgga taaccggcca agaaacaac acaacaactc tgggtgtctgc attcatccaa
961 tttttgaaca atccccaaat catggataca gttcagaaa agctcatcaa agtgactaac
1021 ggaggatctc gccaatatc tttgagagac aaaactgaaa ctcttattt aaatgcaaca
1081 attcgggaag tacaacgaca tgcacccatc ctcaatatca attttggcg gatcaataat
1141 gagccaacag taattggagg acatcctgtc gactcaggat gtttgattgc ttcccaattg
1201 agtgctcttc atacaaatga gaaaatctt gaaaatcctg agaaattcaa tccagaacga
1261 tttatacga acgaaaaatc tatgcaaaa accatcccgt ttggaattgg aaaaaggctc
1321 tgtctgggag aatctctagc aagagccgag ctgtatttaa tcattggaac cctactactc
1381 cgctataatt ttgaatcttc tgggaaaatg ccatccactc gagaaacctg tccgtttggc
1441 tttgccaaga gatgcgaagc cttcgacatg aaagtcacta aaatttaa

```

Primer

for.: **ccacctggaccttttctgctcccat**

rev.: **cctgcccatttgcgccattcgag**

Eigenschaften der ausgewählten Primer

Accession Nr.	Oligoname	Sequenz	Position	Tm(°C)	Ampfikonlänge (bp)	GC-Gehalt (%)	Länge (bp)	Annealingtemperatur	ts
NM_073418	ce_act1_pro	cccaccagagcgaaglaactcgcgtc	985-1021	65.59	70 bp	63	26	70.13	68,06
	ce_act1_rev	tgttgaaagtggaagcagggaaagcgc	1041-1064	60.52		58	24	66.00	
NM_171550	ce_cYP35c1_for	ccaacctggaaccttttgcctcccat	76-100	60.54	291 bp	56	25	66.26	65,33
	ce_cYP35c1_rev	cctgcacatttgicccattcagag	345-367	60.13		57	23	64.41	
NM_078363	ce_SOD3_for	aatgcgaatcactgcctcgca	50-72	60.07	167 bp	48	23	60.72	63,11
	ce_SOD3_rev	gtgtgctggagcggacggc	111-130	59.62		70	20	65.50	

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	Seite
Tab. 3.1	Eigenschaften der verwendeten TiO ₂ Materialien P25 und NM100	25
Tab. 3.2	Temperaturabweichungen von der eingestellten Solltemperatur von 20 °C im Probenraum des Q-Sun auf 24 Probenpositionen in °C.	34
Tab. 3.3	Vergleich der Temperaturverteilung im Probenraum auf 24 Probenpositionen in °C bei einer Solltemperatur von 20 °C in Abhängigkeit vom Probenblett.	35
Tab. 3.4	Strahlungsverteilung auf dem Probenblett im Q-Sun bei einer eingestellten Intensität von 0,2 W/m ² bei 340 nm.	35
Tab. 3.5	Abweichung der Strahlungsintensitäten vom Sollwert in W/m ² , Variationskoeffizient und maximale Abweichung in %.	36
Tab. 3.6	Bezeichnungen und Sequenzen der eingesetzten Primer	42
Tab. 3.7	Programm der quantitativen Real-Time-PCR	42
Tab. 3.8	Tabellarische Darstellung der Entwässerung von <i>C. elegans</i> für die KTP-Trocknung	46
Tab. 4.1	Polydispersitätsindizes (PDI), mittlerer hydrodynamischer Partikeldurchmesser und Standardabweichung (STABW) der nTiO ₂ - und bTiO ₂ -Suspensionen in Wasser.	55
Tab. 4.2	Polydispersitätsindizes (PDI), mittlerer hydrodynamischer Partikeldurchmesser und Standardabweichung (STABW) der nTiO ₂ - und bTiO ₂ -Suspensionen in M9-Medium.	55
Tab. 4.3	Durchmesser der nTiO ₂ -Aggregate in H ₂ O nach REM-Messung. Median, Quartile, Maximum, Minimum und Mittelwert in nm.	59
Tab. 4.4	Durchmesser der nTiO ₂ -Agglomerate in M9 nach REM-Messung. Median, Quartile, Maximum, Minimum und Mittelwert in nm.	60
Tab. 4.5	Durchmesser der bTiO ₂ -Agglomerate in H ₂ O nach REM-Messung. Median, Quartile, Maximum, Minimum und Mittelwert in nm.	60
Tab. 4.6	Durchmesser der bTiO ₂ -Agglomerate in M9 nach REM-Messung. Median, Quartile, Maximum, Minimum und Mittelwert in nm.	61
Tab. 4.7	Durchmesser der nTiO ₂ -Agglomerate im Testsystem nach 96 Stunden Inkubation- Ergebnisse der REM-Messung mit Median, Quartilen, Maxima, Minima und Mittelwerten in nm.	62

Tab. 4.8	Zetapotentiale in mV und Standardabweichung der nTiO ₂ - und bTiO ₂ -Partikel in Wasser bzw. M9-Medium.	62
Tab. 4.9	Wiederfindung von TiO ₂ in den Testsystemen für nTiO ₂ und bTiO ₂ aus Analysen mit und ohne Aufschluss.	64
Tab. 4.10	Partikelgrößen der TiO ₂ -Suspensionen einer Konzentration von 10 mg/l nach 2 bzw. 48 Stunden Inkubation im Testsystem mit E. coli-Bakterien und Cholesterol.	66
Tab. 4.11	Prozentualer Abbau von Methyleneblau (MB) durch nTiO ₂ (P25) und bTiO ₂ (NM100) als Indikator für die photokatalytische Aktivität.	85
Tab. 4.12	Zusammenfassung der Testparameter und der beobachteten Effekte	95
Tab. 5.1	Effekte von nTiO ₂ auf Aktivität bzw. Konzentration von Superoxid-dismutase in verschiedenen Testorganismen.	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Bezeichnung	Seite
Abb. 1.1	Schematische Darstellung der relativen Größe von Nanomaterialien aus Klaine et al. (2012).	2
Abb. 2.1	Anwendungsmöglichkeiten photokatalytischer Oberflächen aus nano-TiO ₂ . Quelle Fraunhofer-Allianz Photokatalyse.	5
Abb. 2.2	Schematische Darstellung der Photokatalyse an Titandioxidpartikeln. In Anlehnung an Huang et al. (2012).	6
Abb. 2.3	Schematische Darstellung möglicher Carriereffekte von Nanopartikeln durch zelluläre Aufnahme schadstoffbeladener Partikel über Endocytose oder Diffusion durch die Membran.	9
Abb. 2.4	Schematische Darstellung der Anatomie eines adulten Hermaphroditen aus ISO 10872.	11
Abb. 2.5	Reproduktionszyklus von <i>C. elegans</i> . Quelle Altun and Hall (2009)	12
Abb. 2.6	Schematische Darstellung der ROS Produktion und ihrer Detoxifikation in einer <i>C. elegans</i> Zelle frei nach Johnston and Ebert (2012).	15
Abb. 2.7	Strukturformeln der PAKs Fluoranthen, Benzo(a)pyren und Phenanthren mit ihren funktionellen Bereichen (Bay-regions).	16
Abb. 3.1	Schematische Darstellung der Durchführung des Nematodentests nach ISO 10872.	22
Abb. 3.2	Adulter Hermaphrodit, mikroskopische Aufnahme bei 100-fach.	24
Abb. 3.3	Schematische Darstellung der Charakterisierung der TiO ₂ -Materialien	26
Abb. 3.4	Schematische Darstellung der Abscherschicht eines Partikels in einem ionenhaltigen Medium und der Ausbildung des Zetapotenzials (bearbeitet nach www.malvern.de).	30
Abb. 3.5	Spektrum der Strahlungsintensitäten des simulierten Sonnenlichts im Q-Sun Xe-1-B mit Daylight Q Filterausstattung bei einer eingestellten Intensität von 0,68 W/m ² bei 340 nm.	33
Abb. 3.6	Schematische Darstellung des Q-Sun Aufbaus mit Xenonbogenlampe, Probenraum und Kühlluftstrom.	34
Abb. 3.7	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Einfluss von Partikelgröße und Agglomeration“	48

Abb. 3.8	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Co-Kontamination“	48
Abb. 3.9	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Einfluss von SSR“	49
Abb. 3.10	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Vorbestrahlung von Phenanthren und nTiO ₂ “	50
Abb. 3.11	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus „Simultane Bestrahlung von Phenanthren und nTiO ₂ “	50
Abb. 4.1	Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von nTiO ₂ suspendiert in Wasser (rechts) und M9-Medium (links).	54
Abb. 4.2	Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von bTiO ₂ suspendiert in Wasser (rechts) und M9-Medium (links).	54
Abb. 4.3	Partikelgrößenverteilung einer 2 mg/l nTiO ₂ -Suspension in H ₂ O dargestellt als normalisierte mittlere Intensitäten.	56
Abb. 4.4	Partikelgrößenverteilung einer 1 mg/l nTiO ₂ -Suspension in M9 dargestellt als normalisierte mittlere Intensitäten.	56
Abb. 4.5	Partikelgrößenverteilung einer 60 mg/l nTiO ₂ -Suspension in H ₂ O dargestellt als normalisierte mittlere Intensitäten.	57
Abb. 4.6	Partikelgrößenverteilung einer 30 mg/l nTiO ₂ -Suspension in M9 dargestellt als normalisierte mittlere Intensitäten.	57
Abb. 4.7	DLS Messungen von P25 Suspensionen im Testmedium M9 nach 0, 24, 48, 72 und 96 h.	58
Abb. 4.8	20 mg/l TiO ₂ -Suspension in H ₂ O bei 20.000-facher Vergrößerung durch ‚In-Lens Detektor‘, mit 6 nm Gold beschichtet.	59
Abb. 4.9	Wiederfindung von Titandioxid in den nTiO ₂ -Testansätzen.	63
Abb. 4.10	Wiederfindung von Titandioxid in den bTiO ₂ -Testansätzen.	64
Abb. 4.11	Agglomeration einer bTiO ₂ -Suspension (10 mg/l) mit <i>E. coli</i> nach 2-stündiger Inkubation. REM-Aufnahme mit ‚In Lens-Detektor‘, Vergrößerung 20.000-fach.	65
Abb. 4.12	Agglomeration einer nTiO ₂ -Suspension (10 mg/l) mit <i>E. coli</i> nach 48-stündiger Inkubation. REM-Aufnahme mit ‚In Lens-Detektor‘, Vergrößerung 20.000-fach	65
Abb. 4.13	Effekte von nTiO ₂ auf Wachstum, Reproduktion und Fertilität von <i>C. elegans</i> im Dunkeln.	67
Abb. 4.14	Effekte von nTiO ₂ auf Wachstum, Reproduktion und Fertilität von <i>C. elegans</i> im Dunkeln.	67

Abb. 4.15	Effekte von bTiO ₂ auf Wachstum, Reproduktion und Fertilität von <i>C. elegans</i> im Dunkeln.	68
Abb. 4.16	Reproduktionshemmung (n=4) von nTiO ₂ gegen die sekundäre Partikelgröße nach DLS der jeweiligen Konzentration.	68
Abb. 4.17	Reproduktionshemmung (n=4) von bTiO ₂ gegen die sekundäre Partikelgröße nach DLS der jeweiligen Konzentration.	69
Abb. 4.18	Stereomikroskopische Aufnahme von <i>C. elegans</i> bei 60-facher Vergrößerung.	69
Abb. 4.19	<i>C. elegans</i> nach 4,75 h Exposition in nTiO ₂ ohne <i>E. coli</i> .	70
Abb. 4.20	<i>C. elegans</i> nach Exposition in 100 mg/l nTiO ₂ über 240 Stunden mit <i>E. coli</i> .	70
Abb. 4.21	<i>C. elegans</i> nach Exposition in 100 mg/l bTiO ₂ über 96 Stunden über 240 Stunden mit <i>E. coli</i> .	71
Abb. 4.22	EDX-Mapping von <i>C. elegans</i> nach 96-stündiger Exposition gegenüber 20 mg/L TiO ₂ .	72
Abb. 4.23	Hemmung der Nahrungsaufnahme: <i>C. elegans</i> nach 10 Minuten Exposition gegenüber fluoreszierenden Mikropartikeln.	73
Abb. 4.24	Phenanthrenkonzentrationen im Testverlauf.	75
Abb. 4.25	Hemmung von Wachstum, Reproduktion und Fertilität von <i>C. elegans</i> durch Phenanthren im Dunkeln.	77
Abb. 4.26	Hemmung der Reproduktion von <i>C. elegans</i> durch Phenanthren und nTiO ₂ im Dunkeln.	77
Abb. 4.27	Hemmung der Reproduktion von <i>C. elegans</i> durch Phenanthren und nTiO ₂ im Dunkeln aus zwei unabhängigen Nematodentests.	78
Abb. 4.28	Relative Expression von <i>cyp-35C1</i> durch <i>C. elegans</i> nach 6-stündiger Exposition.	79
Abb. 4.29	Relative Expression von <i>cyp-35C1</i> durch <i>C. elegans</i> im Vergleich zu einer Kontrollgruppe und Reproduktionshemmung in % nach 6-stündiger Exposition in Phenanthren und nTiO ₂ als Einzelsubstanz und in kombinierter Exposition.	80
Abb. 4.30	Hemmung von Wachstum, Reproduktion und Fertilität von <i>C. elegans</i> durch SSR mit einer Gesamtintensität von 231 W/m ² bei variierender Bestrahlungsdauer.	82

Abb. 4.31	Hemmung des Wachstums (A) und Reproduktion (B) von <i>C. elegans</i> durch SSR über 30 Minuten mit variierenden Bestrahlungsintensitäten und Bestrahlungszeitpunkten.	82
Abb. 4.32	Hemmung von Wachstum, Reproduktion und Fertilität von <i>C. elegans</i> durch SSR (30 min, 231 W/m ²) zu unterschiedlichen Zeitpunkten.	83
Abb. 4.33	Methylenblau-Abbau durch nTiO ₂ (P25) unter Bestrahlung mit SSR bei 231 W/m ² (300-800 nm).	84
Abb. 4.34.	Methylenblau-Abbau durch bTiO ₂ (NM100) unter Bestrahlung mit SSR bei 231 W/m ² (300-800 nm).	84
Abb. 4.35.	Effekte von nTiO ₂ auf Wachstum, Reproduktion und Fertilität von <i>C. elegans</i> unter Einfluss von Bestrahlung, Mittelwerte der Hemmungen und Standardabweichung.	86
Abb. 4.36	Hemmung der Reproduktion von <i>C. elegans</i> durch nTiO ₂ in Abhängigkeit der Bestrahlung und photokatalytische Aktivität als Methylenblau Abbau nach 30 Minuten Bestrahlung bei 231 W/m ² bei 300-800 nm.	87
Abb. 4.37	Hemmung der Reproduktion von <i>C. elegans</i> durch bTiO ₂ in Abhängigkeit der Bestrahlung und photokatalytische Aktivität als Methylenblau-Abbau nach 30 Minuten Bestrahlung bei 231 W/m ² bei 300-800 nm.	87
Abb. 4.38	Relative Expression von <i>sod-3</i> nach 4,75 h Inkubation in nTiO ₂ mit SSR (weiße Balken) und ohne SSR (schwarze Balken).	88
Abb. 4.39	Mittlere Fluoreszenz der transgenen <i>sod-3:gfp</i> Würmer nach Exposition gegenüber bTiO ₂ und nTiO ₂ über 4 Stunden (links) bzw. 48 Stunden (rechts).	89
Abb. 4.40	Autofluoreszenz von <i>C. elegans</i> bei 525 nm nach 72 Stunden Inkubation mit nTiO ₂ bzw. bTiO ₂ im Dunkeln (schwarze Balken) und unter SSR-Einfluss (weiße Balken).	90
Abb. 4.41	Reproduktionshemmung von <i>C. elegans</i> durch Phenanthren in Abhängigkeit der Bestrahlung. Nicht lineare Regression nach Dosis-Wirkungs-Beziehung.	92
Abb. 4.42	Hemmung der Reproduktion von <i>C. elegans</i> durch Phenanthren und nTiO ₂ nach Vorbestrahlung der Kontaminanten mit SSR.	93

Abb. 4.43	Hemmung der Reproduktion von <i>C. elegans</i> durch Phenanthren und nTiO ₂ unter simultaner Bestrahlung mit SSR.	94
Abb. 5.1	Schematische Darstellung des Aufbaus einer intestinalen Zelle von <i>C. elegans</i> und der Agglomeration von TiO ₂ in der sulfathaltigen Glykokalyx.	110
Abb. 5.2	Schematische Darstellung der Steuerung der Defäkation in <i>C. elegans</i> durch Ca ²⁺ -Ionen nach Dal Santo et al. 1999.	111

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Judith Angelstorf
Geburtsdatum 13.10.1982
Geburtsort, -land Bonn, Deutschland

Ausbildung

1989- 1993 Gemeinschaftsgrundschule Finkenhof Bonn- Duisdorf
1993- 2002 Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium Bonn,
abgeschlossen mit Abitur
2002-2005 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität in
Bonn, Abschluss: Vordiplom
2005-2009 Studium der Biologie an der Universität Hamburg
Fächer: Hydrobiologie und Fischereiwissenschaften, Zoologie,
Biogeochemie
Abschluss: Diplom Biologin

Wissenschaftliche Tätigkeiten

2006 Studentische Hilfskraft am Institut für Hydrobiologie und
Fischereiwissenschaften, Universität Hamburg
2006 - 2009 Studentische Hilfskraft am Institut für Biogeochemie und Meereschemie
(IfBM), Universität Hamburg
2009 Praktikum am Second Institute of Oceanography, Laboratory of Marine
Ecosystems and Biogeochemistry in Hangzhou, China
Seit 2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Hochschule für Angewandte
Wissenschaften (HAW) im Forschungsschwerpunkt Umweltanalytik und
Ökotoxikologie, AG Prof. Susanne Heise
Forschungsprojekte: - EU-Projekt diPol, Leitung TUHH
- KLIMZUG-NORD, TUHH
- ARCH, HAW-Hamburg
Seit 2009 Promotion an der TU Hamburg-Harburg in Kooperation mit der HAW
Hamburg. Betreuer: Dr. habil Wolfgang Ahlf, Prof. Dr. Susanne Heise
Thema: Effekte von Titandioxidnanopartikeln auf den Nematoden
Caenorhabditis elegans unter besonderer Berücksichtigung von UV-
Strahlung
Seit 2010 Promotionsstipendium von Pro Exzellenzia

