

VU Research Portal

Ecotoxicological assessment of ZnO nanoparticles to *Folsomia candida*

Waalewijn-Kool, P.L.

2013

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Waalewijn-Kool, P. L. (2013). *Ecotoxicological assessment of ZnO nanoparticles to Folsomia candida*. Off-Page, www.offpage.nl.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Titel: Ecotoxicologische beoordeling van ZnO nanodeeltjes voor *Folsomia candida*

De ontwikkeling van nanotechnologieën en het gebruik van nanomaterialen in onze maatschappij hebben de laatste jaren een sterke toename laten zien. Voor consumenten, industrie en de medische sector zijn allerlei producten met nanomaterialen op de markt, waaronder elektronica en producten voor persoonlijke verzorging. Nanomaterialen (deeltjes met afmetingen in de orde van miljoenste millimeters) bezitten bijzondere chemische en fysische eigenschappen. Hiermee dragen nanomaterialen bij aan een scala aan productvernieuwingen. Nanomaterialen kunnen tijdens of na het gebruik van producten in het milieu terecht komen, onder andere in het rioolwater. Dit kan ook leiden tot een ophoping van nanomaterialen in de bodem, wat negatieve effecten kan veroorzaken voor dieren die in de bodem leven, zoals regenwormen, pissebedden en springstaarten. Deze zouden kunnen sterven of in aantal kunnen afnemen na blootstelling aan deze contaminanten. Er zijn aanwijzingen dat nanodeeltjes schadelijk kunnen zijn voor water organismen zoals algen en watervlooien, maar over de risico's van blootstelling en toxiciteit van nanomaterialen in de bodem is relatief weinig bekend.

In mijn proefschrift heb ik gekozen om de toxiciteit van zink oxide (ZnO) nanodeeltjes voor bodemdieren te onderzoeken, om drie redenen. Ten eerste worden ZnO nanodeeltjes tegenwoordig veel gebruikt in zonnebrandcrèmes als UV beschermer en worden er veel verschillende ZnO nanodeeltjes geproduceerd. Ten tweede tonen recente studies aan dat ZnO nanodeeltjes deels oplosbaar zijn in water en daarom is er een verhoogd risico op schadelijke effecten van opgeloste deeltjes en vrije Zn ionen. De derde reden voor dit onderzoek is de beperkte hoeveelheid informatie over de ecotoxiciteit van ZnO nanodeeltjes voor bodemdieren. In al mijn experimenten heb ik de springstaart *Folsomia candida* gebruikt, omdat dit als een modelorganisme voor bodemecotoxiciteit wordt beschouwd. *F. candida* behoort tot de springstaarten (collembola), zes-potige, vleugelloze invertebraten, die hun naam danken aan een gevorkt apparaat aan het achterlijf waarmee ze in staat zijn grote sprongen te maken. *F. candida* is een witte springstaart van ongeveer 3 mm en heeft een ventrale tubus waarmee opname van metalen kan plaatsvinden vanuit het poriewater in de bodem. Deze blootstellingsroute van metalen zou ook een rol kunnen spelen in de toxiciteit van opgeloste nanodeeltjes en daarom is een belangrijk doel mijn onderzoek om uit te vinden of mogelijke effecten op de voortplanting van de springstaarten veroorzaakt worden door de ZnO nanodeeltjes zelf of door het opgeloste zink (Zn).

Vijf kernvragen werden gesteld (Hoofdstuk 1):

1. In hoeverre kunnen de huidige protocollen voor toxiciteitstoetsen worden toegepast voor het bepalen van de ecotoxiciteit van nanodeeltjes?

2. Is de toxiciteit van ZnO nanodeeltjes gerelateerd aan de deeltjesgrootte of aan vrijgekomen Zn?
3. Hoe snel lossen ZnO nanodeeltjes op in de bodem en leidt dit tot afname van de toxiciteit van ZnO nanodeeltjes op lange termijn?
4. Wat is het effect van een coating om de ZnO nanodeeltjes op de toxiciteit voor *F. candida*?
5. Spelen bodemeigenschappen, zoals pH en organische stofgehalte, een rol in de oplosbaarheid en toxiciteit van ZnO nanodeeltjes?

Ik zal mijn bevindingen uit de verschillende experimenten kort uiteen zetten en op basis daarvan de mogelijke risico's van ZnO nanodeeltjes voor springstaarten inschatten.

Toxiciteitstesten met *F. candida* worden meestal uitgevoerd volgens de ISO richtlijn 11267 (ISO, 1999). Deze methode richt zich op het bepalen van effecten op overleving en reproductie van de springstaarten na 28 dagen blootstelling en deze test is ook geschikt bevonden voor het bepalen van de toxiciteit van nanodeeltjes. De manier van doseren van de nanodeeltjes aan de grond staat nog wel ter discussie. Door hun reactieve oppervlak aggregeren nanodeeltjes in water wat het moeilijk maakt om een homogene suspensie te maken. Ik heb twee doseringsmethoden vergeleken en de homogeniteit van Zn in de grond gemeten door vijf willekeurige monsters te nemen uit grond behandeld met ZnO nanodeeltjes (Hoofdstuk 2). Aan de ene batch grond waren ZnO nanodeeltjes toegevoegd als droog poeder en aan de andere batch grond als een suspensie in een extract van dezelfde bodem. De monsters werden vergeleken op basis van het totaal Zn gehalte gemeten na destructie en analyse met atomaire absorptiespectrometrie (AAS). Beide methoden hebben voor- en nadelen. Een nadeel van doseren met poeder is de electrostatische lading waardoor nanodeeltjes gemakkelijk worden weggeblazen tijdens het afwegen. Aan de andere kant is het mengen van droog poeder met droge grond gemakkelijk uitvoerbaar. Het doseren van de grond als een suspensie zou aggregatie van de nanodeeltjes kunnen voorkomen, omdat deze dan binden aan opgelost of gesuspendeerd organisch materiaal in het extract. Een nadeel is dat het oplossen van de nanodeeltjes reeds in de suspensie begint en dit de testresultaten kan beïnvloeden. Beide methodes lieten goede resultaten zien, met in alle monsters meer dan 85% van het toegevoegde Zn teruggemeten. En een variatie van minder dan 10% tussen de vijf replica's wees op een redelijk homogene verdeling van de ZnO nanodeeltjes in de grond, voor beide doseringsmethoden.

Voor de tweede vraag is het effect op overleving en reproductie van *F. candida* onderzocht voor drie verschillende Zn vormen, namelijk ZnO nanodeeltjes (< 200 nm), ZnO deeltjes met afmetingen groter dan 100 nm ("niet-nano") en het oplosbaar zout ZnCl₂ (Hoofdstuk 3). In een 28 dagen studie met natuurlijke standaardgrond (Lufa 2.2) was het effect op reproductie dosis-gerelateerd. EC50 waarden (concentratie die 50% remming van de reproductie veroorzaakt) waren respectievelijk 1964, 1591 en 298 mg Zn/kg voor ZnO nanodeeltjes, niet-nano ZnO en ZnCl₂. Er werden geen effecten op overleving van *F. candida* gevonden in grond behandeld met ZnO nanodeeltjes en

niet-nano ZnO tot concentraties van 6400 mg Zn/kg. Mijn hypothese dat kleinere deeltjes toxischer zouden zijn door hun grotere oppervlak per volume deeltje bleek niet waar te zijn. De grootte van de ZnO deeltjes leverde geen significante verschillen op in de EC50 waarden voor ZnO nanodeeltjes en niet-nano ZnO. EC50 waarden gebaseerd op poriewaterconcentraties waren voor alle drie de Zn vormen in dezelfde range (7,94-16,8 mg Zn/l) wat suggereert dat het vrijgekomen Zn verantwoordelijk is voor de effecten op reproductie en niet de nanodeeltjes zelf.

In een langlopende studie is de oplosbaarheid en toxiciteit van dezelfde drie Zn vormen en van met triethoxyoctylsilane gecoate ZnO nanodeeltjes onderzocht (Hoofdstuk 4). Behandelde Lufa 2.2 gronden waren "verouderd" in glazen potten in een klimaatkamer en na drie, zes en twaalf maanden werd een deel van de grond gebruikt om de hoeveelheid beschikbaar Zn in het poriewater te meten en een 28 dagen toxiciteitstest met *F. candida* uit te voeren. Zn concentraties in het poriewater van grond behandeld met ZnO namen gestaag toe met de tijd en na drie maanden en langer zagen we een piek in de poriewaterconcentraties bij middelhoge bodemconcentraties. Na twaalf maanden was de hoogste poriewaterconcentratie bij een bodemconcentratie van 800 mg Zn/kg 67,1 mg Zn/l. Dit is slechts 2,94% van de totale hoeveelheid Zn in die bodem wat laat zien dat slechts een klein deel van de totale hoeveelheid Zn in de bodem in het poriewater terecht komt. Het is bekend dat de oplosbaarheid van ZnO afhangt van de zuurgraad van de bodem en dat opgeloste Zn vormen ("species"), zoals $\text{Zn}(\text{OH})_2(\text{aq})$ en $\text{Zn}(\text{OH})^+(\text{aq})$, niet gemakkelijk desorberen bij een wat hogere pH. Bij hogere pH vindt er Zn fixatie plaats in de vaste fase van de bodem. De verhoging van de pH, die optrad bij toename van de totale Zn concentratie, kan de daling in poriewater Zn concentraties bij hogere doseringen verklaren. Voor de gecoate ZnO nanodeeltjes werd een dergelijke piek in poriewaterconcentraties ook gevonden, maar pas na twaalf maanden veroudering. Een coating om de nanodeeltjes kan dus het vrijkomen van Zn voor een bepaalde tijd tegenhouden. Na 28 dagen blootstelling waren de gecoate ZnO nanodeeltjes significant toxischer voor *F. candida* dan de niet-gecoate ZnO nanodeeltjes. De 28-dagen EC50 voor de toxiciteit van de gecoate deeltjes was 873 mg Zn/kg en nam pas toe in twaalf maanden verouderde grond, waarbij de waarde van de 28-dagen EC50 voor niet-gecoate ZnO nanodeeltjes werd bereikt. Voor de andere drie Zn vormen nam de toxiciteit al drastisch af na drie maanden veroudering. Na een jaar veroudering was de pH van de grond geleidelijk afgenomen. De hierdoor opgetreden toename van de concentratie aan vrije H^+ ionen in het poriewater zou bijgedragen kunnen hebben aan een beschermend effect op de toxiciteit van vrije Zn^{2+} ionen in het porie water. Volgens het "Biotic Ligand Model" kan competitie tussen H^+ ionen en andere cationen de toxiciteit van metaalionen verminderen. In deze studie werd gezien dat niet alleen de tijd, maar ook de pH een prominente rol speelt in de biobeschikbaarheid en toxiciteit van ZnO nanodeeltjes.

Het effect van bodemeigenschappen, zoals de zuurgraad en het organische stofgehalte, op de toxiciteit van ZnO nanodeeltjes is onderzocht in verschillende

natuurlijke gronden. Om het effect van de zuurgraad te bestuderen is de pH_{CaCl_2} van een natuurlijke grond uit Dorset (Engeland) gesteld op drie niveaus, namelijk 4,5, 5,9 en 7,2 (Hoofdstuk 5). De oplosbaarheid van ZnO nanodeeltjes was het hoogst in de meest zure grond. De sorptie van Zn nam toe met toenemende pH wat resulteerde in toenemende Freundlich sorptieconstanten van 98,9 tot 333 l/kg (met corresponderende n waarden van 1,23 tot 0,794). De effecten op de reproductie van *F. candida* na 28 dagen blootstelling aan ZnO nanodeeltjes in deze gronden namen af met toenemende pH, met EC50 waarden van 553, 1481 and 3233 mg Zn/kg. EC50s gebaseerd op poriewater Zn concentraties namen ook toe met toenemende pH van 4,77 tot 18,5 mg Zn/l.

Organisch stof speelt een rol bij het stabiliseren van nanodeeltjes in suspensies waarbij organische stof in het algemeen aggregatie van nanodeeltjes vermindert. Wanneer organische stof reageert met ZnO kan dit voor een natuurlijke "coating" zorgen om de nanodeeltjes en dit zou de biobeschikbaarheid van nanodeeltjes kunnen verminderen. Vier natuurlijke gronden variërend in organische stofgehalte van 2,37 tot 14,7% en pH van 5,0 tot 6,8 werden behandeld met ZnO nanodeeltjes (Hoofdstuk 6). *F. candida* werd vervolgens blootgesteld gedurende 28 dagen in een toxiciteitstest. De hoogste oplosbaarheid werd gemeten in de meest organische grond (23 mg Zn/l), maar deze grond had ook de laagste pH. Er werd geen correlatie gevonden tussen de 28-d EC50s voor het effect van ZnO nanodeeltjes op reproductie van *F. candida* en het organische stofgehalte van de grond. De toxiciteit was meer gerelateerd aan de bodem pH en EC50s namen toe met toenemende pH van 1695 tot 4446 mg Zn/kg.

Concluderend kan worden gesteld dat de ZnO nanodeeltjes die ik heb getest minder toxisch waren dan vrij Zn (getest als $ZnCl_2$), gebaseerd op totaal Zn concentraties in de bodem. In al mijn studies vond ik vergelijkbare EC50 waarden voor de giftigheid ZnO nanodeeltjes en niet-nano ZnO, wat aangeeft dat de deeltjesgrootte de toxiciteit voor *F. candida* niet beïnvloedt. Eenmaal in de grond verliezen ZnO nanodeeltjes hun karakteristieke eigenschappen. Door aggregatie, sorptie en oplossing is de nano-vorm van de deeltjes in de grond niet meer aanwezig zoals ze was in de poedervorm. Hoewel ZnO nanodeeltjes toxische effecten kunnen veroorzaken door het vrijkomen van Zn^{2+} ionen, zijn er geen bewijzen gevonden dat deze effecten een groot probleem worden in natuurlijke gronden. Zowel op korte als op lange termijn treden er minder negatieve effecten op voor (gecoate en niet-gecoate) ZnO nanodeeltjes dan voor vrij Zn, gebaseerd op totaal Zn in de bodem. Naar mijn mening zouden ZnO nanodeeltjes daarom geëvalueerd kunnen worden met de huidige risicobeoordeling van Zn. Wel zullen bodemeigenschappen mee genomen moeten worden, met name de pH. In zure grond zal het oplossen van ZnO nanodeeltjes gestimuleerd worden en kan de toxiciteit toenemen.