

TEXTE

102/2017

Betrachtungen zum Zusammenhang von physikalisch-chemischen Eigenschaften und aquatischer Ökotoxizität bei Nanomaterialien mit dem Ziel einer Gruppierung

Kurzbericht

TEXTE 102/2017

Umweltforschungsplan des
Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit

Forschungskennzahl 3714 67 417 0
UBA-FB 002572/ENG

Betrachtungen zum Zusammenhang von physikalisch-chemischen Eigenschaften und aquatischer Ökotoxizität bei Nanomaterialien mit dem Ziel einer Gruppierung

Kurzbericht

von

Kerstin Hund-Rinke
Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Schmallenberg

In Kooperation mit

Carmen Nickel
Institut für Energie- und Umwelttechnik (IUTA) e.V., Duisburg

und

Dana Kühnel
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ), Leipzig

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber:

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

 /umweltbundesamt.de

 /umweltbundesamt

Durchführung der Studie:

Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology
Auf dem Aberg 1
57392 Schmallenberg

Institute of Energy and Environmental Technology (IUTA) e.V.
Bliersheimer Straße 58-60
47229 Duisburg

Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ)
Permoserstr. 15
04318 Leipzig

Abschlussdatum:

März 2017

Redaktion:

Fachgebiet IV 2.2 Arzneimittel, Wasch- und Reinigungsmittel
Dr. Doris Völker

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1862-4359

Dessau-Roßlau, November 2017

Das diesem Bericht zu Grunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit unter der Forschungskennzahl 3714 67 417 0 finanziert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

1 Zusammenfassung

Technisch hergestellte Nanomaterialien (NM) werden mit sehr variablen Eigenschaften in Bezug auf ihre Größe, Form, Kristallstruktur oder Oberflächenmodifikationen produziert. Bisher ist das Wissen über den Einfluss dieser Eigenschaften auf die ökotoxikologische Wirkung von NM begrenzt. Um den Testaufwand für diese Anzahl an einzelnen NM zu begrenzen, werden gegenwärtig Gruppierungs- bzw. *read across*-Ansätze in Analogie zur Chemikalienbewertung diskutiert. Sowohl die Gruppierung als auch *read across* zielen darauf ab, durch die Identifikation von bestimmten Eigenschaften oder Parametern eine verlässliche Vorhersage über Gefährdungen durch NM einer Gruppe ohne zusätzliche Testung zu erlauben und auf diese Art Übertragung von Daten von einem Mitglied einer Gruppe auf ein anderes zuzulassen (*read across*). Für eine Gruppierung von NM nach ökotoxikologischen Gesichtspunkten gibt es bisher nur wenige Ansätze, während für das Gebiet der Humantoxikologie bereits einige Gruppierungsvorschläge unterbreitet wurden.

Daher war es das Ziel dieses Projektes ein Gruppierungskonzept für technisch hergestellte NM mit Bezug zu ihren ökotoxikologischen Effekten und besonderem Fokus auf die aquatische Ökotoxikologie zu entwickeln. Die folgenden Testorganismen und Testsysteme wurden vom Umweltbundesamt (UBA) für diesen Zweck ausgewählt:

- ▶ Algeninhibitionstest (OECD Guideline 201, 2011)
- ▶ Akuter Immobilisierungstest mit Daphnien (OECD Guideline 202, 2004)
- ▶ Zebrafischembryo-Toxizitätstest (OECD Guideline 236, 2013)

Das Projekt bestand aus 5 Arbeitsschritten. Im ersten Schritt erfolgte nach definierten Kriterien die Auswahl von 14 NM. Die ausgewählten NM enthielten verschiedene Subtypen aus Ag, ZnO, TiO₂, CeO₂ sowie Cu. Im zweiten Schritt wurden die physikalisch-chemischen Eigenschaften aller NM sowohl in Wasser als auch in den jeweiligen Testmedien bestimmt. Basierend auf den bestimmten Eigenschaften wurden Hypothesen hinsichtlich der Ökotoxizität der 14 NM formuliert (Arbeitsschritt 3). In einem vierten Schritt erfolgte die Überprüfung der aufgestellten Hypothesen mittels der Durchführung der ökotoxikologischen Versuche. Im letzten Arbeitsschritt erfolgte die Erstellung eines Gruppierungskonzeptes basierend auf den physikalisch-chemischen Eigenschaften, welche für die Entstehung einer toxischen Wirkung in aquatischen Organismen als relevant identifiziert wurden.

Die nachfolgend aufgelisteten NM wurden für dieses Projekt vom Umweltbundesamt (UBA) ausgewählt und beinhalten sowohl Ionen-freisetzende als auch weitere NM, die sich jeweils in Größe, Form, Kristallstruktur, Reaktivität und Zeta-Potential unterschieden. Explizit ausgeschlossen waren NM mit Oberflächenmodifikationen.

Ag

- ▶ SRM 110525: Draht, zu Verfügung gestellt durch „Rent a scientist“
- ▶ Batch 1340: Nanodraht, zu Verfügung gestellt durch „Rent a scientist“
- ▶ NM-300K: sphärisches NM, aus dem OECD Sponsorship Programme

TiO₂

- ▶ Eu-dotiert (5 %), zu Verfügung gestellt von IUTA
- ▶ Fe-dotiert (5 %), zu Verfügung gestellt von IUTA
- ▶ undotiert, zu Verfügung gestellt von IUTA

ZnO

- ▶ NM-110, aus dem OECD Sponsorship Programme
- ▶ NM-111, aus dem OECD Sponsorship Programme
- ▶ NM-113, aus dem OECD Sponsorship Programme

CeO₂

- ▶ Eu-dotiert (5 %), zu Verfügung gestellt von IUTA
- ▶ NM-211, aus dem OECD Sponsorship Programme
- ▶ NM-212, aus dem OECD Sponsorship Programme

- ▶ NM-213, aus dem OECD Sponsorship Programme

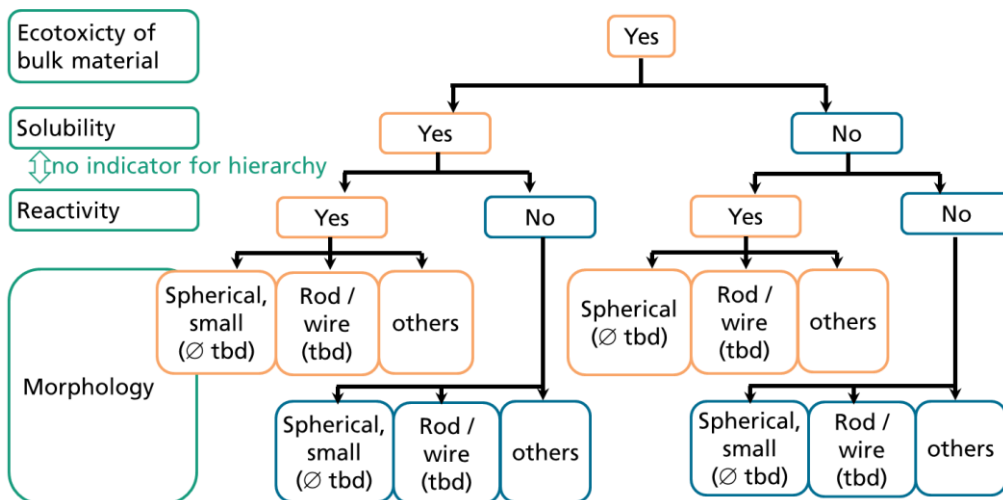
Cu

- ▶ Cu(0), zu Verfügung gestellt von IUTA, als ionenfreisetzendes Vergleichsmaterial mit einer erwarteten hohen Toxizität

Der umfassende Datensatz an physiko-chemischen Parametern wurde verschiedenen statistischen Verfahren unterzogen, um mögliche Gruppierungen zu identifizieren. In einem zweiten Schritt wurden die ermittelten Ökotoxizitätswerte in die statistische Auswertung einbezogen. Ergibt sich keine Veränderung in den auf Basis der physiko-chemischen Daten ermittelten Gruppierungen, kann dies als Indiz gewertet werden, dass die verwendeten physiko-chemischen Daten die Ökotoxizität bedingen.

Zusätzlich wurden die ökotoxikologischen Testergebnisse über Expertenbeurteilung gruppiert.

Als vielversprechender Ansatz wurde das unten stehende Flussschema entworfen, welches durch den ECETOC-Ansatz inspiriert ist (Arts et al., 2015; Arts et al., 2016). Da dieser Ansatz für eine Gruppierung hinsichtlich Humantoxikologie entwickelt wurde, waren spezifische Anpassungen bezüglich Ökotoxikologie erforderlich. Diese wurden im Schema basierend auf den durch die Testung identifizierten physikalisch-chemischen Parametern umgesetzt. Im ersten Schritt wird eine bekannte oder ermittelte Ökotoxizität entweder des NM oder des nicht-nanoskaligen Materials berücksichtigt. Unten dargestellt ist das Schema für NM deren ökotoxikologische Wirkung aufgrund des Ausgangsmaterials bereits bekannt ist. Das analoge Schema ist auch auf NM aus bekanntermaßen nicht-toxischen Materialien anwendbar. Liegt keinerlei Information zur Toxizität vor, wird das NM als toxisches Material behandelt.



Im Folgenden sind die wesentlichen Ergebnisse und Schlussfolgerungen zusammengefasst:

Gruppierung der ausgewählten Nanomaterialien

- ▶ Unter Verwendung des entwickelten Ökotox-Schemas ließen sich aus den untersuchten Nanomaterialien sechs Gruppen bilden:
 - Ionenfreisetzende Nanomaterialien mit DMPO/CPH-Reaktivität¹ und anderer Morphologie: Ag NM-300K, Cu.
 - Ionenfreisetzende Nanomaterialien mit DMPO/CPH -Reaktivität, Draht: Ag, Batch 1340.
 - Ionenfreisetzende Nanomaterialien ohne DMPO/CPH -Reaktivität, Draht: Ag, SRM 110525.
 - Ionenfreisetzende Nanomaterialien ohne DMPO/CPH -Reaktivität, andere Morphologie: alle ZnO Nanomaterialien.
 - Nicht-ionenfreisetzende Nanomaterialien, ohne DMPO/CPH -Reaktivität und anderer Morphologie: alle CeO₂ Nanomaterialien.
 - Nicht-ionenfreisetzende Nanomaterialien, mit DMPO/CPH -Reaktivität und anderer Morphologie: alle TiO₂ Nanomaterialien.
- ▶ Mit Ausnahme von Silber waren die Sub-Typen der einzelnen Nanomaterialien gleicher chemischer Zusammensetzung zu gering, um zu einer Trennung in verschiedene Gruppen zu führen. Es scheint, dass die Unterschiede zwischen den Nanomaterialien einer chemischen Zusammensetzung deutlich größer sein müssen als die in dem vorliegenden Projekt vorliegenden, um eine veränderte Ökotoxizität hervorzurufen.

Physikalisch-chemische (PC-)Parameter

- ▶ Die Ergebnisse zeigen, dass sich die PC-Parameter in den verschiedenen Testmedien stark unterscheiden (Wasser, ISO-Wasser für den Zebrafischembyrotest, OECD-Medium für den Algentest, ADaM für den Daphnientest). Für Vorhersagen hinsichtlich der Ökotoxizität für einen bestimmten Organismus können nur die Werte aus dem jeweiligen Testmedium herangezogen werden.
- ▶ Es wurden wenig Zusammenhänge zwischen PC-Parametern und ökotoxikologischen Wirkungen gefunden, was zu der Schlussfolgerung führte, dass die ermittelten Parameter nicht ausreichend sind, um eine ökotoxische Wirkung zu erklären oder sogar vorherzusagen. Zum Beispiel erwies sich die Löslichkeit eines NM als ungeeigneter alleiniger Indikator. ZnO-Partikel etwa lösten sich innerhalb von 72 h vollständig auf, für Ag hingegen war der gelöste Anteil wesentlich geringer. Trotzdem war aufgrund der unterschiedlichen Toxizität der chemischen Ausgangssubstanzen wie erwartet die Toxizität des ZnO geringer als die des Ag, (Okamoto et al., 2015). Zudem zeigte eine Betrachtung der Effekte innerhalb einer chemischen Gruppe, wie zum Beispiel der Silber-NM, dass das löslichste NM nicht unbedingt die höchsten Effekte hervorrufen muss. Das bedeutet, dass das löslichste NM nicht als Worst Case Ansatz herangezogen werden kann. Neben der Toxizität der Ausgangssubstanz sollten auch weitere Parameter wie beispielsweise die Form berücksichtigt werden.

¹ Messung der Reaktivität mittels DMPO

Die NM werden mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DMPO) gemischt und inkubiert. Die über Fenton-ähnliche-Reaktionen von dem Material gebildeten Hydroxylradikale (OH[•]), werden vom DMPO unter Bildung von DMPO-OH abgefangen, welches dann mittels Elektronenspinresonanz detektiert werden kann (Shi et al., 2003).

Messung der Reaktivität mittels CPH

Eine mögliche (Oberflächen-)Reaktivität des NM, die durch an die Oberfläche gebundene Substanzen oder durch physiko-chemische Eigenschaften hervorgerufen wird, wird mit Hilfe von 1-Hydroxy-3-Carboxy-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin Hydrochlorid (CPH) bestimmt (Driessen et al., 2015; Papageorgiou et al., 2007). Dabei wird die (Oberflächen-)Reaktivität über die H⁺-Abspaltung von CPH zu CP erfasst. Dieser Effekt wird möglicherweise durch aktive Oberflächen des NM hervorgerufen.

- ▶ Der Einfluss des Zeta-Potentials scheint hingegen in ökotoxikologischen Tests vergleichsweise gering zu sein und andere Indikatoren haben folglich eine größere Relevanz. Beispielsweise haben die verschiedenen ZnO-Subtypen sowohl negative als auch positive Werte für das Zeta-Potential, die jedoch in keinem offensichtlichen Zusammenhang zu den ökotoxikologischen Effekten stehen. Eine Ausnahme stellt hier das Algen(OECD-)medium dar, in welchem immer hohe negative Werte gemessen wurden und immer toxische Effekte auftraten. Aber gerade in diesem Testsystem wird der Stabilität der NM im Medium eine geringere Bedeutung beigemessen, da Algen und NM während des gesamten Tests durch Schütteln in Kontakt bleiben.
- ▶ Die Oberflächenreaktivität wird als ein Grund für die beobachteten ökotoxischen Effekte durch die NM TiO₂ und CeO₂ vermutet. Die Messmethode für die Reaktivität bedarf aus unserer Sicht einer näheren Betrachtung. Es ist eine Methode zu identifizieren oder eine bestehende Methode anzupassen, die mit einer Ökotoxizität korreliert, von der erwartet wird, dass sie auf Oberflächenreaktivität beruht.
- ▶ Die Morphologie der NM wird ebenfalls als relevant betrachtet. Eine Differenzierung in sphärische Partikel und Stäbchen/Drähte allein wird jedoch als nicht ausreichend betrachtet. (siehe auch unter: Testspezies – Daphnien). Schwellenwerte sind festzulegen, die besonders toxische sphärische und stäbchenförmige NM von einer dritten Gruppe abtrennen, in die die übrigen NM fallen könnten.
- ▶ Einige NM-Subtypen waren dotiert. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Dotierung alleine keinen Aufschluss über eine mögliche ökotoxische Wirkung gibt. Für TiO₂ modifiziert eine Dotierung die Kristallstruktur und damit auch die ökotoxische Wirkung. Für CeO₂ wurde dieser Zusammenhang nicht beobachtet, da die Effekte für Eu-dotiertes CeO₂ vergleichbar zu zwei der nicht-dotierten CeO₂ NM waren, während ein drittes nicht-dotiertes CeO₂ andere Effekte zeigte.
- ▶ Damit müssen für NM offenbar Kombinationen aus verschiedenen Parametern berücksichtigt werden. Der einzelne Parameter muss gewichtet werden, wobei die verschiedenen Testorganismen, die Testmedien und ihr Verhalten darin berücksichtigt werden müssen.
- ▶ Statistische Verfahren können nützlich sein, um physiko-chemische Parameter zu identifizieren, die die Ökotoxizität beeinflussen. Derartige Verfahren können jedoch nur bei einem großen Datensatz zielführend eingesetzt werden. Der Datensatz, der in diesem Projekt erhoben wurde und der den Auswertungen zugrunde lag, war limitiert und muss für robuste Aussagen erweitert werden.

Testspezies

- ▶ Die Testspezies verhalten sich hinsichtlich der Rangordnung der NM unterschiedlich. Sie müssen daher separat behandelt werden (auch im Sinne der Möglichkeiten und Grenzen der Datenübertragung im Falle von *read across*).
- ▶ Die Bioverfügbarkeit von NM ist mit ihrem Verhalten in den verschiedenen Testmedien verknüpft. Daher können Daten zur Toxizität eines Nanomaterials für einen bestimmten Organismus nicht ohne Weiteres verwendet werden, um die Toxizität für das gleiche Nanomaterial aber einen anderen Testorganismus abzuleiten.
- ▶ Der *Zebrafischembryo*-Test erwies sich als eher unempfindlich und für die Bewertung von NM sollten Modifikationen wie Dechorionierung in Betracht gezogen werden ((Bodewein et al., 2016); Henn and Braunbeck (2011)). Andernfalls müssen chronische Fischuntersuchungen durchgeführt werden, auch wenn Tierversuche minimiert werden sollten. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass der Fischembryotest im vorliegenden Projekt nur mit einer Inkubationszeit von 72 h anstelle von 96 h durchgeführt wurde.

- ▶ *Algen* erwiesen sich als empfindlichste Testart. Wir gehen nicht davon aus, dass Abschattung aufgrund von trüben Testdispersionen der Grund ist. Die Effekte wurden auch bei niedrigen Testkonzentrationen ohne signifikante Trübung beobachtet.
- ▶ *Daphnien* sind empfindlich gegenüber dünnen und langen Ag-Drähten. Der Bereich der besonders kritischen Dimensionen muss noch untersucht werden.

Ranking / Gruppierung nach statistischen Analysen

- ▶ Obwohl verschiedene Korrelationen zwischen den ausgewählten PC-Parametern (Agglomeratgröße, Primärteilchengröße, Zeta-Potential, BET-Oberfläche, Löslichkeit, Reaktivität auf Basis von CPH und DMPO) unter Verwendung verschiedener statistischer Ansätze berechnet werden konnten, führten die Clusteranalysen zu inkonsistenten Ergebnissen, obwohl sie unabhängig für jedes Testmedium durchgeführt wurden. Die gebildeten Gruppen sind hinsichtlich der Ökotoxizität nicht plausibel, da Ionen freisetzende und nicht-ionenfreisetzende NM in den Gruppen gemischt werden, obwohl offensichtliche Unterschiede in der Ökotoxizität beobachtet werden können. Neben einer größeren Datenbasis (robustes Datenset) und einer verbesserten Auswahl von PC-Parametern können die Gründe in unterschiedlichen Bedingungen in der ökotoxikologischen Prüfung und der Bestimmung der PC-Parameter liegen. Einflussfaktoren wie Testorganismen, deren Bewegung und Ausscheidungsprodukte, Beleuchtung sowie Turbulenzen wie Schütteln oder Rühren wurden bei der Bestimmung der PC-Parameter nicht berücksichtigt. Bisher ist es nicht möglich, die Ökotoxizität auf Basis einer routinemäßigen statistischen Analyse vorherzusagen. Fachwissen über die Interaktion der verschiedenen Parameter ist noch erforderlich.

Ranking / Gruppierung nach ökotoxikologischen Profilen

- ▶ Gruppierung / Ranking, die nur auf den ökotoxikologischen Daten und Profilen basiert, führte zu nur groben Kategorien. Ökotoxikologische Profile unterstützen jedoch die Identifikation und Gewichtung der für die Ökotoxizität relevanten PC-Parameter. Ionenfreisetzende und weitere NM können unterschieden werden. Für die Ionen freisetzenden NM kann die unterschiedliche Ökotoxizität der chemischen Substanz erkannt werden.
- ▶ Gruppierung nur auf Basis von ökotoxikologischen Daten stellt keine Option für read-across dar, da Sub-Materialien einer chemischen Zusammensetzung nicht differenziert werden können.

Ökotox-Schema für Gruppierung

- ▶ Gruppierung auf Basis eines physiko-chemischen Parameters ist nicht möglich. Es müssen mehrere Parameter berücksichtigt werden. Ein Ansatz ähnlich dem für Humantoxizität (ECETOC Schema) wurde für Ökotoxizität entwickelt.
- ▶ Das für eine ökotoxikologische Gruppierung in diesem Projekt entwickelte Flussdiagramm würde eine Spezifikation in Bezug auf einige Parameter erfordern, z.B. Löslichkeit und Reaktivität. Zusätzlich muss die Form der Stäbe / Drähte, die zu einer erhöhten Ökotoxizität gegenüber Daphnien führen, definiert werden. Für eine Gefährdungsabschätzung sind wissenschaftlich fundierte, aber auch pragmatische Grenzwerte erforderlich. Neben Korrelationen von physiko-chemischen Parametern und Ökotoxizität ist jedoch immer noch Expertenwissen notwendig, um die Gruppierung in einer Einzelfallentscheidung zu verifizieren.

Ranking / Gruppierung nach PC-Parametern und Ökotoxischen Daten

- ▶ Die Anwendung existierender Gruppierungsansätze (zumeist bezogen auf Humantoxizität) für NM ist nicht direkt ohne Anpassungen auf ökotoxikologische Daten auf Umweltfragestellungen übertragbar.
- ▶ Einige Parameter (z.B. Löslichkeit und Reaktivität) des Fließschemas, das im Rahmen dieses Vorhabens entwickelt worden ist, müssen noch präzisiert werden. Weiterhin sind die Form der Stäbchen bzw. Drähte, die zu einer gesteigerten Ökotoxizität für Algen führen, zu definieren. Für ein Ranking des Gefährdungspotentials sind Schwellenwerte wissenschaftlich basiert, aber dennoch pragmatisch festzulegen. Über eine reine Korrelation von PC-Parametern und Ökotoxizität hinaus, wird immer Expertenwissen ein wesentliches Element bei der Gruppierung im Rahmen einer Einzelfallentscheidung benötigt werden.

Empfehlungen

Mehrere Empfehlungen sollen die Weiterentwicklung des Gruppierungs- / *read across* Ansatzes in Bezug auf Ökotoxizität unterstützen:

- ▶ Anpassung von Methoden, die die Reaktivität charakterisieren, die sich auf die Ökotoxizität oberflächenreaktiver NM bezieht.
- ▶ Erhöhte Anzahl robuster Datensätze für statistische Analysen (Effektwerte (empfohlen: EC50-Werte) für die gleichen Testsysteme, PC-Parameter für die NM in jedem Medium).
- ▶ Verbesserte Messung der Expositionskonzentration (bessere Wiederfindung).
- ▶ Eine detaillierte Untersuchung der Wirkung der Morphologie durch Verwendung verschiedener NM-Typen mit der gleichen Morphologie wie ZnO- oder TiO₂-Stäben / Drähte.
- ▶ Eine detaillierte Charakterisierung der Kinetik von Löslichkeit, Zeta-Potential, Reaktivität und Agglomerationsverhalten wird als notwendig erachtet, da keine eindeutige Beziehung zwischen den gemessenen PC-Parametern und der Toxizität beobachtet wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass (i) die toxische Reaktion das Ergebnis einer Kombination von Parametern ist, (ii) nicht alle für die Ökotoxizität relevanten Parameter gemessen wurden, und (iii)

Messungen von PC-Parametern ohne Organismen und nur zu einem Zeitpunkt irreführend sein könnten, wie durch die Ergebnisse der löslichen Fraktion in den Tests mit Algen angezeigt. Daher ist eine detaillierte Charakterisierung der Kinetik von Löslichkeit, Zeta-Potential, Reaktivität und Agglomeration erforderlich.

- ▶ In diesem Projekt wurde das Zeta-Potential durch die statistischen Analysen als ein potentieller Parameter identifiziert, der mit dem beobachteten Effekt in Zusammenhang stehen kann. In den Testmedien hatten die meisten NM jedoch ein Zeta-Potential im Bereich von instabilen Dispersionen (-15 bis +15 mV) mit Fokus auf negativen Werten. Daher konnte keine eindeutige Korrelation zwischen dem Zeta-Potential und dem Effekt festgestellt werden. Um zu bestimmen, ob das Zeta-Potential einen Einfluss auf die Toxizität hat, wäre es notwendig, weitere NM mit einem negativen und positiven Zeta-Potential außerhalb dieses Bereichs zu testen.
- ▶ Überprüfung des Ökotox-Schemas mit weiteren Nanomaterialien.

2 Referenzen

- Arts, J. H. E., Hadi, M., Irfan, M.-A., Keene, A. M., Kreiling, R., Lyon, D., et al. (2015). A decision-making framework for the grouping and testing of nanomaterials (DF4nanoGrouping). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(2, Supplement), S1-S27.
- Arts, J. H. E., Irfan, M.-A., Keene, A. M., Kreiling, R., Lyon, D., Maier, M., et al. (2016). Case studies putting the decision-making framework for the grouping and testing of nanomaterials (DF4nanoGrouping) into practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 76, 234-261.
- Bodewein, L., Schmelter, F., Di Fiore, S., Hollert, H., Fischer, R., & Fenske, M. (2016). Differences in toxicity of anionic and cationic PAMAM and PPI dendrimers in zebrafish embryos and cancer cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 305, 83-92.
- Driessen, M. D., Mues, S., Vennemann, A., Hellack, B., Bannuscher, A., Vimalakanthan, V., et al. (2015). Proteomic analysis of protein carbonylation: a useful tool to unravel nanoparticle toxicity mechanisms. *Particle and Fibre Toxicology*, 12, 36.
- Henn, K., & Braunbeck, T. (2011). Dechlorination as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 153(1), 91-98.
- OECD Guideline 201. (2011). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacterial, Growth Inhibition Test. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9720101e.pdf?expires=1496828907&id=id&accname=guest&checksum=CA13C7EFB60CD22A92D5A8176A2638C5>.
- OECD Guideline 202. (2004). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en;jsessionid=2edf86pk4n1po.x-oecd-live-02.
- OECD Guideline 236. (2013). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9713161e.pdf?expires=1496829051&id=id&accname=guest&checksum=2F1F0389790379C13D467870D1B56102>.
- Okamoto, A., Yamamuro, M., & Tatarazako, N. (2015). Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology*, 35(7), 824-830.
- Papageorgiou, I., Brown, C., Schins, R., Singh, S., Newson, R., Davis, S., et al. (2007). The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 28(19), 2946-2958.
- Shi, T., Schins, R. P. F., Knaapen, A. M., Kuhlbusch, T., Pitz, M., Heinrich, J., et al. (2003). Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. *J Environ Monit*, 5, 550-556.