

Charakterisierung von Metalloxid-Nanopartikeln und Untersuchung der Adsorption von Modellsubstanzen

am Beispiel von Kupferoxid-, Cerdioxid- und Siliziumdioxid-Nanopartikeln

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

Dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) an der Universität Bremen vorgelegt

von

Steve Bemowsky

im März 2021

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2015 bis März 2021 im Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der Universität Bremen angefertigt.

Datum der Verteidigung: 15.04.2021

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Ralf Dringen
	Centre for Biomolecular Interactions Bremen (CBIB)
	Universität Bremen, Deutschland
	Fachbereich 2 (Biologie/Chemie)
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Ingo Grunwald
	Hochschule Bremen, Deutschland
	Fakultät 5 Natur und Technik

Versicherung an Eides Statt

Ich, Steve Bemowsky, Steffensweg 157, 28217 Bremen, 2373830,

versichere an Eides Statt durch meine Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die ich wörtlich dem Sinne nach aus Veröffentlichungen entnommen habe, als solche kenntlich gemacht habe, mich auch keiner anderen als der angegebenen Literatur oder sonstiger Hilfsmittel bedient habe.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorgenannten Angaben nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und dass die Angaben der Wahrheit entsprechen und ich nichts verschwiegen habe.

Die Strafbarkeit einer falschen eidesstattlichen Versicherung ist mir bekannt, namentlich die Strafandrohung gemäß § 156 StGB bis zu drei Jahren Freiheitsstrafe oder Geldstrafe bei vorsätzlicher Begehung der Tat bzw. gemäß § 161 Abs. 1 StGB bis zu einem Jahr Freiheitsstrafe oder Geldstrafe bei fahrlässiger Begehung.

Ort, Datum, Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Dan	ksagung	IX
Auf	bau der 🛛	DissertationX
Zusa	ammenfa	ssungXI
Sum	nmary	XIII
Abk	ürzungsv	erzeichnisXV
1.	Einleitur	ng1
1.1	Nanotec	hnologie in der Gesellschaft1
1.2	Metal	loxid-Nanopartikel3
	1.2.1	Physikochemische Eigenschaften3
	1.2.2	Charakterisierung
	1.2.3	Kolloidale Stabilität8
	1.2.4	Anwendungen in der Industrie und Umwelt10
1.3	Transf	ormationen von Nanopartikeln in der Umwelt13
	1.3.1	Wechselwirkungen Natürlicher Organischer Materie mit Nanopartikeln 14
	1.3.2	Folgen der Freisetzung von Nanopartikeln15
	1.3.3	Herausforderungen der Charakterisierung von Biomolekül-Coronas17
1.4	Ziel de	er Promotionsarbeit
1.5	Quelle	nangaben
2.	Experim	entelle Ergebnisse / Veröffentlichungen
2.1	Review	v: Changing environments and biomolecule coronas: Consequences and
chal	llenges fo	r the design of environmentally acceptable engineered nanoparticles
2.2 dim	Paper: ercaptos	Quantification and biodegradability assessment of meso-2,3- uccinic acid adsorbed on iron oxide nanoparticles
2.3 nan	Manu: oparticle:	script: Formation and biodegradation of NOM coronas on metal oxide
3.	Zusamm	enfassende Diskussion
3.1 Met	Einflüs alloxid-N	sse auf die Entstehung einer Biomolekül-Corona und deren Bedeutung für anopartikel
3.2 Kup	Vergle feroxid-,	ich des Adsorptionsverhaltens ausgewählter Metalloxide am Beispiel von Cerdioxid- und Siliziumdioxid-Nanopartikeln116

4.	Anhang	133
3.6	Quellenangaben	128
3.5	Zukunftsaussichten	124
3.4	Biologische Abbaubarkeit von auf Nanopartikeln adsorbierten Biomolekülen	122
Nan	opartikeln	119
3.3	Charakterisierung von Biomolekül-Coronas und Analyse ihrer Interaktionen	mit

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Stolte bedanken, durch ihn die Idee und Möglichkeit zur Promotion erhalten zu haben. Im Rahmen meiner Promotionsarbeit konnte ich stets auf seine Unterstützung und wissenschaftlichen Rat vertrauen.

Außerdem möchte ich meinen Dank für das Begutachten meiner Dissertation an Prof. Dr. Ralf Dringen sowie Prof. Dr. Ingo Grunwald aussprechen.

Insbesondere möchte ich auch der Hans-Böckler-Stiftung für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums über 3 Jahre im Rahmen der Graduiertenschule NanoCompetence danken. Die Zusammenarbeit und wissenschaftlichen Diskussionen mit allen Kolleginnen und Kollegen sowie Assoziierten des Promotionskollegs war besonders wertvoll für mich.

Den Kolleginnen und Kollegen des UFTs in der AG Thöming und AG Stolte, besonders aber Alica, Jan, Marta und Ulrike, möchte ich für die Unterstützung und die wissenschaftlichen Diskussionen danken. Unsere gemeinsame Arbeit – sowie auch unsere Kaffeepausen – haben mir stets gute Laune bereitet und mich motiviert.

Meiner Familie gilt ein besonderer Dank für die dauerhafte Motivation und Unterstützung während meiner nicht immer ganz leichten Doktorandenzeit. Vor allem möchte ich meiner Ehefrau Sarah für einfach alles danken. Du bist immer an meiner Seite und gemeinsam unterstützen wir uns bei all unseren Tätigkeiten. Ohne dich wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

Aufbau der Dissertation

Diese Promotionsarbeit untergliedert sich in drei Kapitel: Einer thematischen Einleitung, den experimentellen Ergebnissen bzw. Veröffentlichungen und einer zusammenfassenden Diskussion der wichtigsten Ergebnisse. In der Einleitung wird das Thema der Nanotechnologie aufgegriffen und die verschiedenen Eigenschaften sowie Anwendungen von Metalloxid-Nanopartikeln beschrieben. Weiterhin wird auf das Verhalten, die potenziellen Folgen einer Freisetzung und mögliche Herausforderungen der Charakterisierung von Biomolekül-Coronas der Nanomaterialien in der Umwelt eingegangen.

Das Kapitel der experimentellen Ergebnisse umfasst zunächst die Veröffentlichung zu den Konsequenzen und Herausforderungen an das Design umweltfreundlicher einer sich verändernden Nanopartikel sowie dem Einfluss Umwelt und Biomolekül-Corona (Kapitel 2.1). In einer weiteren Veröffentlichung wird die Quantifizierung und biologische Abbaubarkeit eines synthetischen Coatings von Eisenoxid-Nanopartikeln beschrieben (Kapitel 2.2). Abschließend erfolgt die Betrachtung des Manuskriptes mit noch unveröffentlichten Ergebnissen zur Ausbildung verschiedener biologischen Abbaubarkeit auf Metalloxid-Nanopartikeln und adsorbierter Modellsubstanzen (Kapitel 2.3).

In der zusammenfassenden Diskussion werden die wesentlichen Ergebnisse der Promotionsarbeit prägnant diskutiert. Dabei werden das Verhalten sowie die Interaktionen von Nanopartikeln mit Biomolekülen hinsichtlich der Auswirkungen der Biomolekül-Corona untersucht. Abschließend werden mögliche Zukunftsaussichten betrachtet, in welchen potenziell neue Erkenntnisse erhalten werden können.

Zusammenfassung

Der weit verbreitete Einsatz von Nanomaterialien in Alltagsprodukten und die damit verbundenen Zunahme des Produktionsvolumens erhöht die Wahrscheinlichkeit einer potenziellen Freisetzung von Nanopartikeln in die Umwelt. Gleichzeitig sind längst nicht alle ökologischen und gesundheitlichen Folgen, die sich aus dem Einsatz von nanopartikulären Materialien ergeben können, geklärt. Generell ist über die physikochemischen und der Eigenschaften Nanomaterialien deren Anwendungsmöglichkeiten oft mehr bekannt als über deren möglichen Auswirkungen und Verhalten. Insbesondere der Einfluss der Biomolekül-Corona auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften oder auf z.B. Toxizität, Bioverfügbarkeit und Transformation von Nanomaterialien in der Umwelt ist bisher kaum untersucht.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde zunächst der Kenntnisstand zum Einfluss von Umweltbedingungen auf das Schicksal und Verhalten von Nanomaterialien sowie deren Zusammenhang mit der Bildung einer Biomolekül-Corona und der kolloidalen Stabilität von Nanopartikeln betrachtet. Aus diesen Informationen wurden außerdem Strategien für das Design umweltfreundlicher Nanomaterialien abgeleitet.

Die Identifizierung Quantifizierung Substanzen, die und von an Nanopartikeloberflächen adsorbiert sind, ist nach wie vor eine Herausforderung - insbesondere dann, wenn in der Umwelt vorhandene natürliche organische Materie für die Ausbildung der Biomolekül-Corona der Nanomaterialien verantwortlich ist. Zur Quantifizierung adsorbierter schwefelhaltiger Verbindungen wurde eine ionenchromatographische Methode entwickelt, um die Konzentration der an Eisenoxid-Nanopartikeln adsorbierten Dimercaptobernsteinsäure analytisch zu bestimmen.

Das Adsorptionsverhalten ausgewählter Metalloxid-Nanopartikel (CuO-, CeO₂- und SiO₂-NPs) mit verschiedenen Modellsubstanzen (Catechin, Tanninsäure, Huminsäure, NR-NOM, Cetlylpyridiniumchlorid) wurde untersucht. Aus dem Vergleich der Adsorption, zusammen mit den Daten zur kolloidalen Stabilität, wurden Rückschlüsse auf das Verhalten und die Wechselwirkungen der ausgebildeten Biomolekül-Coronas gezogen. So ist die Adsorption von Catechin und NR-NOM an CuO-NPs sowie von Catechin und Tanninsäure an CeO₂-NPs in salzhaltigem Medium geringer als in Reinstwasser. Im Gegensatz dazu steigt die Adsorption von Tanninsäure an CuO-NPs und von Huminsäure sowie Cetylpyridiniumchlorid an CeO₂-NPs in Gegenwart von mehrwertigen Ionen. Dies ist auf die Komplexierung der Kupferionen an der Oberfläche

bzw. die Mehrschichtadsorption durch Brückenbildung zwischen multivalenten Ionen und den adsorbierten Biomolekülen zurückzuführen.

Neben dem biologischen Abbau organischer Moleküle können auch Coatings und Biomolekül-Coronas von Nanopartikeln in der Umwelt mikrobiell abgebaut werden. Die Biomoleküle Catechin und Tanninsäure sind nach der Adsorption an das Nanomaterial weniger bioverfügbar, sodass die biologische Abbaubarkeit im Vergleich zu freien (gelösten) Substanzen reduziert ist. Dagegen ändert sich die biologische Abbaubarkeit von NR-NOM, Huminsäure, Cetylpyridiniumchlorid und Dimercaptobernsteinsäure nach der Adsorption nicht. Abgesehen von der veränderten Bioverfügbarkeit nach NP-Adsorption werden die Biomoleküle möglicherweise auch durch Desorption über einen längeren Zeitraum verzögert freigesetzt oder weisen veränderte toxische Effekte auf. Die genauen Auswirkungen der Adsorption von Biomolekülen auf deren Wechselwirkungen sind jedoch noch unzureichend untersucht.

Summary

The widespread use of nanomaterials in everyday products and the associated increase in production volume increases the probability of a possible release of nanoparticles into the environment. At the same time, not all of the ecological and health consequences that may result from the use of nanoparticulate materials have been clarified by a long shot. In general, more is often known about the physicochemical properties of nanomaterials and their potential applications than about their possible effects and behavior. In particular, the influence of the biomolecule corona on the physicochemical properties or on, for example, toxicity, bioavailability and transformation of nanomaterials in the environment has hardly been investigated so far.

This doctoral thesis first considered the state of knowledge on the influence of environmental conditions on the fate and behaviour of nanomaterials and their relationship to the formation of a biomolecule corona and the colloidal stability of nanoparticles. This information was also used to derive strategies for the design of environmentally friendly nanomaterials.

The identification and quantification of substances adsorbed on nanoparticle surfaces remains a challenge – especially when natural organic matter present in the environment is responsible for the formation of the biomolecule corona of the nanomaterials. To quantify adsorbed sulfur-containing compounds, an ion chromatographic method was developed to analytically determine the concentration of dimercaptosuccinic acid adsorbed on iron oxide nanoparticles.

The adsorption behaviour of selected metal oxide nanoparticles (CuO-, CeO₂- and SiO₂-NPs) with different model substances (catechin, tannic acid, humic acid, NR-NOM, cetlylpyridinium chloride) was investigated. From the comparison of adsorption, together with the colloidal stability data, conclusions were drawn about the behaviour and interactions of the formed biomolecule coronas. Thus, the adsorption of catechin and NR-NOM on CuO-NPs as well as of catechin and tannic acid on CeO₂-NPs in saline medium is lower than in ultrapure water. In contrast, the adsorption of tannic acid to CuO-NPs and of humic acid and cetylpyridinium chloride to CeO₂-NPs increases in the presence of multivalent ions. This is due to the complexation of copper ions on the surface and multilayer adsorption by bridging between multivalent ions and the adsorbed biomolecules, respectively.

In addition to biodegradation of organic molecules, coatings and biomolecule coronas of nanoparticles can also be microbially degraded in the environment. The biomolecules

catechin and tannic acid are less bioavailable after adsorption to the nanomaterial, so biodegradability is reduced compared to free (dissolved) substances. In contrast, the biodegradability of NR-NOM, humic acid, cetylpyridinium chloride and dimercaptosuccinic acid does not change after adsorption. Apart from altered bioavailability after NP adsorption, the biomolecules may also be released delayed by desorption for a longer period of time or exhibit altered toxic effects. However, the exact effects of adsorption of biomolecules on their interactions are still insufficiently studied.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
€	Euro
<	kleiner
>	größer
±	Plus-Minus
~	ungefähr
0	Grad
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μΜ	Mikromolar
μm	Mikrometer
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BOD	biochemischer Sauerstoffbedarf (engl. biochemical oxygen demand)
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
CeO ₂	Cerdioxid
Cit	Citrat
cm	Zentimeter
CNM	Kohlenstoff-Nanomaterialien (engl. carbon nanomaterials)
CNT (SW-/MW-)	Einwandige/Mehrwandige Kohlenstoff-Nanoröhren (engl. single / multi wall carbon nanotubes)
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
CuO	Kupferoxid
d	Durchmesser

Da	Dalton
DIONP	Dimercaptobernsteinsäure Eisenoxid Nanomaterial
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DMSA	Dimercaptobernsteinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff (engl. dissolved organic carbon)
DOM	gelöste organische Materie
e.g.	zum Beispiel (lat. exempli gratia)
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ELS	Elektrophoretische Lichtstreuung
EPA	engl. environmental protection agency
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
ESI	engl. electronic supplementary information
et.al	und andere (lat. et alii)
etc.	und die übrigen (lat. et cetera)
EU	Europa
FA	Fulvinsäure (engl. fulvic acid)
Fe _x O _y	Eisenoxid
Fig	Abbildung (engl. figure)
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC-FID	Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektor
GCxGC	Zweidimensionale Gaschromatographie

Stunde (engl. hour)

Huminsäure (engl. humic acid)

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

h

HA

HPLC

i.e.	das heißt (lat. id est)
IC	Ionenchromatographie
IEP	Isoelektrischer Punkt
IONM	Eisenoxid Nanomaterial (engl. iron oxide nanomaterial)
K _{OW}	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
L	Liter
LOD	Nachweisgrenze (engl. limit of detection)
LOQ	Quantifizierungsgrenze (engl. limit of quantification)
m ²	Quadratmeter
mg C	Milligramm Kohlenstoff
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm ³	Kubikmillimeter
mmol	Millimol
mol C	Mol Kohlenstoff
MS	Massenspektrometer
MUA	Mercaptopropionsäure
mV	Millivolt
mW	Milliwatt
ΜΩ	Megaohm
n	Brechungsindex
ng	Nanogramm
NM	Nanomaterial
nm	Nanometer
NOM	Natürliche organische Materie
NP	Nanopartikel

XVIII			

NPOC	nicht ausblasbarer organischer Kohlenstoff (engl. non purgeable organic carbon)
NZVI	engl. nano zerovalent iron
OECD	engl. Organisation for Economic Cooperation and Development
PAA	Polyacrylsäure
PEG	Polyethylenglycol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
РҮ	Pyrolyse
QD	Quantenpunkt (engl. quantom dot)
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (engl. relative centrifugal force)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
S	Sekunde
SiO ₂	Siliziumdioxid
SRFA	engl. Suwannee River Fulvic Acid
SRHA	engl. Suwannee River Humic Acid
t	Tonne
ТА	Tanninsäure (engl. tannic acid)
TD	Thermodesorption
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
ТОС	Gesamter organischer Kohlenstoff (engl. total organic carbon)
ТОРО	Trioctylphosphinoxid
UV/VIS	ultraviolet und sichtbares
vdW	van der Waals
WWTP	Kläranlage (engl. waste water treatment plant)

XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. X-ray
	photoelectron spectroscopy)
z.B.	zum Beispiel
ε	Dielektrische Konstante
η	Viskosität

1. Einleitung

1.1 Nanotechnologie in der Gesellschaft

Der erste Einsatz kleinster Teilchen, welche heute als Nanopartikel (NP) bezeichnet werden, ist auf die Zeit vor Christus zu datieren. Bereits im 14. und 13. Jh. v. Chr. haben die Ägypter und Mesopotamier synthetisierte metallische NPs zur Einfärbung von Glas verwendet (Brill & Cahill, 1988). Nanotechnologie als solche existierte demnach schon lange vor der ersten Grundidee von Richard Feynman aus dem Jahr 1959 (Feynman, 1959) und der ersten Prägung des Begriffs "Nanotechnologie" durch Norio Taniguchi im Jahr 1974 (Taniguchi, 1974). Nanotechnologie umfasst die Herstellung, Untersuchung und Anwendung von funktionellen Strukturen mit Dimensionen im Bereich von weniger als hundert Nanometern (Allhoff, Lin, & Moore, 2010). Nach Al-Kayiem et.al werden Nanomaterialien auf Basis ihres Materials in drei Kategorien unterteilt (Al-Lin, & Lukmon, 2013): Anorganische (Metall-, Metalloxid-NPs, Kayiem, Quantenpunkte), Organische (kohlenstoffbasierte NPs wie Fullerene, Kohlenstoffnanoröhrchen) und Hybride (Kombination von anorganischen und organischen Materialien).

In den letzten Dekaden stellen Nanomaterialien für eine Vielzahl von Anwendungen einen aussichtsreichen Technologiebereich mit enormen Möglichkeiten dar. Viele technische und industrielle Felder nutzen die besonderen Eigenschaften von NPs, wie beispielsweise ihre hohe chemische Reaktivität sowie katalytische Wirksamkeit, um ressourcen- und energieschonende Alternativen zu bisherigen Produkten und Verfahren zu etablieren. Nanotechnologische Produkte sind in vielen Alltagsprodukten wie Farben und Lacken (de Lucas-Gil, Menéndez, Pascual, Fernández, & Rubio-Marcos, 2020), Kosmetikartikeln (Oberdörster, Oberdörster, & Oberdörster, 2005) oder Materialien wie Kunststoffen (Delgado, Quijada, Palma, & Palza, 2011) zu finden und werden für z.B. antibakterielle oder schmutzabweisende Beschichtungen auf Kleidung (Vincent, Hartemann, & Engels-Deutsch, 2016) eingesetzt. In der Medizin erfolgt die Entwicklung neuer und die Optimierung vorhandener Medikamente sowie Therapieverfahren, bei welchen mit Hilfe von NPs gezielt Medikamente im Organismus transportiert werden können (Laurent, Boutry, & Muller, 2018). Weiterhin können NPs durch den Einsatz in der Elektrotechnik zu leistungsfähigeren und kleineren Computern beitragen (Tan, An, Chua, & Tran, 2019) oder Anwendung in der Sanierung der Umwelt, z.B. zur Boden- und Wasserreinigung, finden (Yue et al., 2019).

Obwohl längst nicht alle Fragen zu ökologischen und gesundheitlichen Konsequenzen der Nanomaterialien geklärt sind, steigen die Anzahl ihrer Einsatzgebiete und damit auch ihr Verbrauch an (Kwon et al., 2018). Speziell aufgrund der vielfältigen Chancen

und Vorteile von NPs ist die Untersuchung ihrer Risiken von großer Bedeutung. Die Identifizierung vorhandener Wissenslücken der Auswirkungen von NPs unter Berücksichtigung der Transformationen von Nanomaterialien in der Umwelt sollte fokussiert werden, womit der Öffentlichkeit frühzeitig, transparent und sachlich Informationen bereitgestellt werden können. Hierbei ist das Kommunizieren von Risiken mitsamt einer Folgenabschätzung für Mensch und Umwelt wichtig zur Nutzung des Potentials dieser noch jungen Technologie.

1.2 Metalloxid-Nanopartikel

Unter den verschiedenen Arten von Nanomaterialien weisen anorganische NPs global die höchsten Produktionsvolumen auf. Vor allem Metalloxide wie Titandioxid (TiO₂) oder Siliziumdioxid (SiO₂) werden aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften und Anwendungen in Körperpflegeprodukten, Farben und Beschichtungen in hohen Mengen zu Nanomaterialien verarbeitet (Janković & Plata, 2019). Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen gewinnen jüngst Metalloxid-NPs aus Kupferoxid (CuO) und Ceroxid (CeO₂) hinsichtlich ihrer Anwendungsgebiete und dem damit verbundenen Eintrag in die Umwelt an Bedeutung (siehe Kapitel 1.2.4). Die antibakterielle Wirkung sowie katalytischen Eigenschaften von CuO- und CeO₂-NPs ermöglichen deren Einsatz in verschiedenen biomedizinischen Produkten (Grigore, Biscu, Holban, Gestal, & 2016) als Grumezescu, oder beispielsweise Drei-Wege-Katalysator in der Automobilindustrie (Montini, Melchionna, Monai, & Fornasiero, 2016)

Metalloxid-NPs können in der Regel auf einfache, umweltfreundliche und kostengünstige Weise hergestellt werden, aber ähnlich wie metallische NPs kann ihre kolloidale Stabilität leicht durch Umweltparameter wie pH-Wert oder Ionenstärke beeinflusst werden (Markiewicz et al., 2018). Generell ist häufig mehr über die physikochemischen Eigenschaften der Nanomaterialien und deren Einsatzmöglichkeiten bekannt als Informationen zu deren möglichen Auswirkungen auf den Menschen und die Umwelt. Die Schließung der Wissenslücke zwischen physikalisch-chemischen Eigenschaften und deren Einfluss auf z.B. Toxizität, Bioverfügbarkeit und Transformation von Nanomaterialien in der Umwelt ist für den sicheren Umgang mit NPs unerlässlich.

1.2.1 Physikochemische Eigenschaften

Das Verhalten von Nanomaterialien und deren Auswirkungen auf die Umwelt sind stark abhängig von dem Einfluss des umgebenden Mediums sowie den physikochemischen Eigenschaften des Materials auf Nanopartikelbasis. Dazu gehören beispielsweise die elementare Zusammensetzung und Kristallstruktur der NPs, deren Partikelgröße sowie -form, die Partikelgrößenverteilung, deren Löslichkeit, die spezifische Oberfläche, Oberflächenladung, -morphologie, -energie und -beschichtung, aber auch deren Leitfähigkeit, Oxidationszustand und Fotoaktivität (Abbildung 1 nach Markiewicz et.al; erstellt von Steve Bemowsky). Diese Parameter wirken sich wiederum auf die Auflösung, kolloidale Stabilität und Reaktivität der NPs aus und beeinflussen damit das NP-Verhalten und deren Verbleib (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020).



Abbildung I: Übersicht der Eigenschaften von Nanomaterialien. Das Verhalten von NPs ist unter anderem abhängig von ihren Eigenschaften. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihres Materials (elementare Zusammensetzung, Dotierung, Kristallstruktur), der Größe (Form, Durchmesser, Aspektverhältnis, spezifische Oberfläche) und Aktivität (Oberflächenladung, Reaktivität, Oxidationszustand, Fotoaktivität) sowie der Oberflächenmodifizierung (Core-Shell und organische Beschichtungen). Die Abbildung wurde adaptiert von Markiewicz et al. (2018) und erstellt von Steve Bemowsky.

In Abhängigkeit der elementaren Zusammensetzung eines Materials weisen NPs variierende Eigenschaften auf. Beispielsweise können CuO-NPs sowohl in Nanopartikelform als auch durch Freisetzung von Kupfer-Ionen (Cu²⁺) toxisch (D. Wang et al., 2016) auf Daphnia magna oder Vibrio fischeri (Du et al., 2019), wohingegen TiO2-NPs der gleichen Größe keine toxikologischen Effekte gegenüber diesen Organismen vorzeigen (Heinlaan, Ivask, Blinova, Dubourguier, & Kahru, 2008). Die chemische Komposition der Nanomaterialien kann sich dabei auch aus mehreren Elementen zusammensetzen, wie es bei Quantenpunkten oder Core-Shell Partikeln der Fall ist. Das Zusammenwirken der unterschiedlichen Elemente beeinflusst maßgeblich das Verhalten der NPs (Briffa, Lynch, Hapiuk, & Valsami-Jones, 2019). Betrachtet man weiterhin unterschiedliche Kristallstrukturen desselben Materials, so können verschiedene Wechselwirkungen zwischen NPs und der Umwelt auftreten (Clément, Hurel, & Marmier, 2013). Im Gegensatz zu der Kristallstruktur von Rutil wirkt Anatas

(beides TiO₂ Minerale) schädigender auf *Daphnia magna* (X. Chen, Zhu, Yang, Zhu, & Lin, 2019). Obwohl die elementare Zusammensetzung und die Kristallstruktur eine entscheidende Rolle auf das Verhalten von Nanomaterialien haben, stellt die Partikelgröße einen ebenso wichtigen Einflussfaktor auf potenzielle Auswirkungen von NPs dar (Amde, Liu, Tan, & Bekana, 2017).

Nanoskalige Substanzen weisen aufgrund ihrer geringen Partikelgröße, deren Größenverteilung über die Synthese beeinflusst werden kann, besondere Eigenschaften auf. Häufig unterscheiden sich Nanomaterialien deutlich vom Bulkmaterial, da mit sinkender Partikelgröße das Oberflächen-Volumen Verhältnis zunimmt. Im Allgemeinen steigt mit zunehmender Oberfläche die Wahrscheinlichkeit von Interaktionen (oberflächlich ablaufende Reaktionen) zwischen NPs und der Umgebung (Theivasanthi & Alagar, 2011). In diesem Zusammenhang ist die nachteilige Wirkung zu beobachten, dass die Partikelgrößen – insbesondere wenn NPs kleiner werden – unterschiedliche Einflüsse auf die Toxizität der NPs haben (Kim et al., 2019). Beispielsweise sind kleinere Zinkoxid-NPs zytotoxischer gegenüber der menschlichen Leberkrebs-Zelllinie HepG2 (P. Chen et al., 2019). Weitere Unterschiede zwischen Bulkund Nanomaterial können auf quanten-physikalischen Effekten basieren, welche Einfluss auf die Leitfähigkeit oder die optischen Eigenschaften von metallischen NPs haben (Kirn et al., Seischen NPs haben können (El-Trass, ElShamy, El-Mehasseb, & El-Kemary, 2012).

Die variierenden Formen und damit einhergehenden Aspektverhältnisse von NPs (sphärisch, kubisch, faserig, stangenförmig, etc.) haben ebenso wie die Partikelgröße einen Einfluss auf die NP-Oberfläche. Eine Formveränderung von CuO-NPs zu blumenkohlförmigen Partikeln durch Dotierung mit Zink beeinflusst z.B. die Bandlückenenergie des Materials, wodurch sich deren physikochemischen Eigenschaften verändern können (Kumar et al., 2020).

Neben den Materialeigenschaften beeinflusst die Oberflächenbeschaffenheit die kolloidale Stabilität von NPs. Aufgrund der Oberflächenladung kommt es zu elektrostatischen Anziehungs- oder Abstoßungskräften zwischen festen Oberflächen und/oder gelösten Substanzen, welche einen direkten Einfluss auf die Art der Wechselwirkungen und damit das Schicksal der Nanomaterialien haben (Titus, James Jebaseelan Samuel, & Roopan, 2019). Als Indikator der Stabilität kolloidaler Dispersion wird häufig das Zeta-Potential (elektrisches Potential einer elektrochemischen Doppelschicht) betrachtet, welches ein indirektes Maß für die Stärke der Oberflächenladung und -funktionalität darstellt (Mourdikoudis, Pallares, & Thanh, 2018) und abhängig von Umweltparametern wie dem pH-Wert sowie der Ionenstärke ist (Sousa & Teixeira, 2013). Dispergierte NPs mit einem hohen Zeta-Potential (größer

±40) gelten im Allgemeinen als kolloidal stabil (Titus et al., 2019) und verschiedene Aspekte wie die Adsorption von NPs an im Boden enthaltenen Verbindungen wie Sand (W. Zhang, Schwab, White, & Ma, 2018) oder die Interaktion mit Biomolekülen (Y. Zhang, Chen, Westerhoff, & Crittenden, 2009) werden primär durch die Oberflächenladung reguliert.

Entsprechend verhalten sich NPs mit einer gezielten Oberflächenfunktionalisierung (während der NP-Synthese zwecks Stabilisierung oder Funktionalität aufgebrachte Beschichtung) bzw. einer auf Basis der in der Umwelt vorliegenden organischen Strukturen ausgebildeten Biomolekül-Corona gänzlich anders als reine unbehandelte NPs (Louie, Tilton, & Lowry, 2016). Die Oberflächenbeschichtung spielt für die Interaktionen der NPs mit biologischen Systemen eine kritische Rolle und kann deren physikochemischen Eigenschaften beeinflussen (Louie et al., 2016). Damit einhergehend können transformierte Nanomaterialien variierende toxikologische Effekte vorweisen. Die Adsorption natürlicher organischer Materie reduziert z.B. die Toxizität von CuO-NPs an E. coli Bakterien (Zhao, Wang, Dai, & Xing, 2013) oder von CeO2-NPs an die Algen P. subcapitata (Van Hoecke, De Schamphelaere, Van der Meeren, Smagghe, & Janssen, 2011), indem der Kontakt der NP-Oberfläche mit den Organismen durch elektrostatische und sterische Wechselwirkungen verhindert wird (Z. Wang, Zhang, Zhao, & Xing, 2016).

1.2.2 Charakterisierung

Die Untersuchungen nanopartikulärer Effekte auf biologische Systeme sowie das des der Verstehen Verhaltens Nanomaterialien erfordert die extensive Charakterisierung der NPs. Speziell in Bezug auf deren Verbleib in der Umwelt bedarf es des Wissens über die kolloidale Stabilität unter verschiedenen Bedingungen. Zu charakterisierende Aspekte der NPs sind in Kapitel 1.2.1 aufgeführt und umfassen neben physikochemischen Eigenschaften auch deren Reaktivität und Oberflächenfunktionalisierung. Analytische Methoden zur Untersuchung der unterschiedlichen Parameter sind in Anlehnung an (Anu Mary Ealia & Saravanakumar, 2017; Modena, Rühle, Burg, & Wuttke, 2019; Mourdikoudis et al., 2018; Titus et al., 2019) in Tabelle 1 aufgelistet.

)	
Charakterisierungsverfahren	Analysierte Parameter	Informationen über
Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	Absorption	Elementgehalt
BET-Messung (Brunauer Emmett Teller)	Adsorption/Desorption von Gasen	Spezifische Oberfläche
Dynamische Lichtstreuung (DLS)	Hydrodynamischer Radius	Partikelgröße
Elektronenmikroskopie (engl. Transmissions-, TEM; Scanning-, SEM)	Elektronenstreuung	Größenverteilung, Komposition, Kristallinität, Morphologie
Elektrophoretische Lichtstreuung (ELS)	Zeta-Potential	Oberflächenladung
Molekülspektroskopie (Infrarot-, IR; Raman-)	Molekülschwingungen	Oberflächenfunktionalisierung
Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscope, AFM)	Optische Veränderung der Nadelposition (Maß für wirkende atomare Kräfte)	Größe, Oberflächentextur, Morphologie
Röntgendiffraktometrie (XRD)	Röntgenbeugung	Kristallstruktur, Partikelgröße
Röntgenfluoreszenzspektroskopie (XRF)	Röntgenfluoreszenz	Chemische Zusammensetzung
Thermische Analyse (Differenzscankalorimetrie,	Spezifische Wärme bzw. Masse	Oberflächenbelegung, Thermische

Tabelle 1: Übersicht analytische Methoden zur Charakterisierung von Nanomaterialien.

Oberflächenbelegung, Thermische

Stabilität

Oberflächenchemie

Absorption

DSC; Thermogravimetrische Analyse, TGA)

UV/VIS-Spektroskopie

1.2.3 Kolloidale Stabilität

Die Stabilität eines kolloidalen Systems ist definiert durch die im Gleichgewicht in Lösung suspendiert bleibenden Partikel. Im Allgemeinen können NP-Dispersion aber aufgrund ihrer hohen Gesamtoberflächenenergie - bedingt durch ihre große Oberfläche - thermodynamisch instabil werden (Phan & Haes, 2019). Im Falle einer Destabilisierung können die Nanomaterialien aggregieren oder agglomerieren, wodurch aufgrund der Zunahme der Partikelgröße die verfügbare freie Oberflächenenergie sowie spezifische Oberfläche sinkt (Amde et al., 2017). Der Prozess der Agglomeration basiert auf der Anziehung und Zusammenlagerung von NPs durch schwache molekulare Wechselwirkungen wie den Van-der-Waals-Kräften. Weiterhin haben elektrische Kräfte, welche beispielsweise von einer elektrochemischen Doppelschicht ausgehen, einen Einfluss auf die Agglomeration (Dunphy Guzman, Finnegan, & Banfield, 2006). Eine elektrochemische Doppelschicht setzt sich zusammen aus einer starren Schicht von Gegenionen, die zur Aufrechterhaltung der elektrischen Neutralität des Systems von der Teilchenoberfläche angezogen werden und einer diffusen Schicht von Ionen (Dunwell, Yan, & Xu, 2018). Wenn sich die Teilchen bewegen, bewirkt die Reibung zwischen zwei Partikeln, dass ein loser Teil der Ionen in der diffusen Schicht abgeschert wird, sodass sie nach außen hin nicht mehr elektrisch neutral erscheint und eine Oberflächenladung aufweist (Attard, Antelmi, & Larson, 2000). Basierend auf der Theorie nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek (DLVO) kann die kolloidale Stabilität eines nanopartikulären Systems und damit die Neigung von NPs zur Agglomeration durch die Summe attraktiver und repulsiver Wechselwirkungen bestimmt werden (Derjaguin & Landau, 1941; Overbeek & Verwey, 1948).

Im Kontrast zu den schwachen Wechselwirkungen in Agglomeraten bilden sich Aggregate durch kovalente oder metallische Bindungen zwischen den Partikeln (Min, Akbulut, Kristiansen, Golan, & Israelachvili, 2009). Diese Interaktionen sind deutlich stärker als intermolekulare Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen (Min et al., 2009) und können nicht leicht aufgebrochen werden, sondern nur z.B. mittels Ultraschallsonden dispergiert werden (Nguyen, Rouxel, Hadji, Vincent, & Fort, 2011). Entsprechend korreliert die Aggregation stark mit der Sedimentation der NPs, als das die Sedimentationsraten mit zunehmender Aggregationsrate steigen und demnach größere Partikel eher sedimentieren (Ortelli et al., 2017). Neben der Partikelgröße ist die Sedimentationsgeschwindigkeit auch abhängig von der Dichte des Materials (Yazdimamaghani, Barber, Hadipour Moghaddam, & Ghandehari, 2018), da vorhandene NPs unter dem Einfluss der Schwerkraft stehen und sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung in Flüssigkeiten bewegen (Einstein, 1956).

Im Gegensatz zur Sedimentation korreliert die Aggregation negativ mit der Auflösung der NPs, indem die Auflösungsrate mit zunehmender Aggregationsrate abnimmt (Ortelli et al., 2017). Sowohl die Partikelgröße als auch die vorhandene NP-Oberfläche haben zusammen mit der chemischen Komposition der NPs, ihrer Kristallinität und der Partikelform einen wesentlichen Einfluss auf die Auflösung (Misra, Dybowska, Berhanu, Luoma, & Valsami-Jones, 2012). Oberflächenchemie und Expositionsbedingungen wie pH-Wert, Ionenstärke, gelöster Sauerstoff und Art der Salzionen oder Biomoleküle können ebenfalls Effekte auf die kolloidale Stabilität ausüben (Docter et al., 2015; Markiewicz et al., 2018). Anorganische NPs wie Metalle (Silber, Kupfer, etc.) und Metalloxide (Kupferoxid, Eisenoxid) setzen durch ihre Auflösung in Abhängigkeit von unter anderem dem pH-Wert und der Temperatur Ionen frei (Odzak, Kistler, Behra, & Sigg, 2014, 2015), welche Auswirkungen auf ihre Umgebung haben können. Im Allgemeinen können potenziell toxische Wirkungen auf z.B. Wasserorganismen durch die Metalloxid-NPs nicht nur durch freigesetzte Ionen, sondern auch durch Nanopartikeleffekte verursacht werden (D. Wang et al., 2016). Beispielsweise werden die antibakteriellen Eigenschaften von Zinkoxid-NPs nur durch freigesetzte Zink-Ionen (Zn^{2+}) hervorgerufen, während andere Metalloxide wie Eisen- (Fe₂O₃), Kobalt- (Co₃O₄), Chrom- (Cr₂O₃) oder Nickeloxid (NiO) nur in ihrer nanopartikulären Form antibakteriell wirken. Im Gegensatz dazu haben CuO-NPs sowohl direkt als auch durch freigesetzte Cu²⁺-Ionen eine antibakterielle Wirkung (D. Wang et al., 2016).

Die gewünschte bzw. zufällige Adsorption von Biomolekülen kann wesentlich zum Erhalten oder Erlangen eines stabilen Zustandes beitragen, um z.B. die Agglomeration und die Auflösungsrate der NPs zu reduzieren (Schubert & Chanana, 2018). Im Zusammenhang mit der Synthese von Metalloxid-NPs werden dafür häufig Biomoleküle oder Polymere wie beispielsweise Chitosan (Jayaramudu et al., 2019), Dextran (Perez, Asati, Nath, & Kaittanis, 2008), Polyethylenglycol (Karakoti et al., 2009), Polyvinylalkohol (Mallakpour, Dinari, & Azadi, 2015) oder Silane wie Decyltrimethoxyund Phenyltrimethoxysilan (Iijima, Takenouchi, Lenggoro, & Kamiya, 2011) eingesetzt. Die Ausbildung einer Biomolekül-Corona kann aber auch durch Interaktionen mit natürlicher organischer Materie aus der Umgebung erfolgen (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020). Elektrostatische Abstoßungskräfte wirken zwischen den elektrochemischen Doppelschichten verschiedener Partikel und sorgen dafür, dass die NPs in Dispersionen voneinander distanziert sind und weniger aggregieren (Peng et al., 2017). In ähnlicher Weise wirken sterische Hinderungen, indem Schichten adsorbierter Moleküle (z.B. Polymere) zusammengedrückt werden, wenn sich zwei Partikel einander nähern (sterisch hindern), was zu abstoßenden Kräften führt (Grillo, Rosa, & Fraceto, 2015; Peng et al., 2015). Diese Wechselwirkungen können bei Makromolekülen mit langen Kohlenwasserstoffketten auftreten oder beispielsweise durch beschichten der NPs mit ionischen Flüssigkeiten (Husanu et al., 2017) während der Synthese erzielt werden. Oberflächeneigenschaften der NPs können so gezielt verändert und eine Stabilisierung der NPs bewirkt werden. Die elektrischen und sterischen Abstoßungskräfte verhindern die Aggregation und Agglomeration der NPs aufgrund physikalischer Interaktionen oder der Bildung chemischer Bindungen, sodass die Dispersion über einen bestimmten Zeitraum keinen Veränderungen unterliegt und demnach kolloidal stabilisiert ist (Grillo et al., 2015; Oriekhova, Le Coustumer, & Stoll, 2017).

1.2.4 Anwendungen in der Industrie und Umwelt

Die Zahl der möglichen Anwendungen von Metalloxid-NPs wie Silizium-, Kupfer- oder Ceroxid haben sich in den letzten zehn Jahren etwa verachtfacht (Abbildung 2).



Abbildung 2: Anzahl der Veröffentlichungen mit Anwendungen von Metalloxid-NPs. Mit Hilfe von Google Scholar ermittelte Anzahl an Publikationen zu den Stichwörtern "metal oxide nanoparticles" "applications".

Metalloxid-NPs haben aufgrund ihrer besonderen nanopartikulären Eigenschaften wie Quanteneffekten oder dem großen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen ein breites Spektrum möglicher Anwendungen, von welchen in Abbildung 3 (nach Markiewicz et.al; erstellt von Steve Bemowsky) einige aufgezählt werden. Dazu gehören z.B. die Verwendung von CuO- oder CeO₂-NPs als Katalysatoren



Abbildung 3: Übersicht potenzieller Anwendungen von Nanomaterialien. Aufzählung verschiedener Applikationen aus den Bereichen Industrie, Elektronik, Medizin, Energie, Umwelt und Sonstige. Die Abbildung wurde adaptiert von Markiewicz et al. (2018) und erstellt von Steve Bemowsky.

für die Photooxidation von Phenol (Nayak et al., 2020) bzw. zur Entfernung von Schadstoffen, die bei der Verbrennung von Benzin entstehen (sogenannter Drei-Wege-Katalysator). Dies beinhaltet die gleichzeitige Förderung der Oxidation von Kohlenstoffmonoxid und unverbrannten Kohlenwasserstoffen sowie die Reduktion von Stickoxiden zu Kohlenstoffdioxid, Stickstoff und Wasser (Montini et al., 2016). CuO-NPs finden auch Anwendung als Gassensoren zur Detektion von beispielsweise Phenol (Wahab et al., 2020) oder Ozon (Ji, Zeng, & Li, 2019) und können zudem für die Herstellung von alternativen Kalium-Ionen-Batterien verwendet werden, die eine Reihe von Vorteilen gegenüber den üblichen auf Lithium-Ionen basierenden Batterien haben (Cao et al., 2019). Dazu gehören beispielsweise die Verfügbarkeit, die bessere Umweltverträglichkeit und die geringeren Kosten von Kalium im Vergleich zu Lithium. Darüber hinaus sind neben Silber- auch kupferbasierte NPs seit langem für ihre antimikrobielle Wirkung bekannt und werden z.B. in der Trinkwasseraufbereitung (Yue et al., 2019), in Pestiziden (Adisa et al., 2019), in medizinischen Anwendungen (Vincent et al., 2016) oder in Farben und Antifouling-Beschichtungen (Blanco-Covián, Campello-García, Blanco-López, & Miranda-Martínez, 2020) eingesetzt.

Trotz der bereits bestehenden Vielfalt der Anwendungsbereiche von Nanomaterialien gibt es kein einheitliches Bild ihrer Verwendung in Konsumgütern. Beispielsweise gibt es in großen Teilen der EU kein verpflichtendes Produktregister für Nanomaterialien in Lebensmitteln. Obwohl der Einsatz von NPs für Biozide. Kosmetika. Lebensmittelzusatzstoffe und Kunststoffe als Lebensmittelkontaktmaterialien reguliert ist, ist die Anzahl der Produkte, die NPs enthalten, nicht bekannt. Außerdem variiert zwischen den verschiedenen EU-Verordnungen – beispielsweise die Verordnung über neuartige Lebensmittel (EU 2015/2283) oder die Kunststoffverordnung (EU Nr. 10/2011) - die Definition eines Nanomaterials, sodass längst nicht alle Nanoprodukte in diesen gesetzlichen Regelungen berücksichtigt werden. Seit der 2018 erfolgten Anpassung der Europäischen Chemikalienverordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) in Bezug auf Nanomaterialien liegen deutlich mehr Informationen aus Industrie und Wissenschaft zu vorhandenen Nanomaterialien vor. Mittlerweile existieren einige Register für Produkte, die nanoskalige Stoffe enthalten, wie z.B. die Datenbank "nanowatch" des BUND (Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland, 2018) oder der "Nanodatabase" der Arbeitsgruppe Umwelt an der Technischen Universität von Dänemark (DTU Environment, 2020). Zusammen beinhalten diese über 5000 Einträge zu kommerziellen Produkten, welche Nanomaterialien enthalten. Zusätzlich gibt beispielsweise die Datenbank der EUON (Beobachtungsstelle der Europäischen Union für Nanomaterialien, 2021) eine Auskunft über die Anwendungen und gesammelten Daten von 333 verschiedenen Nanomaterialien, welche derzeit im EU-Markt vorhanden sind. Doch gibt es aufgrund fehlender Daten zum Verhalten und den Auswirkungen von Nanomaterialien auf den Menschen und die Umwelt noch viel Unwissenheit über die potenziellen Konsequenzen des Einsatzes von Nanomaterialien.

1.3 Transformationen von Nanopartikeln in der Umwelt

Aufgrund der zunehmenden Anzahl von NP-Arten und ihrer verschiedenen Anwendungen (siehe Kapitel 1.2.4) steigt die Wahrscheinlichkeit möglicher Auswirkungen durch den Eintrag von NPs in die Umwelt. Nanomaterialien mit hohen Produktionsvolumen wie TiO₂ und SiO₂, aber auch NPs in geringen Mengen, die in Produkten mit gezielter oder ungewollter Freisetzung in die Umwelt während ihres Lebenszyklus verwendet werden, erfordern eine bessere Bewertung ihrer potenziellen Emission und Auswirkung auf Organismen (Tolaymat, El Badawy, Genaidy, Abdelraheem, & Sequeira, 2017). Dieser Eintrag kann z.B. durch die Abwasserbehandlung (Lee, Lai, Ngai, & Juan, 2016), das Abwaschen von Sonnenschutzmitteln im Wasser (Mu & Sprando, 2010), der Verwendung als Pestizid in der Landwirtschaft (Zabrieski et al., 2015), die Verwitterung von Farben (Clar et al., 2019), die mechanischen Belastung von Beschichtungen (Hsu & Chein, 2007) oder das Waschen von Textilien (Mitrano, Limpiteeprakan, Babel, & Nowack, 2016) erfolgen.

Während sie in die Umwelt gelangen, sind Nanomaterialien verschiedenen chemischen und physikalischen Prozessen ausgesetzt (Auvinen, Gagnon, Rousseau, & Du Laing, 2017), die die physikochemischen Eigenschaften und das Verhalten der NPs stark beeinflussen (Abbas, Yousaf, Ullah, et al., 2020). Ein weiterer Faktor, der das Verhalten von NPs beeinflusst, ist ihre Wechselwirkung mit in der Umwelt vorhandener natürlicher organischer Materie (NOM). Die freigesetzten Nanomaterialien lassen sich entsprechend ihrem Verhalten nach der Adsorption von Makromolekülen und deren Auswirkungen auf ihre kolloidale Stabilität in drei Gruppen einteilen (Abbildung 4 nach Markiewicz et.al; erstellt von Steve Bemowsky). Diese unterscheiden sich in Bezug auf



Abbildung 4: Schematische Darstellung des NP-Verhaltens bei Freisetzung in die Umwelt. Einteilung der Nanomaterialien aufgrund ihres Verhaltens in die Gruppen: A – Interaktion mit NOM und reaktiv, B – Interaktion mit NOM und nicht reaktiv, C – größtenteils keine Interaktion mit NOM. Die Abbildung wurde adaptiert von Markiewicz et al. (2018) und erstellt von Steve Bemowsky.

ihre Wechselwirkung mit NOM, inwieweit diese Interaktion die Stabilität der NPs verändert und ob die NPs aufgelöst, transformiert oder komplexiert werden (Amde et al., 2017).

1.3.1 Wechselwirkungen Natürlicher Organischer Materie mit Nanopartikeln

Die in der Umwelt – z.B. in Böden, Süß- und Salzwasser – vorkommenden organischen Bestandteile werden oft als natürliche organische Materie (NOM) bezeichnet; eine komplexe Mischung von Verbindungen auf Kohlenstoffbasis, die aus chemischen und biologischen Abbauprozessen pflanzlicher und tierischer Rückstände resultieren (Prasad, Kentilitisca, Ramesh, & Suresh, 2020). NOM kann daher als eine Mischung aus polyelektrolytischen und polyfunktionalen organischen Molekülen beschrieben werden und kommt je nach den biogeochemischen Bedingungen in natürlichen Umgebungen in Konzentrationen zwischen 0,1 – 10 mg C L⁻¹ vor (Arvidsson, Hansen, & Baun, 2020; Philippe & Schaumann, 2014). Zu diesen Bedingungen gehören beispielsweise biologische, chemische und physikalische Parameter bzgl. des Klimas, der Wasser- bzw. Bodenbeschaffenheit oder der Art der vorhandenen Organismen. Aufgrund der räumlichen und zeitlichen Variation dieser Parameter über die vier Jahreszeiten gibt es auch Unterschiede in der molekularen Zusammensetzung, Struktur und molaren Masse, dem Säuregrad sowie der Ladungsdichte von NOM (Baalousha, Afshinnia, & Guo, 2018).

Diese Vielfalt von NOM ermöglicht die Interaktion mit fast allen Nanomaterialien durch Adsorption an der NP-Oberfläche und die damit verbundene Bildung einer Oberflächenbeschichtung, hier auch als Biomolekül-Corona bezeichnet. Um die Wechselwirkungen zwischen NPs und der Umwelt zu verstehen, ist das Verständnis der Eigenschaften der NOM-Corona unerlässlich. Die Interaktionen an der Grenzfläche der NPs mit dem umgebenden Medium werden durch die Eigenschaften der Oberfläche (z.B. Adsorptionskapazität, Ladung, Reaktivität), das Verhalten in der Umwelt (z.B. Agglomeration, Auflösung) und die biologischen Wechselwirkungen (z.B. Toxizität) beeinflusst (Baalousha 2018). Bioverfügbarkeit, et al., Ie nach Zusammensetzung der Biomolekül-Corona können sich diese Prozesse verändern und beispielsweise die toxischen Effekte eines NPs durch Erhöhung der kolloidalen Stabilität mildern (Arvidsson et al., 2020) oder den Verbleib und damit das Schicksal der Nanomaterialien beeinflussen (Maiga, Nyoni, Nkambule, Mamba, & Msagati, 2020).

1.3.2 Folgen der Freisetzung von Nanopartikeln

Jährlich werden circa 270 000 t der gängigsten Nanomaterialien aus Al_xO_y, CeO₂, Fe_nO_m, SiO₂, TiO₂ und ZnO hergestellt (Grillo, de Jesus, & Fraceto, 2018). Gemäß den vorhergesagten Freisetzungsszenarien landen 63-91% des davon rund NP-Produktionsvolumens auf Deponien oder im Boden (≈ 8–28 %) und circa 7 % in der aquatischen Umwelt (Bundschuh et al., 2018). Die Freisetzung der NPs wirkt sich auf das Verhalten und den Verbleib der Nanomaterialien aus, da Transformationsprozesse die physikochemischen Eigenschaften der NPs beeinflussen können. In diesem Zusammenhang ist besonders die physikalische Transformation in Form der Agglomeration/Aggregation für den Verbleib der NPs von Bedeutung, da es durch Veränderung der Partikelgröße zur Sedimentation dispergierter Nanomaterialien kommen kann. Aufgrund der in der Umwelt vorhandenen natürlichen Kolloide überwiegt bei realistischen Umweltkonzentration von NPs die Heteroagglomeration gegenüber der Homoagglomeration. Die Wechselwirkungen mit natürlichen Kolloiden wie organischer Materie, extrazellulären polymeren Substanzen, aber auch Tonmineralen und wasserhaltigen Eisenoxiden (Ferrihydrit) beeinflussen die kolloidale Stabilität der freigesetzten Nanomaterialien. Insgesamt zeigen NPs infolge der Agglomeration eine geringere Reaktivität und Bioverfügbarkeit, da sie im Vergleich zu kleineren Partikeln ein niedrigeres Oberflächen-Volumen Verhältnis und damit weniger zugängliche aktive Stellen für Oberflächenreaktionen aufweisen. So reduziert z.B. die Agglomeration von TiO₂-NPs direkt, aber auch indirekt durch Sedimentation die Akkumulation und Toxizität in den Zellen der Mikroalge Isochrysis galbana (Hu et al., 2018). Darüber hinaus verringert die Gegenwart von Mineralien wie Montmorillonit (Tonmineral) die Bioverfügbarkeit von CuO-NPs durch Agglomeration und schützt somit beispielsweise die Entwicklung von Zebrafischembryonen (Kansara, Paruthi, Misra, Karakoti, & Kumar, 2019). Im Vergleich dazu kann der partielle oder vollständige Ersatz der bestehenden Oberflächenbeschichtung durch NOM - abhängig von ihren intrinsischen Eigenschaften und der Umweltbedingungen - nicht nur zur Agglomeration, sondern auch zur Stabilisierung beitragen (Yin et al., 2015).

Zu den chemischen Transformationen von Nanomaterialien in der Umwelt gehören Adsorption, Auflösung, Komplexierung, Redoxreaktion, photochemisch induzierte Reaktion sowie der biologische Abbau der Beschichtung oder kohlenstoffbasierter NPs (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020). Bei Redoxreaktionen, die in natürlicher Umgebung ablaufen, führt die Oxidation bzw. Reduktion zweier chemischer Komponenten und der damit verbundene Elektronenaustausch zu Veränderungen im Nanomaterial. So bewirkt beispielsweise die Aufnahme von neutralen oder negativ geladenen CeO₂-NPs in das Gewebe des Fadenwurms Caenorhabditis elegans eine Änderung der Oxidationsstufe von Ce⁴⁺ zu Ce³⁺ (Collin, Oostveen, Tsyusko, & Unrine, 2014). Die Reduktion von Cer wirkt toxisch in C. elegans, da diese zu oxidativem Stress führt (H. Zhang et al., 2011). Unter den chemischen Transformationen von NPs ist jedoch deren Auflösung und die damit verbundene Freisetzung von Ionen einer der wichtigsten Mechanismen für das ökologische Schicksal, den Verbleib und die Wirkung von Nanomaterialien (Skjolding et al., 2016). Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit vieler Ionen von Metall- und Metalloxid-NPs können sie zusätzlich zu den NPs mit lebenden Organismen in Wechselwirkung treten und diese negativ beeinflussen (He, Fu, Aker, & Hwang, 2018). Metalloxide wie CuO, FenOm oder ZnO sind als gut löslich eingestuft, lösen sich aber in Abhängigkeit ihrer intrinsischen Eigenschaften (chemische Komposition, Größe, Oberfläche, Oberflächenchemie, Morphologie) und der Umweltparameter (Ionenstärke, pH-Wert, Redoxreaktionen, Temperatur, Vorhandensein von Biomolekülen) verschieden gut (Amde et al., 2017). In unterschiedlichen Wässern liegt die Auflösungsrate für CuO oder ZnO beispielsweise nur zwischen 1 – 5 % (Liu et al., 2018), aber unter bestimmten Umweltbedingungen, wie z.B. einem leicht sauren pH-Wert oder der Anwesenheit von komplexbildenden Molekülen, kann die Auflösungsrate auf 70 – 95 % ansteigen (Misra et al., 2012). Neben mechanischen und chemischen können auch biologische Prozesse die Abbau Biomolekül-Corona NPs verändern. von Der einer organischen Oberflächenbeschichtung hat Folgen für das Verhalten und das Schicksal des Nanomaterials, da er die kolloidale Stabilität beeinflusst. Für viele Anwendungen werden NPs mit Polymeren beschichtet, um die gewünschten Eigenschaften wie z.B. Stabilisierung zu erreichen (Pourhashem et al., 2020). In der Umwelt existierende mikrobielle Abbauprozesse können die biologische Abbaubarkeit von auf NP-Oberflächen adsorbierten Polymeren aber erleichtern (Peixoto, Silva, & Krüger, 2017). Oberflächenbeschichtungen von Nanomaterialien aus Polyethylenoxid können z.B. von Bakterien abgebaut werden (Kirschling et al., 2011). Ohne eine stabilisierende Beschichtung beeinflussen physikalische und chemische Transformationsprozesse das Verhalten sowie den Verbleib der NPs verstärkt - es kommt zur Agglomeration und Sedimentation. Die in der Umwelt vorhandene NOM kann jedoch durch Wechselwirkung mit der Oberflächenbeschichtung die Bioverfügbarkeit des organischen Materials reduzieren (Yu, Liu, Yin, & Shen, 2018). Detaillierte Informationen über das biologische Abbaupotential auf Nanomaterialien adsorbierter Makromoleküle und die Rolle von NOM darauf liegen allerdings kaum vor (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020).
1.3.3 Herausforderungen der Charakterisierung von Biomolekül-Coronas

Mit der Anzahl der möglichen Anwendungen der verschiedenen Nanomaterialien nimmt auch die potenzielle Umweltbelastung zu. Das Verhalten von NPs wird dabei durch ihre Wechselwirkungen mit der Umgebung geprägt. Physikochemische Parameter wie pH-Wert, Ionenstärke oder das Vorhandensein von NOM beeinflussen die Transformationen der NPs. Infolgedessen hat die Bildung einer Biomolekül-Corona durch Interaktion mit NOM einen großen Einfluss auf das NP-Verhalten. Die variable Zusammensetzung von NOM stellt eine der wesentlichen Schwierigkeiten bei der Charakterisierung von Biomolekül-Coronas dar. Viele Untersuchungen über die Auswirkungen der NOM-Adsorption auf das Verhalten von NPs charakterisieren die gebildete Biomolekül-Corona unter anderem deshalb nicht explizit. Vielmehr werden häufig nur die sich verändernden Effekte von NPs bei Abwesenheit oder Vorhandensein von NOM betrachtet, was zu der Schlussfolgerung führt, dass es Wechselwirkungen zwischen NOM und NPs in Form einer Adsorption an der NP-Oberfläche gibt. Ebenso sind spezifische Mechanismen der Adsorption von Substanzen weitgehend unbekannt und es fehlt ein detailliertes Verständnis des Verhaltens von NOM-Verbindungen während der Adsorption an NP-Oberflächen. Die Komplexität der möglichen Wechselwirkungen von Nanomaterialien mit NOM ist ein Hauptproblem für die Bestimmung der NP-Corona und stellt daher eine große Herausforderung für die Analyse des NP-Verhaltens dar.

Im Allgemeinen ist die Konzentration von Biomolekülen in physiologischen und Umweltsystemen deutlich höher als die von NPs. Ein weiteres Problem bei der Identifizierung der Biomolekül-Corona ist deshalb die Unterscheidung zwischen oberflächenadsorbierten und in Lösung befindlichen Spezies. Diese können beispielsweise vor der Analyse durch verschiedene Verfahren separiert werden (Böhmert et al., 2020).

Eine der Schlüsselfragen von NP-Coronas stellt sich während des Transportes von Nanomaterialien durch verschiedene Kompartimente der Umwelt. Ähnlich dem in physiologischen Umgebungen bekannten "Gedächtnis" der Biomolekül-Corona, bei dem die Zusammensetzung der Oberflächenbeschichtung von NPs von der zurückgelegten Strecke abhängt, wird eine vergleichbare Reaktion mit Biomolekülen abseits von Proteinen erwartet (Lundqvist & Cedervall, 2020). Obwohl diese Frage noch nicht abschließend beantwortet werden konnte, ist klar, dass aufgrund unterschiedlicher Affinitäten zum Nanomaterial ein Austausch zwischen adsorbierten Molekülen und Molekülen in der Umgebung stattfinden kann. Diese Flexibilität in Bezug auf die umgebende Matrix erhöht die Komplexität der Charakterisierung der Biomolekül-Corona zusätzlich.

1.4 Ziel der Promotionsarbeit

Durch die Entwicklung neuer Nanomaterialien, aber auch für bereits bekannte NPs wie die Metalloxide CuO oder CeO₂, steigt die Zahl der möglichen Anwendungen. Neben Applikationen mit unbeabsichtigter Freisetzung in die Umwelt gibt es auch Anwendungen, die z.B. in der Agrarindustrie aufgrund der NP-Effekte gezielt freigesetzt werden (Paramo, Feregrino-Pérez, Guevara, Mendoza, & Esquivel, 2020). Die Anzahl der möglichen Wechselwirkungen von Nanomaterialien mit ihrer Umgebung macht die Beurteilung der möglichen Auswirkungen aber sehr komplex. Im Rahmen des Promotionskollegs "NanoCompetence in der Gesellschaft – Forschung, Vermittlung, Gestaltung" werden unterschiedliche Aspekte der Nanotechnologie bearbeitet. Dazu gehören z.B. die Betrachtung von Langzeiteffekten von CuO-NPs auf Bodenorganismen oder die Untersuchung der Biokompatibilität, der Aufnahme und des Metabolismus von CuO- und CeO₂-NPs in Gehirnzellen. Weiterhin werden auch regulatorische, politische und ethische Aspekte der Nanowissenschaften sowie der Wissenstransfer von komplexen nanospezifischen Themen untersucht.

Wie beschrieben ändert sich in Abhängigkeit von Umweltparametern wie z.B. pH-Wert, Ionenstärke oder dem Vorhandensein von NOM das Verhalten der NPs. Diese Promotionsarbeit hat daher die Ziele, das Verhalten verschiedener Metalloxid-NPs (CuO, CeO₂, SiO₂) zu untersuchen und die Konsequenzen sowie Herausforderungen zu eruieren, welche mit der Ausbildung einer Biomolekül-Corona verbunden sind. Weiterhin soll ein besseres Verständnis über die Interaktionen von Nanomaterialien mit ihrer Umgebung erlangt werden, indem die Menge oberflächenadsorbierter Biomoleküle quantifiziert wird.

Zusammen mit der Komplexität sowie Variabilität der chemischen Komposition von NOM ist die damit verbundene Menge an potenziellen Wechselwirkungen einer der Gründe für die Notwendigkeit, das Verhalten von NPs in der Umwelt genauer zu untersuchen. Für eine prospektive Risikoabschätzung von Nanomaterialien in der Umwelt nach dem Vorsorgeprinzip sind aus regulatorischer Sicht Informationen über die Exposition und Freisetzung erforderlich. Solch eine umfängliche Datengrundlage fehlt jedoch häufig im Zusammenhang mit Nanomaterialien (Giese et al., 2018). Obwohl die NP-Beschichtung einen starken Einfluss auf die kolloidalen Eigenschaften und das Umweltverhalten hat, wird die Identifizierung und quantitative Analyse der auf der NP-Oberfläche adsorbierten Moleküle oft vernachlässigt (Baalousha et al., 2018).

Das Wissen über die Art und Menge adsorbierter Substanzen kann beispielsweise dazu beitragen, dass Verhalten von NPs besser nachzuvollziehen und die Wechselwirkungen der Oberflächenbeschichtung bzw. der sich entwickelnden Biomolekül-Corona in der Umwelt zu verstehen. Um Aufschluss über mögliche Wechselwirkungen zu erhalten, ist daher die detaillierte Untersuchung der Zusammensetzung der Biomolekül-Corona hilfreich. Dabei ist der gleichzeitige Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf NPs problematisch, weil er die Komplexität der Analyse erhöht, so dass nicht immer adäquate Analysemethoden zur Verfügung stehen. Die Biomolekül-Corona verändert die Identität der NPs (Nasser, Constantinou, & Lynch, 2020) und die Kenntnis der adsorbierten Menge eines Biomoleküls kann für die Interpretation von Toxizitätsstudien (Joshi, Thiel, Jog, & Dringen, 2019) oder für die Entwicklung echter zielgruppenspezifischer NPs für Arzneimittel (Lundqvist & Cedervall, 2020) hilfreich sein.

Die in der Literatur untersuchten Wechselwirkungen zwischen NPs und NOM konzentrieren sich im Wesentlichen auf den Einfluss, auf die kolloidale Stabilität oder Toxizität von Nanomaterialien gegenüber verschiedenen Organismen. In dieser Hinsicht ist wenig bekannt über die Wechselwirkung bestimmter Fraktionen von NOM mit NPs aufgrund unterschiedlicher Parameter wie Größe, Ladung oder funktionellen Gruppen. Es fehlen aber auch Informationen darüber, inwieweit Biomoleküle, die an NP-Oberflächen gebundenen sind, durch Mikroorganismen, die z.B. in Kläranlagen vorhandenen sind, abgebaut werden können. Durch die Bestimmung der Adsorptionsisothermen der gewählten Modellsubstanzen und die Kenntnis der adsorbierten Menge des Biomoleküls können Studien über die biologische Abbaubarkeit der Biomolekül-Corona durchgeführt werden.

Nachfolgend kann diese Dissertation grob in drei Kapitel gegliedert werden: Im ersten Kapitel wird der Stand des Wissens bezüglich des Verhaltens von Nanomaterialien für verschiedene metallische (Cu, Au, Fe, Ag), metalloxidische (Al₂O₃, CeO₂, Cu_xO_y, Fe_xO_y, SiO₂, TiO₂, ZnO) und organische NPs (Kohlenstoffnanoröhren, -spulen, -drähte, Fullerene, Graphene) sowie Quantenpunkte zusammengefasst (Markiewicz et al., 2018). Dabei wird herausgearbeitet, welche Auswirkungen sich ändernde Umweltbedingungen auf den Verbleib und das Verhalten - einschließlich der kolloidalen Stabilität, Reaktivität und Toxizität - des breiten Spektrums umweltrelevanter Nanomaterialien haben. Außerdem wird diskutiert, inwiefern NPs umweltverträglicher gestaltet werden können (grünes Design). In dem zweiten Kapitel wird am Beispiel von mit Dimercaptobernsteinsäure (DMSA) beschichteten Eisenoxid-NPs eine Methode zur quantitativen Untersuchung der Biomolekül-Corona dargestellt (Bemowsky et al., 2019). Im dritten Abschnitt wird der Einfluss von NOM auf drei Metalloxid-NPs (CuO, CeO₂, SiO₂) untersucht. Zu diesem Zweck wurden angesichts der Komplexität der Zusammensetzung von NOM-Extrakten aus der Umwelt zusätzlich verschiedene Modellsubstanzen ausgewählt, die aufgrund ihrer chemischen Struktur die potenziellen

Wechselwirkungen von NOM teilweise repräsentieren. Zunächst erfolgte die Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften wie Größe und Zeta-Potential der genannten Metalloxid-NPs in Gegenwart der Biomoleküle. Das NP-Verhalten wurde sowohl in Reinstwasser untersucht, um die direkten Auswirkungen der Interaktion zwischen Biomolekül und NP zu studieren, als auch in einem mineralischen Medium, um den Effekt der Anwesenheit mehrwertiger Ionen auf die Bildung der Biomolekül-Corona zu beobachten. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Auflösung von CuO-NPs unter den gewählten Bedingungen. In Abhängigkeit unterschiedlicher Parameter wie z.B. dem pH-Wert, der Ionenstärke oder der Anwesenheit von Biomolekülen kann es zur Freisetzung von Cu²⁺-Ionen kommen. Dahingegen ist keine Auflösung der CeO₂- und SiO₂-NPs unter umweltnahen Bedingungen zu erwarten.

1.5 Quellenangaben

- Abbas, Q., Yousaf, B., Amina, Ali, M. U., Munir, M. A. M., El-Naggar, A., ... Naushad, M. (2020). Transformation pathways and fate of engineered nanoparticles (ENPs) in distinct interactive environmental compartments: A review. *Environment International*, 138, 105646.
- Abbas, Q., Yousaf, B., Ullah, H., Ali, M. U., Ok, Y. S., & Rinklebe, J. (2020). Environmental transformation and nano-toxicity of engineered nano-particles (ENPs) in aquatic and terrestrial organisms. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50, 2523–2581.
- Adisa, I. O., Pullagurala, V. L. R., Peralta-Videa, J. R., Dimkpa, C. O., Elmer, W. H., Gardea-Torresdey, J. L., & White, J. C. (2019). Recent advances in nano-enabled fertilizers and pesticides: a critical review of mechanisms of action. *Environmental Science: Nano*, 6, 2002–2030.
- Al-Kayiem, H., Lin, S., & Lukmon, A. (2013). Review on Nanomaterials for Thermal Energy Storage Technologies. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia*, 3, 60–71.
- Allhoff, F., Lin, P., & Moore, D. (2010). What is Nanotechnology and why does it Matter? In What Is Nanotechnology and Why Does It Matter?: From Science to Ethics. Wiley.
- Amde, M., Liu, J., Tan, Z.-Q., & Bekana, D. (2017). Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review. *Environmental Pollution*, 230, 250–267.
- Anu Mary Ealia, S., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263, 032019.
- Arvidsson, R., Hansen, S. F., & Baun, A. (2020). Influence of natural organic matter on the aquatic ecotoxicity of engineered nanoparticles: Recommendations for environmental risk assessment. *NanoImpact*, 20, 100263.
- Attard, P., Antelmi, D., & Larson, I. (2000). Comparison of the Zeta Potential with the Diffuse Layer Potential from Charge Titration. *Langmuir*, *16*, 1542–1552.
- Auvinen, H., Gagnon, V., Rousseau, D. P. L., & Du Laing, G. (2017). Fate of metallic engineered nanomaterials in constructed wetlands: prospection and future research perspectives. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *16*, 207–222.
- Baalousha, M., Afshinnia, K., & Guo, L. (2018). Natural organic matter composition determines the molecular nature of silver nanomaterial-NOM corona. *Environmental Science: Nano*, *5*, 868–881.
- Bemowsky, S., Rother, A., Willmann, W., Köser, J., Markiewicz, M., Dringen, R., & Stolte, S. (2019). Quantification and biodegradability assessment of meso-2,3dimercaptosuccinic acid adsorbed on iron oxide nanoparticles. *Nanoscale Advances*. https://doi.org/10.1039/C9NA00236G
- Beobachtungsstelle der Europäischen Union für Nanomaterialien. (2021). Datenbank. Retrieved from https://euon.echa.europa.eu/de/search-fornanomaterials?p_p_id=nanosearch_WAR_dissnanoinventoriesportlet&p_p_lifecyc

le=o&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-

1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_nanosearch_WAR_dissnanoinventoriesportl et_sessionCri

- Blanco-Covián, L., Campello-García, J. R., Blanco-López, M. C., & Miranda-Martínez, M. (2020). Synthesis, Characterization and Evaluation of the Antibiofouling Potential of Some Metal and Metal Oxide Nanoparticles. *Applied Sciences*, 10, 5864.
- Böhmert, L., Voß, L., Stock, V., Braeuning, A., Lampen, A., & Sieg, H. (2020). Isolation methods for particle protein corona complexes from protein-rich matrices. *Nanoscale Advances*, 2, 563–582.
- Briffa, S. M., Lynch, I., Hapiuk, D., & Valsami-Jones, E. (2019). Physical and chemical transformations of zirconium doped ceria nanoparticles in the presence of phosphate: Increasing realism in environmental fate and behaviour experiments. *Environmental Pollution*, 252, 974–981.
- Brill, R. H., & Cahill, N. D. (1988). A red opaque glass from Sardis and some thoughts on red opaques in general. *Journal of Glass Studies*, 30, 16–27.
- Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland. (2018). Aus dem Labor auf den Teller : Die Nutzung der Nanotechnologie im Lebensmittelsektor. Retrieved from https://www.bund.net/fileadmin/user_upload_bund/publikationen/chemie/nanot echnologie_aus_dem_labor_auf_den_teller.pdf
- Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M. S., Metreveli, G., Schaumann, G. E., ... Wagner, S. (2018). Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environmental Sciences Europe*, 30, 6.
- Cao, K., Liu, H., Li, W., Han, Q., Zhang, Z., Huang, K., ... Jiao, L. (2019). CuO Nanoplates for High-Performance Potassium-Ion Batteries. *Small*, *15*, 1901775.
- Chen, P., Wang, H., He, M., Chen, B., Yang, B., & Hu, B. (2019). Size-dependent cytotoxicity study of ZnO nanoparticles in HepG2 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *171*, 337–346.
- Chen, X., Zhu, Y., Yang, K., Zhu, L., & Lin, D. (2019). Nanoparticle TiO2 size and rutile content impact bioconcentration and biomagnification from algae to daphnia. *Environmental Pollution*, 247, 421–430.
- Clar, J. G., Platten, W. E., Baumann, E., Remsen, A., Harmon, S. M., Rodgers, K., ... Luxton, T. P. (2019). Release and transformation of ZnO nanoparticles used in outdoor surface coatings for UV protection. *Science of the Total Environment*, 670, 78–86.
- 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.
- Collin, B., Oostveen, E., Tsyusko, O. V., & Unrine, J. M. (2014). Influence of Natural Organic Matter and Surface Charge on the Toxicity and Bioaccumulation of Functionalized Ceria Nanoparticles in Caenorhabditis elegans. *Environmental Science & Technology*, 48, 1280–1289.

- de Lucas-Gil, E., Menéndez, J., Pascual, L., Fernández, J. F., & Rubio-Marcos, F. (2020). The Benefits of the ZnO/Clay Composite Formation as a Promising Antifungal Coating for Paint Applications. *Applied Sciences*, 10, 1322.
- Delgado, K., Quijada, R., Palma, R., & Palza, H. (2011). Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 50–54.
- Derjaguin, B. V, & Landau, L. (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochim: USSR*, *14*, 633–662.
- Docter, D., Westmeier, D., Markiewicz, M., Stolte, S., Knauer, S. K., & Stauber, R. H. (2015). The Nanoparticle Biomolecule Corona: Lessons learned Challange accepted. *Chemical Society Reviews*, 1–3.
- DTU Environment. (2020). The Nanodatabase.
- Du, J., Fu, L., Li, H., Xu, S., Zhou, Q., & Tang, J. (2019). The potential hazards and ecotoxicity of CuO nanoparticles: an overview. *Toxin Reviews*, *9543*, 1–13.
- Dunphy Guzman, K. A., Finnegan, M. P., & Banfield, J. F. (2006). Influence of Surface Potential on Aggregation and Transport of Titania Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 40, 7688–7693.
- Dunwell, M., Yan, Y., & Xu, B. (2018). Understanding the influence of the electrochemical double-layer on heterogeneous electrochemical reactions. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 20, 151–158.
- Einstein, A. (1956). *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*. Courier Corporation.
- El-Trass, A., ElShamy, H., El-Mehasseb, I., & El-Kemary, M. (2012). CuO nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. *Applied Surface Science*, 258, 2997–3001.
- Feynman, R. P. (1959). Plenty of Room at the Bottom. *APS Annual Meeting*.
- Giese, B., Klaessig, F., Park, B., Kaegi, R., Steinfeldt, M., Wigger, H., ... Gottschalk, F. (2018). Risks, Release and Concentrations of Engineered Nanomaterial in the Environment. *Scientific Reports*, 8, 1565.
- Grigore, M., Biscu, E., Holban, A., Gestal, M., & Grumezescu, A. (2016). Methods of Synthesis, Properties and Biomedical Applications of CuO Nanoparticles. *Pharmaceuticals*, 9, 75.
- Grillo, R., de Jesus, M. B., & Fraceto, L. F. (2018). Editorial: Environmental Impact of Nanotechnology: Analyzing the Present for Building the Future. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 169–180.
- Grillo, R., Rosa, A. H., & Fraceto, L. F. (2015). Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. *Chemosphere*, 119, 608–619.
- He, X., Fu, P., Aker, W. G., & Hwang, H.-M. (2018). Toxicity of engineered nanomaterials mediated by nano-bio-eco interactions. *Journal of Environmental Science and*

Health, Part C, 36, 21-42.

- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.-C., & Kahru, A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. *Chemosphere*, *71*, 1308–1316.
- Hsu, L. Y., & Chein, H. M. (2007). Evaluation of nanoparticle emission for TiO2 nanopowder coating materials. *Journal of Nanoparticle Research*, *9*, 157–163.
- Hu, J., Wang, J., Liu, S., Zhang, Z., Zhang, H., Cai, X., ... Liu, J. (2018). Effect of TiO 2 nanoparticle aggregation on marine microalgae Isochrysis galbana. *Journal of Environmental Sciences*, 66, 208–215.
- Husanu, E., Cappello, V., Pomelli, C. S., David, J., Gemmi, M., & Chiappe, C. (2017). Chiral ionic liquid assisted synthesis of some metal oxides. *RSC Advances*, 7, 1154–1160.
- Iijima, M., Takenouchi, S., Lenggoro, I. W., & Kamiya, H. (2011). Effect of additive ratio of mixed silane alkoxides on reactivity with TiO2 nanoparticle surface and their stability in organic solvents. *Advanced Powder Technology*, 22, 663–668.
- Janković, N. Z., & Plata, D. L. (2019). Engineered nanomaterials in the context of global element cycles. *Environmental Science: Nano*, *6*, 2697–2711.
- Jayaramudu, T., Varaprasad, K., Pyarasani, R. D., Reddy, K. K., Kumar, K. D., Akbari-Fakhrabadi, A., ... Amalraj, J. (2019). Chitosan capped copper oxide/copper nanoparticles encapsulated microbial resistant nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 499–508.
- Ji, H., Zeng, W., & Li, Y. (2019). Gas sensing mechanisms of metal oxide semiconductors: a focus review. *Nanoscale*, 11, 22664-22684.
- Joshi, A., Thiel, K., Jog, K., & Dringen, R. (2019). Uptake of Intact Copper Oxide Nanoparticles Causes Acute Toxicity in Cultured Glial Cells. *Neurochemical Research*, 44, 2156–2169.
- Kansara, K., Paruthi, A., Misra, S. K., Karakoti, A. S., & Kumar, A. (2019). Montmorillonite clay and humic acid modulate the behavior of copper oxide nanoparticles in aqueous environment and induces developmental defects in zebrafish embryo. *Environmental Pollution*, 255, 113313.
- Karakoti, A. S., Singh, S., Kumar, A., Malinska, M., Kuchibhatla, S. V. N. T., Wozniak, K.,
 ... Seal, S. (2009). PEGylated Nanoceria as Radical Scavenger with Tunable Redox Chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 14144–14145.
- Kim, W., Kim, W. K., Lee, K., Son, M. J., Kwak, M., Chang, W. S., ... Bae, K.-H. (2019). A reliable approach for assessing size-dependent effects of silica nanoparticles on cellular internalization behavior and cytotoxic mechanisms. *International Journal* of Nanomedicine, Volume 14, 7375–7387.
- Kirschling, T. L., Golas, P. L., Unrine, J. M., Matyjaszewski, K., Gregory, K. B., Lowry, G. V., & Tilton, R. D. (2011). Microbial Bioavailability of Covalently Bound Polymer Coatings on Model Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 45, 5253–5259.
- Kumar, P., Mathpal, M. C., Prakash, J., Viljoen, B. C., Roos, W. D., & Swart, H. C. (2020).

Band gap tailoring of cauliflower-shaped CuO nanostructures by Zn doping for antibacterial applications. *Journal of Alloys and Compounds*, 154968.

- Kwon, H. J., Shin, K., Soh, M., Chang, H., Kim, J., Lee, J., ... Hyeon, T. (2018). Large-Scale Synthesis and Medical Applications of Uniform-Sized Metal Oxide Nanoparticles. *Advanced Materials*, 30, 1704290.
- Laurent, S., Boutry, S., & Muller, R. N. (2018). Metal Oxide Particles and Their Prospects for Applications. In *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications* (pp. 3–42). Elsevier.
- Lee, K. M., Lai, C. W., Ngai, K. S., & Juan, J. C. (2016). Recent developments of zinc oxide based photocatalyst in water treatment technology: A review. *Water Research*, 88, 428–448.
- Liu, Z., Wang, C., Hou, J., Wang, P., Miao, L., Lv, B., ... Ci, H. (2018). Aggregation, sedimentation, and dissolution of CuO and ZnO nanoparticles in five waters. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 31240–31249.
- Louie, S. M., Tilton, R. D., & Lowry, G. V. (2016). Critical review: impacts of macromolecular coatings on critical physicochemical processes controlling environmental fate of nanomaterials. *Environ. Sci.: Nano.* https://doi.org/10.1039/C5EN00104H
- Lundqvist, M., & Cedervall, T. (2020). Three Decades of Research about the Corona Around Nanoparticles: Lessons Learned and Where to Go Now. *Small*, 2000892, 2000892.
- Maiga, D. T., Nyoni, H., Nkambule, T. T., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. M. (2020). Impact of zinc oxide nanoparticles in aqueous environments: influence of concentrations, natural organic matter and ionic strength. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 50, 680–692.
- Mallakpour, S., Dinari, M., & Azadi, E. (2015). Poly(vinyl alcohol) Chains Grafted onto the Surface of Copper Oxide Nanoparticles: Application in Synthesis and Characterization of Novel Optically Active and Thermally Stable Nanocomposites Based on Poly(amide-imide) Containing N -trimellitylimido-L-vali. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 20, 82–97.
- Markiewicz, M., Kumirska, J., Lynch, I., Matzke, M., Köser, J., Bemowsky, S., ... Stolte, S. (2018). Changing environments and biomolecule coronas: consequences and challenges for the design of environmentally acceptable engineered nanoparticles. *Green Chemistry*, 20, 4133–4168.
- Min, Y., Akbulut, M., Kristiansen, K., Golan, Y., & Israelachvili, J. (2009). The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. In *Nanoscience and Technology* (pp. 38–49). Co-Published with Macmillan Publishers Ltd, UK.
- Misra, S. K., Dybowska, A., Berhanu, D., Luoma, S. N., & Valsami-Jones, E. (2012). The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Science of the Total Environment*, 438, 225–232.
- Mitrano, D. M., Limpiteeprakan, P., Babel, S., & Nowack, B. (2016). Durability of nanoenhanced textiles through the life cycle: Releases from landfilling after washing.

Environmental Science: Nano, 3, 375-387.

- Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P., & Wuttke, S. (2019). Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced Materials*, *31*, 1901556.
- Montini, T., Melchionna, M., Monai, M., & Fornasiero, P. (2016). Fundamentals and Catalytic Applications of CeO 2 -Based Materials. *Chemical Reviews*, *11*6, 5987–6041.
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10, 12871–12934.
- Mu, L., & Sprando, R. L. (2010). Application of nanotechnology in cosmetics. *Pharmaceutical Research*, *27*, 1746–1749.
- Nasser, F., Constantinou, J., & Lynch, I. (2020). Nanomaterials in the Environment Acquire an "Eco-Corona" Impacting their Toxicity to Daphnia Magna —a Call for Updating Toxicity Testing Policies. *PROTEOMICS*, 20, 1800412.
- Nayak, R., Ali, F. A., Mishra, D. K., Ray, D., Aswal, V. K., Sahoo, S. K., & Nanda, B. (2020). Fabrication of CuO nanoparticle: An efficient catalyst utilized for sensing and degradation of phenol. *Journal of Materials Research and Technology*, *9*, 1045–11059.
- Nguyen, V. S., Rouxel, D., Hadji, R., Vincent, B., & Fort, Y. (2011). Effect of ultrasonication and dispersion stability on the cluster size of alumina nanoscale particles in aqueous solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*, 382–388.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*, 113, 823–839.
- Odzak, N., Kistler, D., Behra, R., & Sigg, L. (2014). Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. *Environmental Pollution*, 191, 132–138.
- Odzak, N., Kistler, D., Behra, R., & Sigg, L. (2015). Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles under natural freshwater conditions. *Environmental Chemistry*, *12*, 138.
- Oriekhova, O., Le Coustumer, P., & Stoll, S. (2017). Impact of biopolymer coating on the colloidal stability of manufactured CeO 2 nanoparticles in contrasting water conditions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 533, 267–274.
- Ortelli, S., Costa, A. L., Blosi, M., Brunelli, A., Badetti, E., Bonetto, A., ... Marcomini, A. (2017). Colloidal characterization of CuO nanoparticles in biological and environmental media. *Environmental Science: Nano*, *4*, 1264–1272.
- Overbeek, J. T. G., & Verwey, E. J. W. (1948). Theory of the stability of lyophobic colloids: the interaction of sol particles having an electric double layer.
- Paramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S., & Esquivel, K. (2020). Nanoparticles in Agroindustry: Applications, Toxicity, Challenges, and Trends. Nanomaterials, 10, 1654.
- Peixoto, J., Silva, L. P., & Krüger, R. H. (2017). Brazilian Cerrado soil reveals an untapped

microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. *Journal of Hazardous Materials*, 324, 634–644.

- Peng, C., Shen, C., Zheng, S., Yang, W., Hu, H., Liu, J., & Shi, J. (2017). Transformation of CuO Nanoparticles in the Aquatic Environment: Influence of pH, Electrolytes and Natural Organic Matter. *Nanomaterials*, 7, 326.
- Peng, C., Zhang, H., Fang, H., Xu, C., Huang, H., Wang, Y., ... Shi, J. (2015). Natural organic matter-induced alleviation of the phytotoxicity to rice (Oryza sativa L.) caused by copper oxide nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34, 1996–2003.
- Perez, J. M., Asati, A., Nath, S., & Kaittanis, C. (2008). Synthesis of Biocompatible Dextran-Coated Nanoceria with pH-Dependent Antioxidant Properties. *Small*, *4*, 552–556.
- Phan, H. T., & Haes, A. J. (2019). What Does Nanoparticle Stability Mean? *The Journal of Physical Chemistry C*, 123, 16495–16507.
- Philippe, A., & Schaumann, G. E. (2014). Interactions of Dissolved Organic Matter with Natural and Engineered Inorganic Colloids: A Review. *Environmental Science & Technology*, 48, 8946–8962.
- Pourhashem, S., Saba, F., Duan, J., Rashidi, A., Guan, F., Nezhad, E. G., & Hou, B. (2020). Polymer/Inorganic nanocomposite coatings with superior corrosion protection performance: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 88, 29–57.
- Prasad, G., Kentilitisca, J. Y., Ramesh, M. V., & Suresh, N. (2020). An Overview of Natural Organic Matter. *ICDSMLA 2019*, 1407–1416. Springer.
- Schubert, J., & Chanana, M. (2018). Coating Matters: Review on Colloidal Stability of Nanoparticles with Biocompatible Coatings in Biological Media, Living Cells and Organisms. *Current Medicinal Chemistry*, 25, 4553–4586.
- Skjolding, L. M., Sørensen, S. N., Hartmann, N. B., Hjorth, R., Hansen, S. F., & Baun, A. (2016). Aquatic Ecotoxicity Testing of Nanoparticles-The Quest To Disclose Nanoparticle Effects. Angewandte Chemie International Edition, 55, 15224–15239.
- Sousa, V. S., & Teixeira, M. R. (2013). Aggregation kinetics and surface charge of CuO nanoparticles: the influence of pH, ionic strength and humic acids. *Environmental Chemistry*, *10*, 313.
- Tan, H. W., An, J., Chua, C. K., & Tran, T. (2019). Metallic Nanoparticle Inks for 3D Printing of Electronics. *Advanced Electronic Materials*, 5, 1800831.
- Taniguchi, N. (1974). On the basic concept of nanotechnology. Proceeding of the ICPE.
- Theivasanthi, T., & Alagar, M. (2011). *Studies of Copper Nanoparticles Effects on Microorganisms*. Retrieved from http://arxiv.org/abs/1110.1372
- Titus, D., James Jebaseelan Samuel, E., & Roopan, S. M. (2019). Nanoparticle characterization techniques. In *Green Synthesis, Characterization and Applications* of *Nanoparticles* (pp. 303–319). Elsevier.
- Tolaymat, T., El Badawy, A., Genaidy, A., Abdelraheem, W., & Sequeira, R. (2017).

Analysis of metallic and metal oxide nanomaterial environmental emissions. *Journal of Cleaner Production*, *1*43, 401–412.

- Van Hoecke, K., De Schamphelaere, K. A. C., Van der Meeren, P., Smagghe, G., & Janssen, C. R. (2011). Aggregation and ecotoxicity of CeO₂ nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. *Environmental Pollution*, 159, 970–976.
- Vincent, M., Hartemann, P., & Engels-Deutsch, M. (2016). Antimicrobial applications of copper. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219, 585–591.
- Wahab, R., Khan, F., Ahmad, N., Alam, M., Ahmad, J., & Al-Khedhairy, A. A. (2020). Rapid sensing response for phenol with CuO nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 607, 125424.
- Wang, D., Lin, Z., Wang, T., Yao, Z., Qin, M., Zheng, S., & Lu, W. (2016). Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both? *Journal of Hazardous Materials*, 308, 328–334.
- Wang, Z., Zhang, L., Zhao, J., & Xing, B. (2016). Environmental processes and toxicity of metallic nanoparticles in aquatic systems as affected by natural organic matter. *Environmental Science: Nano*, *3*, 240–255.
- Yazdimamaghani, M., Barber, Z. B., Hadipour Moghaddam, S. P., & Ghandehari, H. (2018). Influence of Silica Nanoparticle Density and Flow Conditions on Sedimentation, Cell Uptake, and Cytotoxicity. *Molecular Pharmaceutics*, 15, 2372– 2383.
- Yin, Y., Shen, M., Tan, Z., Yu, S., Liu, J., & Jiang, G. (2015). Particle Coating-Dependent Interaction of Molecular Weight Fractionated Natural Organic Matter: Impacts on the Aggregation of Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 49, 6581–6589.
- Yu, S., Liu, J., Yin, Y., & Shen, M. (2018). Interactions between engineered nanoparticles and dissolved organic matter: A review on mechanisms and environmental effects. *Journal of Environmental Sciences*, 63, 198–217.
- Yue, L., Chen, S., Wang, S., Wang, C., Hao, X., & Cheng, Y. F. (2019). Water disinfection using Ag nanoparticle–CuO nanowire co-modified 3D copper foam nanocomposites in high flow under low voltages. *Environmental Science: Nano*, 6, 2801–2809.
- Zabrieski, Z., Morrell, E., Hortin, J., Dimkpa, C., McLean, J., Britt, D., & Anderson, A. (2015). Pesticidal activity of metal oxide nanoparticles on plant pathogenic isolates of Pythium. *Ecotoxicology (London, England)*, 24, 1305–1314.
- Zhang, H., He, X., Zhang, Z., Zhang, P., Li, Y., Ma, Y., ... Chai, Z. (2011). Nano-CeO2 Exhibits Adverse Effects at Environmental Relevant Concentrations. *Environmental Science & Technology*, *45*, 3725–3730.
- Zhang, W., Schwab, A. P., White, J. C., & Ma, X. (2018). Impact of Nanoparticle Surface Properties on the Attachment of Cerium Oxide Nanoparticles to Sand and Kaolin. *Journal of Environmental Quality*, 47, 129–138.

- Zhang, Y., Chen, Y., Westerhoff, P., & Crittenden, J. (2009). Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles. *Water Research*, *43*, 4249–4257.
- Zhao, J., Wang, Z., Dai, Y., & Xing, B. (2013). Mitigation of CuO nanoparticle-induced bacterial membrane damage by dissolved organic matter. *Water Research*, *47*, 4169–4178.

2. Experimentelle Ergebnisse / Veröffentlichungen

2.1 Review:

Changing environments and biomolecule coronas: Consequences and challenges for the design of environmentally acceptable engineered nanoparticles

Marta Markiewicz, Jolanta Kumirska, Iseult Lynch, Marianne Matzke, Jan Köser, Steve Bemowsky, Dominic Docter, Roland Stauber, Dana Westmeier, and Stefan Stolte

> Green Chem., 2018, 20, 4133-4168 DOI: 10.1039/C8GC01171K

Beitrag von Steve Bemowsky:

- Ausarbeitung/Literaturrecherche zum ersten Entwurf der Kapitel zu Metalloxiden (4.2, 6.2, 7.2, 8.2)
- Erstellen aller Abbildungen

2.2 Paper:

Quantification and biodegradability assessment of meso-2,3dimercaptosuccinic acid adsorbed on iron oxide nanoparticles

S. Bemowsky, A. Rother, W. Willmann, J. Köser, M. Markiewicz, R. Dringen and S. Stolte

Nanoscale Adv., 2019, 1, 3670-3679 DOI: 10.1039/C9NA00236G

Beitrag von Steve Bemowsky:

- Durchführen aller experimentellen Arbeiten abseits der NP Synthese
- Ausarbeitung des ersten Entwurfs vom Manuskript
- Überarbeitung des Manuskripts
- Erstellen aller Abbildungen und Tabellen

Nanoscale Advances

PAPER

Check for updates

Cite this: DOI: 10.1039/c9na00236g

Quantification and biodegradability assessment of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid adsorbed on iron oxide nanoparticles[†]

S. Bemowsky, ^[D]^a A. Rother,^a W. Willmann,^{bc} J. Köser, ^[D]^a M. Markiewicz, ^[D]^{ad} R. Dringen^{bc} and S. Stolte^{*ad}

Many interesting applications of magnetic iron oxide nanoparticles (IONPs) have recently been developed based on their magnetic properties and promising catalytic activity. Depending on their intended use, such nanoparticles (NPs) are frequently functionalized with proteins, polymers, or other organic molecules such as meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) to improve their colloidal stability or biocompatibility. Although the coating strongly affects the colloidal properties and environmental behaviour of NPs, quantitative analysis of the coating is often neglected. To address this issue, we established an ion chromatographic method for the quantitative analysis of surface-bound sulfur-containing molecules such as DMSA. The method determines the amount of sulfate generated by complete oxidation of sulfur present in the molecule. Quantification of the DMSA content of DMSA-coated IONPs showed that reproducibly approximately 38% of the DMSA used in the synthesis was adsorbed on the IONPs. Tests for the biodegradability of free and NP-bound DMSA was degraded to negligible extent, suggesting long-term environmental stability of DMSA-coated IONPs.

Received 11th April 2019 Accepted 10th August 2019 DOI: 10.1039/c9na00236g rsc.li/nanoscale-advances

1. Introduction

Magnetic iron oxide nanoparticles (IONPs) with either magnetite (Fe_3O_4) or maghemite/hematite (Fe_2O_3) as the cores have received much attention in recent decades because of their unique magnetic properties and high catalytic activities.^{1,2} They have been developed for a wide range of biomedical and environmental applications. These include biomedical imaging, cellular labelling and tracking in tumour therapy, targeted drug delivery systems,^{3,4} and soil and groundwater remediation,⁵ including wastewater treatment.^{6,7} Their use in remediation is based on their efficient removal of toxic metal ions from aqueous solutions *via* adsorption,^{7,8} after which they can be ported adsorption capacities of 17.0–19.2 mg g^{-1} for Cr(vi), 26.8 mg g^{-1} for Cu(II), and 23.6 mg g^{-1} for Ni(II) by maghemite nanoparticles (NPs).10,11 Uncoated IONPs have high surface energies because of their large surface-to-volume ratios and are therefore prone to particle agglomeration,6 and this tends to minimize surface energies. NP-specific properties such as superparamagnetism,12 reactivity, and mobility6 can consequently change. Furthermore, they are sensitive to air oxidation13 because of their high chemical activities. IONPs are therefore often coated with inorganic or organic compounds such as Au,14,15 silica,16 humic acid,17 and dextran18,19 or other polymers^{20,21} to enhance their colloidal stability and reduce the probability of magnetite IONP oxidation in aqueous media.²² A coating can also be used to endow IONPs with specific surface functionalities for cell labelling and targeting,3 or ion binding to increase metal ion adsorption for water treatment processes.6 In particular, NPS functionalized with meso-2.3dimercaptosuccinic acid (DMSA, Fig. 1A) have potential applications in drug delivery systems,23,24 as heating agents for magnetic hyperthermia²⁵⁻²⁷ and remediation of heavy-metalcontaminated environments.28,29

removed by applying external magnetic fields.9 Hu et al. re-

DMSA contains two sulfhydryl groups (–SH),^{30,31} and oxidation of DMSA molecules forms a cage *via* disulfide crosslinking around the IONPs and modifies the surface charges of the particles because of an excess of carboxylic groups (Fig. 1B).³²

View Article Online

70

[&]quot;UFT – Centre for Environmental Research and Sustainable Technology, Department Sustainable Chemistry, University of Bremen, Leobener Straße 6, D-28359 Bremen, Germany

^bCBIB – Centre for Biomolecular Interactions Bremen, Neurobiochemistry, Faculty 2 (Biology/Chemistry), University of Bremen, Leobener Straße 5/NW2, D-28359 Bremen, Germany

^{&#}x27;UFT - Centre for Environmental Research and Sustainable Technology, Department Neurobiochemistry, University of Bremen, Leobener Straße 6, D-28359 Bremen, Germany

^dTechnische Universität Dresden, Faculty of Environmental Sciences, Department of Hydrosciences, Institute of Water Chemistry, Bergstraße 66, 01069 Dresden, Germany. E-mail: stefan.stolte@tu-dresden.de

[†] Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9na00236g

View Article Online Paper





Because DMSA as a thiol-containing compound is a good chelator of metals such as arsenic, cadmium, lead, and mercury^{31,33,34} and is categorized as not harmful to humans or other mammals, it is approved for clinical chelation therapy.³⁵⁻³⁷ Similarly, studies of DMSA-coated IONPs (DIONPs) have shown weak or no genotoxicity and cytotoxicity towards mammalian cells such as cultured brain astrocytes38 and human dermal fibroblasts³⁹ at the highest tested concentrations, namely 0.22 and 0.10 g Fe L^{-1} (4000 and 1791 μ M iron). However, uncoated IONPs affected brain nerve cells of mice via induction of oxidative stress and morphological damage on administration of 130 μg of IONPs.40 Few studies have evaluated the environmental effects of DIONPs and uncoated IONPs.41-43 The consequences of exposing aquatic organisms such as duckweed (Lemna minor), green algae (Raphidocelis subcapitata), or water fleas (Daphnia magna) to such NPs have recently been investigated.⁴¹ The determined EC₅₀ values (72 h) for green algae range from 0.05 mg Fe L^{-1} for uncoated IONPs to 0.13 mg Fe L^{-1} for DIONPs (0.86–2.27 μ M Fe). DIONPs showed no effect and uncoated IONPs showed moderate toxic effects on Daphnia (EC₅₀ 21–66 mg Fe L⁻¹ and 374–1181 μ M Fe, respectively) after 72 h, but ingestion and accumulation of coated and uncoated IONPs was observed in the gastrointestinal tract of daphnids. Neither type of IONPs (with or without DMSA coating) affected Lemna; this was because of particle agglomeration in the medium. The DMSA coating apparently mitigates the ecotoxicity of IONPs and therefore environmental processes which cause degradation of the coating and release of IONPs will essentially increase the environmental hazard posed by these NPs. In the aforementioned studies, comprehensive particle characterization was performed by atomic absorption spectroscopy, atomic force spectroscopy, dynamic and electrophoretic light scattering (DLS/ELS), flow field-flow fractionation, transmission electron microscopy, and other techniques.41,44-46 However, information on the amount of DMSA adsorbed on NP surfaces is not yet available. In particular, the ratio of bound/ free DMSA and its changes over time (e.g. as a result of biodegradation) are important in environmental hazard assessment because the stability, biological effects, and transport behaviours of DIONPs in any environmental medium will be directly affected.

The standard electrochemical procedures such as capillary or gel electrophoresis which are used for the detection and separation of NPs by size and shape47 cannot be used to determine and quantify surface-adsorbed biomolecule concentrations. In electrochemical analysis, NPs in the sample can cause problems such as adsorption on the electrode surface47 or can affect the signal sensitivity of UV/Vis detectors,48 which are often used in electrochemical methods. Known methods of detection for DMSA include high-performance liquid chromatography (HPLC)^{30,34,49} paired with fluorescence detection or a gas chromatographic system coupled with a flame ionization detector (GC-FID).50 DMSA tends to oligomerize in atmospheric oxygen because of formation of disulfide bridges. Quantification of DMSA usually requires conversion of oligomers to monomeric DMSA via chemical reactions, e.g. with dithiothreitol, or electrochemically. Limits of quantification for GC-FID and HPLC are 150 µmol L⁻¹ and 0.14-0.55 µmol L⁻¹ (depending on physiological matrices) respectively. These methods are not suitable for NPs or solutions with high metal ion concentrations, because of lack of volatility, the possibility of capillary blocking, or interference with detection. To avoid DMSA oligomerization in analytical samples, we suggest complete oxidation of the thiol groups of DMSA to sulfate ions in the presence of aqua regia at high temperatures. The sulfate concentration can be assessed quantitatively by ion chromatography (IC). In this study, this analytical approach was validated and used to determine the ratio of bound/free DMSA.

Chemical transformations of nanomaterials in the environment include adsorption of macromolecules, biodegradation of coatings, dissolution, oxidation, reduction, and sulfidation, many of which have been studied in detail, but less attention has been paid to transformations of surface coatings.^{51,52} In particular, the effects of aqueous photochemical reactions, biodegradation, and similar processes on adsorbed macromolecules lead to corona changes and strongly affect surface

Paper

interactions and reactivity, which in turn affect the transport, fate, and toxicity of NPs.^{52–54} It has been shown that poly(ethylene oxide) which was covalently linked to NPs was biologically degraded by bacteria enriched from urban river water.⁵⁵ The microbial degradation of some macromolecules can occur extracellularly by secreted enzymes,^{56,57} but the degradation of water-soluble molecules by bacteria often requires uptake into the cell.^{36,58} Intracellular degradation of the coating of Au NPs by enzymes in rats⁵⁹ and embryonic mouse fibroblasts⁶⁰ was detected for proteins (bovine serum albumin) and poly(isobutylene-*alt*-maleic anhydride) with a dodecyl side chain, respectively. Further examples of transformations of adsorbed biomolecules include photochemical degradation of the citrate coating of CeO₂ NPs⁶¹ or the thiolated poly(ethylene glycol) corona of Au NPs.⁵⁴

For coated NPs, in most cases it is not possible to comment on the amount of adsorbed material. Because the concentrations are unknown, assumptions have to be made for interpretation of the experimental data, as described by Zhang *et al.*⁴¹ After the release of DIONPs into the environment, microbial degradation of the surface coating can lead to a change in particle behaviour. It is therefore important to determine how much substance is adsorbed on the NP surfaces. In this study, we established and validated a quantitative method for the determination of NP-bound DMSA and then examined whether or not it was biodegradable. To determine the amount of DMSA coated on DIONP, the NPs were digested and the thiol groups of the surface-adsorbed DMSA were oxidized to sulfate, which was then quantified by IC.

2. Materials and methods

2.1 Materials

All chemicals were purchased in the highest purity available from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), or VWR (Langenfeld, Germany). This includes DMSA (\geq 97.5%), FeCl₃ (\geq 99.99%), HCl (\geq 37%, puriss p.a.), HNO₃ (\geq 65%, puriss p.a.), H₂SO₄ (95–97%, puriss p.a.), K₂SO₄ (\geq 99%), KI (\geq 99.5%, puriss p.a.), Na₂CO₃ (99.95–100.05%), and NaHCO₃ (\geq 99.7%). EPA-certified (United States Environmental Protection Agency) thread vials (20 mL, clear glass, ND24) from neo-Lab (Heidelberg, Germany) were used for colloidal stability testing. Twenty-four-well microtitre plates were obtained from Sarstedt (Nümbrecht, Germany). MilliQ water (resistivity 18.2 M Ω cm) was produced with a Millipore MilliQ Plus water purification system (Burlington, MA, USA).

2.2 Procedures for synthesis of DIONPs

2.2.1 IONP synthesis. Magnetic IONPs (γ -Fe₂O₃) were synthesized according to a previously described method.^{62,63} A solution (380 mL) containing FeCl₃·6H₂O (8.89 g, 32.9 mM), FeCl₂·4H₂O (3.28 g, 16.5 mM), and 37% HCl (1 mL) was thoroughly mixed. Slow addition of 25% (w/v) NH₄OH solution (25 mL) induced precipitation under vigorous stirring. The resulting black magnetic precipitate was collected, isolated with a permanent magnet (NdFeB-magnet, Webcraft, Uster, Switzerland), and washed twice with deionized water (100 mL). The precipitate was heated with 2 M HNO₃ (40 mL) until the colour of the mixture changed to dark brown. The product was magnetically collected, separated from the supernatant, and then heated with 0.34 M Fe(NO₃)₃·9H₂O (60 mL) at 90 °C for 30 min according to Bee *et al.*⁴² The IONPs were magnetically separated from the supernatant, dispersed in deionized water to a final volume of 50 mL, and then filtered sterile through a 0.2 μ m filter (syringe filter, cellulose acetate membrane of pore size 0.2 μ m, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

View Article Online

Nanoscale Advances

2.2.2 DIONP synthesis. The synthesized IONPs were coated with DMSA after determination of the iron content (see Section 2.2.3). DMSA (0.13 g, 0.7 mmol) was dissolved at 50 °C in doubledistilled water (150 mL) under stirring. This solution was added to 40 mM iron (100 mL) in the form of IONPs under vigorous stirring resulting in a final concentration of DMSA equal to 2.85 mmol L^{-1} ($c_{initial}$). After mixing for 30 min at room temperature, the particulate content was separated by centrifugation at 800 rcf for 5 min. Due to the DMSA coating of the IONP, the solution becomes acidic, which is why the NPs agglomerate. Therefore, it is easier to separate them via centrifugation and to remove the supernatant, whereby almost no excess DMSA from synthesis should be present. The particles were resuspended in double-distilled water (80 mL) and the pH of the dispersion was adjusted to 10 with NaOH and then to 7.4 with HCl. By adjusting the pH to 10, the NP surfaces are charged more negatively, which leads to increased repulsion and better dispersion of the NPs. After adjusting to pH 7, the DIONPs were stable for several months. The resulting dispersion was filtered through a 0.2 µm filter. The final iron concentration of the DIONP dispersion was 2.31 ± 0.25 g Fe L⁻¹ (41.31 ± 4.45 mM Fe).

2.2.3 Determination of iron content. The iron content was determined by a modified version of a previously reported colourimetric ferrozine-based method.63 The synthesized IONP dispersion (10 µL) was mixed with 37% HCl (40 µL), followed by dilution with 50 mM NaOH (950 μ L). The solution (100 μ L) was then mixed with 10 mM HCl to a volume of 200 µL. The sample was mixed with freshly prepared iron-releasing reagent (100 uL; 1:1 mixture of 1.4 M HCl and 4.5% w/v KMnO4 in doubledistilled water) and then fresh iron-detection reagent (30 µL; 2.5 M ammonium acetate, 1 M ascorbate, 6.5 mM ferrozine, and 6.5 mM neocuproine) was added.64 After reaction for 30 min at room temperature, samples (280 µL) were placed in the wells of a microtitre plate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and the absorbance of the iron-ferrozine complex at 540 nm was recorded with a Sunrise RC microtitre plate photometer (Tecan, Crailsheim, Germany). The iron content was determined by comparing the absorbance of the sample to those of defined iron standard solutions (FeCl₃ in 10 mM HCl).

2.3 Method validation

To investigate the amount of DMSA adsorbed on NPs, the NPs were digested, and the organic coating was oxidized to enable determination of the thiol groups of DMSA as sulfate. An IC method was established with K_2SO_4 as the standard for the concentration range 5–95 μ M. To calculate the amount of DMSA

Nanoscale Advances

bound to the particles two types of analytical samples were prepared (for details please see Fig. S1 in the ESI†): 'sample A' after coating, centrifugation, washing and filtration through 0.2 µm syringe filter contained NP-bound DMSA and free DMSA that coprecipitated with the pellet ($m_{\rm pellet} = m_{\rm free} + m_{\rm bound}$); 'sample B' after additional step of ultrafiltration contained only free DMSA that was present in the pellet ($m_{\rm free}$). The ultrafiltration was performed using Vivaspin 500 centrifugal filters (Sartorius, Göttingen, Germany) with a polyethersulfone membrane (3000 molecular-weight cut-off). The filter was rinsed four times with deionized water (500 µL) at 14 100 rcf for 30 min prior to centrifuging the NPs to avoid contamination with interfering ions in the IC analysis. The amount of bound DMSA was then calculated as: $m_{\rm bound} = m_{\rm pellet} - m_{\rm free}$.

Release of iron ions during digestion of the DIONP samples could affect the analysis, therefore additional iron chloride (10 μ L of 50 mM FeCl₃, 0.125 mM in the sample) was added to the calibration standards prior to their treatment to investigate its influence on the analysis.

2.3.1 Quantification of DIONP bound DMSA. Four independent DIONP batches (A–D) were investigated, which were synthesized and coated using an identical protocol as mentioned in 2.2.2. The DIONP stock solutions of about 40 mM Fe were diluted by a factor of 40 to approximately 1 mM Fe. These diluted suspensions were further used for a concentration series (6 concentrations between 0.10–0.52 mM Fe in 3 replicates each) to determine the amount of DMSA adsorbed to DIONPs. After initially washing the pellet of coated DIONPs still contained some amount of free DMSA. To account for that, we have also measured this amount by removing coated NPs through ultrafiltration and putting the permeate through digestion protocol.

Both types of samples (A and B) were digested with aqua regia at high temperature to oxidize DMSA to water-soluble sulfate and to dissolve the NPs (in sample A). An aqueous sample (100 μL) consisting of DIONPs (sample A) or free DMSA (sample B) was mixed with 37% HCl (80 μ L) and \leq 69% HNO₃ (20 μ L), followed by addition of 50 mM FeCl₃ (10 µL). The mixture was homogenized for 30 s with a vortex mixer (Heidolph, Schwabach, Germany) and then centrifuged in a Minispin Plus centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) for 30 s at 6700 rcf. The organic material in the sample was oxidized overnight at 95 °C in a thermoblock (Eppendorf, Thermomixer compact). The dried sample was then dissolved in the IC eluent (1 mL; mixture of Na₂CO₃ and NaHCO₃). To avoid transfer of residual particles in sample A into the IC system, 700 μ L of this sample were transferred to a new cup and centrifuged once more for 30 min at 14 100 rcf. The 500 μL of both samples were vortexed and centrifuged again at 14 100 rcf for 30 min.

Finally, the 500 μ L of each sample were diluted with eluent (1480 μ L) and an internal anion standard (20 μ L; 5 mM KI), homogenized for 20 s with a vortex, and then analysed *via* IC. For samples without FeCl₃ the last centrifugation step was omitted and 500 μ L of the sample were directly diluted with eluent and internal standard. For a flowchart of sample preparation please see Fig. S1 in ESI file.†

View Article Online

Paper

2.3.2 Dynamic and electrophoretic light scattering (DLS/ ELS). For testing the biodegradability, the coated NPs must be brought into suspension. In this context the colloidal stability of the DIONPs was tested for a period of 28 days; this corresponds to the duration of the performed biodegradation test. Analysis was performed with a Delsa™ Nano C particle analyser (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) with either a cuvette cell for measurement of hydrodynamic diameters or a flow cell for zeta potential measurements. The device featured a diode laser (30 mW, $\lambda_0 = 658$ nm), with scattered light detection by a photomultiplier tube and analysis with a digital correlator. DLS experiments were performed at a backscattering angle of 165°. After shaking the samples manually for 10 s to ensure sampling of homogenously distributed particles, a sample (2.5 mL) was placed in a MilliQ-water-cleaned polystyrene cuvette (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) of dimensions $10 \times 10 \times 45 \text{ mm}^3$. This sample was then thermostatted at 25 °C for 5 min in the analytical device before 10 repetitions with 120 s measurement times. The correlation function g^2 was evaluated on the basis of the properties of pure water with a refractive index n (658 nm, 25 °C) = 1.3328 and a viscosity η (25 $^{\circ}\mathrm{C})$ = 0.8898 cP with Beckman Coulter Software Delsa™ Nano (version 3.730/2.30). For data interpretation, the cumulants method was used to calculate the z-average of the hydrodynamic diameter d and the polydispersity index.

The zeta potentials of the samples were determined by ELS under the same conditions as those used for DLS, except the scattering angle was changed to 15° . A sample (5 mL) was directly injected into a flow cell and equilibrated, after which three repetitions with a measurement time of 300 s were performed. Data were evaluated by the Smoluchowski equation from the refractive index, viscosity, and dielectric constant ($\varepsilon = 78.3$) of pure water with Beckman Coulter software (see DLS section). All measurements were recorded as three independent replicates for each sample.

2.3.3 Ion chromatography (IC). IC was used to indirectly quantify DMSA by determining the amount of sulfate formed by complete oxidation of the DMSA thiol groups. All chromatographic analyses were performed using a Metrohm Model 881 Compact IC system (Metrohm, Herisau, Switzerland) with a suppressor module and a column oven at 30 °C equipped with a Metrosep A Supp 5 column (150 \times 170 mm) in combination with a Metrosep A Supp 4/6 Guard and a Metrosep RP 2 Guard column, an online degasser, and a 20 µL injection loop. Anions were detected using a conductivity detector (maintained at 30 °C) with an eluent mixture consisting of 3.2 mM Na₂CO₃ and 1.0 mM NaHCO₃ at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹. Diluted H₂SO₄ was used for regeneration of the IC suppressor module (cation exchanger). Prior to preparation of the eluent mixture and regenerating solution, the deionized water was filtered through a 0.45 µm filter and degassed. All data were recorded with Metrohm software MagICNet (version 2.4 compact) and evaluated based on the peak area and signal of the iodide internal standard, 50 µM KI, which was used to correct for peak area variations over time.

Calibration was performed with K_2SO_4 over the concentration range 5–95 μ M in concentration steps of 10 μ M. Five

Open Access Article. Published on 12 August 2019. Downloaded on 8/18/2019 5:21:10 PM.

Paper

independent repetitions were performed for each sample. The detection limit was determined with the student *t*-test for a confidence interval of 95% and the quantification limit corresponded to three times the detection limit.

2.4 Biodegradation test

A manometric respirometry method, namely OECD 301 F (Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD, 2006) was used to measure the pressure decrease in test vessels caused by consumption of oxygen used by bacteria to degrade the sample.⁶⁵ The test mixture (final volume 432 mL) contained a mineral medium (8.5 mg L^{-1} KH₂PO₄, 21.75 mg L^{-1} K_2HPO_4 , 22.13 mg L⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O, 1.7 mg L⁻¹ NH₄Cl, 27.5 mg L^{-1} CaCl₂, 22.5 mg L^{-1} MgSO₄ · 7H₂O, and 0.25 mg L^{-1} FeCl₃), microbial inoculum, nitrification inhibitor (allylthiourea, 5 mg L^{-1}), and 20 mg L^{-1} of the test substance. The microbial inoculum was derived from activated sludge from an aeration tank at the municipal wastewater treatment plant in Delmenhorst, Germany, with an average dry sludge content of 5 g L⁻¹. Prior to the experiments, flocs were allowed to settle and then discarded. The remaining supernatant was aerated for 7 days and used as the inoculum after addition of a medium containing 10⁴ to 10⁵ colony-forming units per millilitre on average, determined by a Paddle test (Hach Lange, Düsseldorf, Germany). The test substances were weighed and combined with 1 L of inoculum in volumetric flasks. Two samples of volume 432 mL were taken from each flask and placed in amber-glass test bottles (OxiTop, WTW). Because of the limited sensitivity of the technique (lowest measurable range 40 mg O2 L^{-1}) the concentrations of the test substance were significantly higher than expected environmental concentrations. Each sample test was run in duplicate, with blank samples to account for endogenous cellular breathing, and positive controls containing benzoic acid in the same concentration as that of the sample substance (20 mg L^{-1}). During the test, the temperature was maintained at 20 °C. The decrease in pressure inside the bottle caused by oxygen consumption was measured, recorded, and converted to the biochemical oxygen demand (BOD). Finally, the percentage degradation was calculated from the BOD value and theoretical oxygen demand of DMSA, according to the guidelines.65

3. Results and discussion

3.1 Calibration of sulfate and effect of digestion process

The data shown in Fig. 2 curve A represent mean values of K_2SO_4 standards (5–95 μ M) with standard deviations (n = 5). This calibration curve showed that the sulfate limit of detection (LOD) was 0.32 mg L⁻¹ (1.83 μ M) and the limit of quantification (LOQ) was 0.96 mg L⁻¹ (5.49 μ M). An internal anion standard, 50 μ M KI, was used to correct for peak area variations (in the range 2.5–6.3%) over time from the quotient of the sulfate and iodine peak areas in the chromatograms. This ratio was used to obtain a calibration curve; a linearity check indicated second-order regression ($R^2 = 0.9998$).



Fig. 2 (Curve A) Calibration (n = 5) of K₂SO₄ over the concentration range. (Curve B) Calibration and determination of recovery rates of K₂SO₄ subjected to the same digestion procedure as the samples. Data represent mean values \pm SD (n = 3).

The sulfate recovery rates in the oxidation protocol were investigated for K_2SO_4 concentrations of 5, 25, 45, 65, 85, and 95 μ M (Fig. 2 curve B). These samples showed average sulfate recovery rates of 93.7 \pm 8.0% over three independent repetitions. A comparison of the two calibration curves showed that the area ratio after sample oxidation decreased by an average of 10.28 \pm 1.21% over the concentration range, resulting in a higher LOD and LOQ of 0.57 mg L⁻¹ (3.29 μ M) and 1.72 mg L⁻¹ (9.87 μ M), respectively. A possible cause of the reduced signal and lower sensitivity could be loss of sulfate during sample preparation and treatment.

A direct comparison of the calibration curves (see Fig. S2 in the ESI†) obtained with and without addition of iron ions showed no significant difference (p = 0.4613 > 0.05). This indicates that the presence of iron ions did not affect the detection of sulfate and the added FeCl₃ was not measurably contaminated with sulfate during production. The recovery rate was 98.5 ± 7.2%. However, the LOD and LOQ for the calibration curve with added FeCl₃ decreased by approximately 44% to 0.14 mg L⁻¹ (0.81 µM) and 0.42 mg L⁻¹ (2.43 µM), respectively. This enables better quantification of sulfate from the DMSAcontaining samples. It seems that the presence of iron ions affects the sensitivity by reducing the measurement variability, resulting in lower LOD and LOQ values.

3.2 Quantification of DMSA

After successfully verifying the reproducibility of the sulfate detection method, the method was used to determine known DMSA concentrations of 0.1, 0.5, 0.9, 1.3, 1.7, and 1.9 mM. DMSA contains two thiol groups, therefore two equivalents of sulfate are released by oxidation of one equivalent DMSA. If this fact and dilution through sample preparation are taken into account, the theoretical sulfate concentrations correspond to those of the calibration samples (5, 25, 45, 65, 85, and 95 μ M). As shown in Fig. 3, an acceptable mean recovery rate for the digested DMSA samples, namely 80.6 \pm 17.4% over three independent repetitions, was achieved. The sequence of steps needed for the sample preparation (see also ESI Fig. S1[†]) is one

View Article Online Nanoscale Advances

Nanoscale Advances



Fig. 3 Influence of digestion process on sulfate recovery of DMSA in comparison to the calibration and determination of recovery rates of K_2SO_4 after the digestion procedure. Data represent mean values \pm SD (n = 3).

possible reason for the variations in the DMSA recovery rate. Another reason might have been an incomplete digestion of DMSA, therefore not all of the substance would be present as measurable sulfate. This is also true for surface adsorbed DMSA since a basic medium is used during the coating process and thiols tend to form disulfide bonds under these conditions which may affect the recovery rate of DMSA by incomplete oxidation to sulfate. Furthermore, the potential maximum recovery may be lower because the purity of DMSA is given as \geq 97.5%, and on drying a maximum loss of 1% water can occur.

3.2.1 Effect of dissolved iron on digestion. Treatment of IONPs with *aqua regia* results in complete release of iron ions from the NP core. To investigate the potential effect of iron ions on the DMSA quantification process, FeCl₃ was added to samples of different DMSA concentrations. Fig. 4 shows that the addition of iron ions increased the sulfate recovery rate to about 100% (104.5 \pm 10.3%) for selected concentrations in the range 5–95 μ M.

Metal ions such as Fe³⁺ can be weakly bound by DMSA because of its chelating properties.^{31,66,67} This might reduce DMSA oligomerization, which enables more complete oxidation of sulfur and therefore higher sulfate recovery rates. Iron ions



Fig. 4 Influence of FeCl₃ addition (0.125 mM in sample) on the DMSA digestion and recovery rate of sulfate. Data represent mean values \pm SD (n = 3).

Nanoscale Adv.

View Article Online

Paper

could also act as redox catalysts and have a positive effect on the oxidation of sulfur to sulfate.^{68,69} As a result, the concentrations of DMSA will be determined more precisely, with a higher recovery.

3.2.2 Determination of the amount of DMSA in DIONP coating. The IC analysis (Table 1) showed that average 1.08 mmol DMSA was bound per litre of suspension containing on average 41.31 mmol iron (the molar ratio of DMSA to iron equal to 0.027). It also means that approximately 38% of DMSA used in the synthesis was bound onto the NPs. The reproducibility of NP synthesis was estimated by comparing the quantities of adsorbed DMSA coatings. The ratios of bound DMSA to total iron content for DIONPs in the four analysed batches (Table 1) did not differ significantly (p > 0.05). The relative DMSA coating quantities therefore indicate that the individual synthesis and coating processes gave highly reproducible coatings. Furthermore, the total surface area of the IONP can be estimated based on the particle diameter of 5-10 nm determined by TEM⁷⁰ and the assumption of a spherical shape. Depending on the size distribution, an area of 116–232 $m^2 g^{-1}$ is estimated for the IONP, which corresponds to an adsorption of 0.27–0.53 mg DMSA m⁻². It can be assumed that the IONP surface is almost completely saturated with DMSA. Higher concentrations of DMSA in synthesis provide comparable adsorbed amounts. This is important because the NP coating has a decisive effect on the environmental fate of the NPs and differences in the coating can lead to severe changes in NP behaviour.71

For the biodegradation tests, a known concentration of the biomolecule in the test system is required. Knowledge of the quantities of bound and free DMSA in the DIONP samples enabled us to investigate the biodegradability of the produced material.

In this regard, the IC analysis showed that samples used for biodegradation testing contained not only bound DMSA but also some dissolved DMSA oligomers amounting to approximately 20% of the bound amount (Table 1).

3.3 Characterization of DIONP

DLS measurements showed that after incubation for 28 days the DIONP were colloidally stable in water. The hydrodynamic diameter (d) was 39.1 \pm 10.5 nm in diluted dispersions and showed no significant change over the time of the incubation period. In the biodegradation medium OECD 301 F the DIONP were not colloidally stable and agglomerated. The hydrodynamic diameter in this medium showed a slow and steady increase during the incubation period of 28 days from 41.3 \pm 10.7 nm in the beginning (0 days) to the end (28 days) with 946 \pm 252 nm (Tables 2 and 3). According to the Derjaguin–Landau– Verwey-Overbeek theory, the ionic strength strongly affects the surface charge and colloidal stability of NP dispersions.72 As the ionic strength of the OECD 301 F medium (21.5 mM) is much higher than that of MilliQ water, particle repulsion is weaker and the probability of contact between particles rises. Additionally, the medium contains Ca2+ and Mg2+ ions, which are

Paper

View Article Online

Nanoscale Advances

Table 1 Total, bound, and free DMSA concentrations of four separate DIONP batches as well as the ratio of bound DMSA to the concentration of iron. Data represent mean values \pm SD (n = 18, 3 repetitions with 6 concentrations each)

Batch	c (Fe) [mmol L ⁻¹]	$c \text{ (DMSA total)} \\ [\text{mmol } L^{-1}]$	c (DMSA bound) [mmol L ⁻¹]	<i>c</i> (DMSA free) [mmol L ⁻¹]	Molar ratio DMSA (bound)/Fe
A	46.13	1.35 ± 0.15	1.13 ± 0.14	0.22 ± 0.08	0.0245 ± 0.0029
В	40.49	1.24 ± 0.32	1.00 ± 0.34	0.24 ± 0.12	0.0247 ± 0.0084
С	43.00	1.25 ± 0.32	1.02 ± 0.34	0.23 ± 0.03	0.0237 ± 0.0079
D	35.60	1.36 ± 0.45	1.18 ± 0.42	0.19 ± 0.04	0.0331 ± 0.0118
Mean	41.31 ± 4.45	1.30 ± 0.31	1.08 ± 0.31	0.22 ± 0.07	0.0265 ± 0.0078

Table 2 Hydrodynamic diameter *d*, polydispersity index PI, zeta potential *z* and pH-value of DIONP dispersed in MilliQ water (4.78 mM Fe as DIONP)

	Parameter						
Time [d]	<i>d</i> (distribution size) [nm]	PI	<i>z</i> [mV]	рН			
0	43.6 ± 11.6	0.225	-49.6 ± 5.69	8.14			
1	46.3 ± 12.1	0.231	-47.0 ± 2.92	7.52			
2	43.8 ± 12.4	0.226	-47.6 ± 6.49	7.90			
7	42.8 ± 11.0	0.225	-39.9 ± 3.52	8.33			
14	41.9 ± 11.0	0.237	-47.5 ± 2.76	7.73			
21	38.3 ± 9.9	0.278	-43.8 ± 3.90	8.06			
28	39.1 ± 10.5	0.286	-45.4 ± 3.75	7.44			

 Table 3
 Hydrodynamic
 diameter
 d,
 polydispersity
 index
 PI,
 zeta

 potential z and pH-value of DIONP dispersed in OECD 301 F medium
 (4.78 mM Fe as DIONP)
 (4.78 m

	Parameter							
Time [d]	d (distribution size) [nm]	PI	<i>z</i> [mV]	рН				
0	41.3 ± 10.7	0.214	-37.5 ± 1.47	7.72				
1	73.3 ± 20.8	0.204	-37.0 ± 0.82	7.72				
2	96.3 ± 26.5	0.184	-37.5 ± 1.38	7.73				
7	334 ± 86.8	0.259	-35.6 ± 0.64	7.69				
14	546 ± 148	0.275	-37.4 ± 0.63	7.62				
21	631 ± 165	0.267	-37.7 ± 0.46	7.56				
28	946 ± 252	0.322	-37.2 ± 0.39	7.52				

known to promote particle-particle interactions by bridging effects, and thus agglomeration of NPs.^{21,73}

Large errors in diameters determined by DLS can arise because the measurements are based on the intensity of light scattered by particles in solution. Consequently, when calculating the diameter, larger particles are weighted more strongly than smaller particles because the contribution of scattered light to the correlation function scales with r^6 (radius to the power of six). Light-scattering techniques such as DLS cannot detect individual particles inside agglomerates. In these techniques, all agglomerates are therefore regarded as single particles, resulting in a larger calculated diameter.

3.4 Biodegradability

We performed an ultimate biodegradability study with free DMSA and DIONPs. There was no significant degradation of DMSA in either case. As shown in Fig. 5, the degradation rates for free and bound DMSA were less than 10%. The test fulfilled the validity criteria (BOD in blanks, IONP blanks and degradation of benzoate within a given time frame; see Fig. S3 and S4 in ESI†). A control experiment with uncoated IONPs and benzoate showed that the NPs (or ions released from the NPs) had no effect on the biodegradability of an easily degradable substance, proving that the presence of NPs does not negatively affect the microbial community (see Fig. S4 in ESI[†]). A biodegradation of at least 60% initial BOD, which was achieved during the test period within a time frame of 10 days, can be considered as evidence of ready biodegradability in accordance with the OECD 301 F guidelines.65 The 10 days window starts when 10% biodegradation is reached. The 60% pass level represents virtually complete ultimate biodegradation of the test substance because it is assumed that the remaining 30-40% is assimilated by biomass or is present as products of biosynthesis.

The biodegradation was below 10% over the entire duration of the experiments, therefore the tested substances are considered to be not readily biodegradable; this contradicts the BIOWIN prediction. Quantitative structure–activity relationship models predict that the chemical structure of DMSA is readily biodegradable. The BIOWIN v.4.10, US Environmental



Fig. 5 Biological degradation of DMSA in dissolved form (orange circle) or adsorbed on the surface of DIONP (blue circle). Data represent mean values \pm SD (error range as an area of coloured lines, n = 4 for DIONP and n = 8 for DMSA).

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2019

Article. Published on 12 August 2019. Downloaded on 8/18/2019 5:21:10 PM. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence

Nanoscale Adv.

Nanoscale Advances

Protection Agency Estimation Programs Interface Suite was used to predict the probability of biodegradation.⁷⁴ Microbial conversion of mercaptosuccinic acid, which is structurally similar to DMSA, but has only one –SH functional group, has been reported in the literature.⁷³ This supports the prediction made by the biodegradability model.

A key factor in the microbial degradation of biomolecules is the physical accessibility of the substance. For NPs or large biomolecules, the pathways for cellular entry into microorganisms are unfortunately insufficiently understood.76 In addition to the diffusion of small molecules through the membrane pores, endocytosis-like processes have been observed in which extracellular material is imported into the cells via the membrane transport system.77-79 A single DMSA molecule is smaller than 1 nm on the basis of sum of the known bond lengths (H-O, C-O, C-C) and could pass directly through membrane pores of size 4-50 nm.^{80,81} After uptake, small molecules can be biologically degraded by intracellular enzymes. DMSA tends to oligomerize by formation of disulfide bridges via thiol groups (-SH). This property of DMSA may strongly affect its bioavailability. The same applies to bound DMSA in the DIONP coating if microorganisms are unable to take up the coated NPs. For comparison we have predicted ultimate biodegradability of DMSA oligomers containing up to six DMSA units. Upon addition of the fifth DMSA molecule the applicability domain of the BIOWIN model in terms of molecular weight of the compound in question is exceeded. Despite that biodegradability actually increases with each additional DMSA unit.

Furthermore, the state of aggregation may vary in the range of environmental NP concentrations compared to the laboratory scale. NPs may be influenced by organic matter in aqueous systems, changing their behaviour by adsorbing to or exchanging the DMSA. The binding of strong ligands is of great importance for particle stability. One example is the interaction of the DMSA carboxylate groups on the IONP surface and the formation of a disulfide network.^{32,82} A more stable NP coating and thus reduced aggregation can influence particle properties such as stability and dissolution rates and change their bioavailability for pelagic organisms.⁸³

The tendency of DMSA to form disulfide bridges and to polymerize probably complicates the uptake of DMSA from solution into microorganisms. Moreover, the DMSA coating on DIONPs may be less accessible to organisms which break down the coating from a free end group.⁵² The uptake of coated NPs into bacterial cells probably did not occur. The strong negative charge of NPs (Table 3) gives raise to repulsion between NPs and cells which are also negatively charged.⁸⁴ Therefore, the lack of degradation of both DMSA oligomers in solution as well as DMSA present in NPs coating is most probably caused by their poor bioavailability.

4. Conclusions

We developed and validated a method for quantitative analysis of DMSA in IONP samples and used the method to determine the amounts of IONP-bound DMSA. It allowed us to determine the average amount of DMSA molecules present in the DIONPs coating with a quantification limit of 1.22μ mol L⁻¹, which is about the same order of magnitude as the HPLC methods described in the literature, but with much simpler sample preparation. This method may be applicable to coated NPs of other metals and metal oxides if these NPs have a coating with a known sulfur content (as in the case of DMSA, which has two thiol groups) and these groups can be oxidized to sulfate. The method can therefore be used to

coating with DMSA or any other sulfur-containing coating. DIONPs were colloidally stable in water over a long period of time but agglomerated in saline media because of the high ionic strength.

verify the reproducibility of NP synthesis with regard to surface

The stability of coating is an important issue defining fate of NPs in the environment.^{85,86} We have shown on a laboratory scale that the DMSA coating cannot be stripped of by the microbial community of wastewater treatment plant within the time range of the experiments. Under the selected aerobic test conditions, no significant degradation of DMSA was observed. In addition to the structure of the DMSA coating, the increasing size during incubation in the biodegradation medium may lead to reduced bioavailability. This suggests that the DIONP will be more stable than uncoated IONP in wastewater treatment plant, which is a likely release pathway considering possible application in medicine.^{86,87} The stability in freshwater will most probably be even higher due to lower salinity and less abundant microbial community.

These results suggest potential persistence of DMSA or DIONPs in the environment, but additional studies are needed to verify this first suspicion. Consequently, DIONPs could remain intact in wastewater treatment plants, albeit in agglomerated form, and interact with sewage sludge, for example.^{88,89} In some regions, sludge is used as fertilizer in agriculture and therefore enters other environmental compartments such as soils and sediment. During 2015, about 40% of the annual sewage sludge produced in Germany was recycled for agriculture and landscaping measures.⁹⁰

Depending on the environmental conditions at the release site, coating of IONPs can affect particle behaviour, transport, or possible release of DMSA and iron ions. These effects also need to be investigated for potential long-term environmental exposures of NPs. While short-term exposures could cause only minor effects, extended exposure might lead to severe toxicity or inhibition of the organism metabolism.^{91,92} Especially low concentrations of NPs could develop effects after accumulation in the environment or organisms. The widespread use of nanotechnology in waste water treatment, agriculture and other sectors requires a more ecologically relevant system approach including long-term studies under environmental realistic scenarios.⁹³

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mathias Gogolin, Maren Nolte, and Sarah Schriefer for performing some IC measurements in

View Article Online Paper

View Article Online

Nanoscale Advances

78

the context of student projects. This study was financially supported by the Hans-Böckler Foundation within the Graduate School for NanoCompetence and by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, funding code 03X0152, project "DENANA").

References

- 1 K. Zhu, Y. Ju, J. Xu, Z. Yang, S. Gao and Y. Hou, Acc. Chem. Res., 2018, 51, 404-413.
- 2 A. S. Teja and P.-Y. Koh, Prog. Cryst. Growth Charact. Mater., 2009, 55, 22-45.
- 3 W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang and W.-S. Kim, Sci. Technol. Adv. Mater., 2015, 16, 023501.
- 4 A. K. Gupta, R. R. Naregalkar, V. D. Vaidya and M. Gupta, Nanomedicine, 2007, 2, 23-39.
- 5 A. B. Cundy, L. Hopkinson and R. L. D. Whitby, Sci. Total Environ., 2008, 400, 42-51.
- 6 P. Xu, G. M. Zeng, D. L. Huang, C. L. Feng, S. Hu, M. H. Zhao, C. Lai, Z. Wei, C. Huang, G. X. Xie and Z. F. Liu, Sci. Total Environ., 2012, 424, 1-10.
- 7 M. Hua, S. Zhang, B. Pan, W. Zhang, L. Lv and Q. Zhang, J. Hazard. Mater., 2012, 211-212, 317-331.
- 8 J.-S. Hu, L.-S. Zhong, W.-G. Song and L.-J. Wan, Adv. Mater., 2008, 20, 2977-2982.
- 9 L. Carlos, F. S. G. Einschlag, M. C. González and D. O. Mártire, in Waste Water - Treatment Technologies and Recent Analytical Developments, InTech, 2013.
- 10 J. Hu, G. Chen and I. M. C. Lo, Water Res., 2005, 39, 4528-4536.
- 11 J. Hu, G. Chen and I. M. C. Lo, J. Environ. Eng., 2006, 132, 709-715.
- 12 D. Huber, Small, 2005, 1, 482-501.
- 13 D. Maity and D. C. Agrawal, J. Magn. Magn. Mater., 2007, 308, 46-55.
- 14 M. Chen, S. Yamamuro, D. Farrell and S. A. Majetich, J. Appl. Phys., 2003, 93, 7551-7553.
- 15 S. Moraes Silva, R. Tavallaie, L. Sandiford, R. D. Tilley and J. J. Gooding, Chem. Commun., 2016, 52, 7528-7540.
- 16 M. D. Alcalá and C. Real, Solid State Ionics, 2006, 177, 955-960.
- 17 J. Liu, Z. Zhao and G. Jiang, Environ. Sci. Technol., 2008, 42, 6949-6954.
- 18 C. Tassa, S. Y. Shaw and R. Weissleder, Acc. Chem. Res., 2011, 44, 842-852.
- 19 T.-H. Chung, C.-C. Hsieh, J.-K. Hsiao, S.-C. Hsu, M. Yao and D.-M. Huang, RSC Adv., 2016, 6, 45553-45561.
- 20 A. K. Gupta and M. Gupta, Biomaterials, 2005, 26, 3995-4021.
- 21 J. Filser, D. Arndt, J. Baumann, M. Geppert, S. Hackmann, E. M. Luther, C. Pade, K. Prenzel, H. Wigger, J. Arning, M. C. Hohnholt, J. Köser, A. Kück, E. Lesnikov, J. Neumann, S. Schütrumpf, J. Warrelmann, M. Bäumer, R. Dringen, A. von Gleich, P. Swiderek and J. Thöming, Nanoscale, 2013, 5, 1034-1046.
- 22 A.-H. Lu, E. L. Salabas and F. Schüth, Angew. Chem., Int. Ed., 43 X. Zhu, S. Tian and Z. Cai, PLoS One, 2012, 7, e46286. 2007, 46, 1222-1244.

- 23 R. Mejías, S. Pérez-Yagüe, L. Gutiérrez, L. I. Cabrera, R. Spada, P. Acedo, C. J. Serna, F. J. Lázaro, A. Villanueva, M. d. P. Morales and D. F. Barber, Biomaterials, 2011, 32, 2938-2952.
- 24 C. R. A. Valois, J. M. Braz, E. S. Nunes, M. A. R. Vinolo, E. C. D. Lima, R. Curi, W. M. Kuebler and R. B. Azevedo, Biomaterials, 2010, 31, 366-374.
- 25 S. Kossatz, R. Ludwig, H. Dähring, V. Ettelt, G. Rimkus, M. Marciello, G. Salas, V. Patel, F. J. Teran and I. Hilger, Pharm. Res., 2014, 31, 3274-3288.
- 26 S. Kossatz, J. Grandke, P. Couleaud, A. Latorre, A. Aires, K. Crosbie-Staunton, R. Ludwig, H. Dähring, V. Ettelt, A. Lazaro-Carrillo, M. Calero, M. Sader, J. Courty, Y. Volkov, A. Prina-Mello, A. Villanueva, Á. Somoza, A. L. Cortajarena, R. Miranda and I. Hilger, Breast Cancer Res., 2015, 17, 66.
- 27 M. Sanhaji, J. Göring, P. Couleaud, A. Aires, A. L. Cortajarena, J. Courty, A. Prina-Mello, M. Stapf, R. Ludwig, Y. Volkov, A. Latorre, Á. Somoza, R. Miranda and I. Hilger, Nanomedicine, 2019, 20, 101983.
- 28 W. Yantasee, C. L. Warner, T. Sangvanich, R. S. Addleman, T. G. Carter, R. J. Wiacek, G. E. Fryxell, C. Timchalk and M. G. Warner, Environ. Sci. Technol., 2007, 41, 5114-5119.
- 29 A. Iqbal, K. Iqbal, B. Li, D. Gong and W. Qin, J. Nanosci. Nanotechnol., 2017, 17, 4386-4409.
- 30 M. Rivera, W. Zheng, H. V. Aposhian and Q. Fernando, Toxicol. Appl. Pharmacol., 1989, 100, 96-106.
- 31 K. Sompamit, U. Kukongviriyapan, W. Donpunha, S. Nakmareong and V. Kukongviriyapan, Toxicol. Lett., 2010, 198, 77-82.
- 32 C. Petters, E. Irrsack, M. Koch and R. Dringen, Neurochem. Res., 2014, 39, 1648-1660.
- 33 H. V Aposhian, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1983, 23, 193-215.
- 34 H. V Aposhian and M. M. Aposhian, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1990, 30, 279-306.
- 35 M. E. Sears, Sci. World J., 2013, 2013, 1-13.
- 36 J. H. Graziano, E. S. Siris, N. Lolacono, S. J. Silverberg and L. Turgeon, Clin. Pharmacol. Ther., 1985, 37, 431-438.
- 37 J. H. Graziano, Med. Toxicol., 1986, 1, 155-162.
- 38 M. Geppert, M. C. Hohnholt, K. Thiel, S. Nürnberger, I. Grunwald, K. Rezwan and R. Dringen, Nanotechnology, 2011, 22, 145101.
- 39 M. Auffan, L. Decome, J. Rose, T. Orsiere, M. De Meo, V. Briois, C. Chaneac, L. Olivi, J. Berge-lefranc, A. Botta, M. R. Wiesner and J. Bottero, Environ. Sci. Technol., 2006, 40, 4367-4373.
- 40 B. Wang, W. Feng, M. Zhu, Y. Wang, M. Wang, Y. Gu, H. Ouvang, H. Wang, M. Li, Y. Zhao, Z. Chai and H. Wang, J. Nanopart. Res., 2009, 11, 41-53.
- 41 Y.-Q. Zhang, R. Dringen, C. Petters, W. Rastedt, J. Köser, J. Filser and S. Stolte, Environ. Sci.: Nano, 2016, 3, 754-767.
- 42 E. C. Oliveira-Filho, J. S. Filho, L. A. Novais, W. S. Peternele, R. B. Azevedo and C. K. Grisolia, Environ. Sci. Pollut. Res., 2016, 23, 18362-18368.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2019

Paper

Nanoscale Advances

- 44 S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2574.
- 45 M. Baalousha, A. Manciulea, S. Cumberland, K. Kendall and J. R. Lead, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2008, **27**, 1875.
- 46 M. Baalousha, Sci. Total Environ., 2009, 407, 2093-2101.
- 47 N. Surugau and P. L. Urban, J. Sep. Sci., 2009, 32, 1889-1906.
- 48 T. Lana-Villarreal, A. Rodes, J. M. Pérez and R. Gómez, J. Am. Chem. Soc., 2005, **127**, 12601–12611.
- 49 X. H. Ju, Y. Shi, N. Liu, R. C. Guo, B. J. Wang and X. Cui, J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 2009, 877, 1621–1626.
- 50 J. J. Knudsen and E. L. McGown, J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl., 1988, 424, 231–241.
- 51 S. M. Louie, R. Ma and G. V. Lowry, in *Frontiers of* Nanoscience, Elsevier Ltd., 1st edn, 2014, vol. 7, pp. 55-87.
- 52 C. Lei, Y. Sun, D. C. W. Tsang and D. Lin, *Environ. Pollut.*, 2018, **232**, 10–30.
- 53 G. V. Lowry, K. B. Gregory, S. C. Apte and J. R. Lead, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **46**, 6893–6899.
- 54 S. M. Louie, J. M. Gorham, E. A. McGivney, J. Liu, K. B. Gregory and V. A. Hackley, *Environ. Sci.: Nano*, 2016, 3, 1090–1102.
- 55 T. L. Kirschling, P. L. Golas, J. M. Unrine, K. Matyjaszewski, K. B. Gregory, G. V. Lowry and R. D. Tilton, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45, 5253–5259.
- 56 G. F. White, N. J. Russell and E. C. Tidswell, *Microbiol. Rev.*, 1996, **60**, 216–232.
- 57 J. M. Inacio and I. de Sa-Nogueira, J. Bacteriol., 2008, 190, 4272–4280.
- 58 F. Kawai, Biosci., Biotechnol., Biochem., 2010, 74, 1743-1759.
- 59 W. G. Kreyling, A. M. Abdelmonem, Z. Ali, F. Alves, M. Geiser, N. Haberl, R. Hartmann, S. Hirn, D. J. de Aberasturi, K. Kantner, G. Khadem-Saba, J.-M. Montenegro, J. Rejman, T. Rojo, I. R. de Larramendi, R. Ufartes, A. Wenk and W. J. Parak, *Nat. Nanotechnol.*, 2015, **10**, 619–623.
- 60 M. Chanana, P. RiveraGil, M. A. Correa-Duarte, L. M. Liz-Marzán and W. J. Parak, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, 52, 4179–4183.
- 61 M. Auffan, A. Masion, J. Labille, M.-A. Diot, W. Liu, L. Olivi, O. Proux, F. Ziarelli, P. Chaurand, C. Geantet, J.-Y. Bottero and J. Rose, *Environ. Pollut.*, 2014, **188**, 1–7.
- 62 A. Bee, R. Massart and S. Neveu, J. Magn. Magn. Mater., 1995, 149, 6–9.
- 63 M. Geppert, M. Hohnholt, L. Gaetjen, I. Grunwald, M. Bäumer and R. Dringen, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2009, 5, 285–293.
- 64 J. Riemer, H. H. Hoepken, H. Czerwinska, S. R. Robinson and R. Dringen, *Anal. Biochem.*, 2004, **331**, 370–375.
- 65 OECD, Test No. 301: Ready Biodegradability, OECD Publishing, 1992, vol. 301.
- 66 J. Aaseth, M. A. Skaug, Y. Cao and O. Andersen, J. Trace Elem. Med. Biol., 2015, 31, 260–266.
- 67 M. K. Lawson, M. Valko, M. T. D. Cronin and K. Jomová, *Curr. Pharmacol. Rep.*, 2016, 2, 271–280.
- 68 E. S. G. Barron, Z. B. Miller and G. Kalnitsky, *Biochem. J.*, 1947, 41, 62–68.

Nanoscale Adv.

- 69 A. Dhakshinamoorthy, M. Alvaro and H. Garcia, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 6476.
- 70 W. Rastedt, K. Thiel and R. Dringen, Biomed. Phys. Eng. Express, 2017, 3, 035007.
- 71 S. M. Louie, R. D. Tilton and G. V. Lowry, *Environ. Sci.: Nano*, 2016, 3, 283–310.
- 72 M. Pavlin and V. B. Bregar, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2012, 7, 1389–1400.
- 73 G. Salas, C. Casado, F. J. Teran, R. Miranda, C. J. Serna and M. P. Morales, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 21065.
- 74 US EPA, Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v 4.11, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 2018.
- 75 U. Brandt, A. Deters and A. Steinbüchel, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2015, 99, 4545–4557.
- 76 S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin and J. R. Lead, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2008, 27, 1825.
- 77 A. Kumar, A. K. Pandey, S. S. Singh, R. Shanker and A. Dhawan, *Chemosphere*, 2011, 83, 1124–1132.
- 78 T. G. A. Lonhienne, E. Sagulenko, R. I. Webb, K.-C. Lee, J. Franke, D. P. Devos, A. Nouwens, B. J. Carroll and J. A. Fuerst, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 12883–12888.
- 79 J. A. Fuerst and E. Sagulenko, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.*, 2014, **1843**, 1732–1738.
- 80 S. O. Merouch, K. Z. Bencze, D. Hesek, M. Lee, J. F. Fisher, T. L. Stemmler and S. Mobashery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 4404–4409.
- 81 W. Vollmer, D. Blanot and M. A. De Pedro, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008, **32**, 149–167.
- 82 N. Fauconnier, J. N. Pons, J. Roger and A. Bee, J. Colloid Interface Sci., 1997, 194, 427–433.
- 83 R. Behra, L. Sigg, M. J. D. Clift, F. Herzog, M. Minghetti, B. Johnston, A. Petri-Fink and B. Rothen-Rutishauser, J. R. Soc., Interface, 2013, 10, 20130396.
- 84 Z. Li, K. Greden, P. J. J. Alvarez, K. B. Gregory and G. V Lowry, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44, 3462–3467.
- 85 C. Su, J. Hazard. Mater., 2017, 322, 48-84.
- 86 E. Demangeat, M. Pédrot, A. Dia, M. Bouhnik-le-Coz,
 F. Grasset, K. Hanna, M. Kamagate and F. Cabello-Hurtado, *Environ. Sci.: Nano*, 2018, 5, 992–1001.
- 87 L. Mohammed, H. G. Gomaa, D. Ragab and J. Zhu, *Particuology*, 2017, **30**, 1–14.
- 88 G. Cornelis, K. Hund-Rinke, T. Kuhlbusch, N. van den Brink and C. Nickel, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 2014, 44, 2720–2764.
- 89 S. Loureiro, P. S. Tourinho, G. Cornelis, N. W. Van Den Brink, M. Díez-Ortiz, S. Vázquez-Campos, V. Pomar-Portillo, C. Svendsen and C. A. M. Van Gestel, in *Soil Pollution*, Elsevier, 2018, pp. 161–190.
- 90 Statistisches Bundesamt (Destatis), Statistisches Jahrbuch -Deutschland und Internationales, 2017.
- 91 H. Li, F. Cui, Z. Liu and D. Li, *Bioresour. Technol.*, 2017, 234, 448–455.
- 92 L. Otero-González, J. A. Field and R. Sierra-Alvarez, Water Res., 2014, 58, 160–168.
- 93 A. D. Servin and J. C. White, NanoImpact, 2016, 1, 9-12.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2019

Open Access Article. Published on 12 August 2019. Downloaded on 8/18/2019 5:21:10 PM.

View Article Online

Paper

2.3 Manuscript: Formation and biodegradation of NOM coronas on metal oxide nanoparticles

S. Bemowsky, A. Rother, J. Köser, M. Markiewicz, H. Naatz, S. Pohkrel, J. Thöming and S. Stolte

Beitrag von Steve Bemowsky:

- Durchführen aller experimentellen Arbeiten abseits der NP Synthese
- Ausarbeitung des ersten Entwurfs vom Manuskript
- Überarbeitung des Manuskripts
- Erstellen aller Abbildungen und Tabellen

Abstract

In natural environment a layer of biomolecules often adsorbs on nanoparticles (NPs) forming so called NP corona. Corona can influence the behaviour, colloidal stability, reactivity, mobility or toxicity of the NP. The interactions of model substances with three widely used and environmentally relevant nanomaterials (CuO, CeO₂ and SiO₂) were investigated. In order to investigate the effect of environmentally relevant substances on the behaviour of NPs, we have chosen model substances ranging from pure chemicals (catechin, tannic acid) to more complex environmental isolates based on their structural similarity to NOM (humic acid, Nordic Reservoir Natural Organic Matter). Formation of biomolecule corona with all tested biomolecules was observed on CuO and CeO₂ NPs, while it did not occur on SiO₂ NPs. Additionally we have included cetylpyridinium chloride as an examplary anthropogenic pollutant, which interacted readily with SiO₂ NPs as well as with CeO₂ NPs yet with the latter only in high ionic strength medium simulating wastewater (OECD 301). The biomolecule corona increased the rate of dissolution of CuO NPs in most cases. Catechin and tannic acid adsorbed on the surface of CuO and CeO₂ underwent biodegradation, but to a lesser extent than free biomolecules. Humic acid or NOM were not degradable in the form of NP corona as well as in the free form.

1. Introduction

CuO, CeO₂, and SiO₂ nanoparticles (NPs) have received much attention in recent decades due to material-specific characteristics like antibacterial, catalytic, or electronic properties.¹ They have been developed for a wide range of biomedical, consumer, environmental, and industrial applications. Although the use of CuO-NPs is not as common as for CeO₂ or SiO₂,² they are industrially produced and commercially available for potential application as additives in lubricants³, antifouling paints⁴, metallic coating inks⁵ or in novel antimicrobial polymers/plastics^{6,7} and textiles.⁸

Uncoated NPs have high surface energies due to their large surface-to-volume ratio and are therefore prone to particle agglomeration.^{9,10} In order to achieve the best possible particle properties for a specific application, NPs are often coated with inorganic or organic components such as gold^{11,12}, silica¹³, dextran¹⁴ or different polymers.^{15,16}

In environmental matrices natural organic matter (NOM)¹⁷ might sorb to the particles surface. This so-called NP corona directly influences the NP behaviour, by either increasing or decreasing their colloidal stability in the surrounding medium or by improving the reactivity or mobility of the NP.^{18,19} When interacting with the surrounding matrix, the NP corona can also change due to biological, chemical or mechanical processes.¹⁹ This leads to a possible loss of the synthetic coating or the exchange of the surface adsorbed molecules and thus to different electrostatic and steric interactions of the NPs, which alter their stability, bioavailability and toxicity.²⁰ Therefore, the presence of biomolecules in environmental medium influences the 'identity' of NPs, their stability²¹, their dissolution behaviour²² as well as facilitates understanding the transport processes of NPs in the environment.²³ NPs after application might reach the waste water treatment plant (WWTP) with the waste streams or by direct addition for photocatalytic degradation of organic contaminants and eventually end up in the environment.²⁴

NPs can interact with organic and inorganic materials present in these environments. Natural waters, for example, contain NOM in various concentrations of mostly 0.1–20 mg L⁻¹, while WWTP waters can also have higher values of 50 mg L⁻¹.^{25,26} The main components of aquatic NOM are the degradation products of dead plant matter or excretions of organisms such as polysaccharides, proteins, lipids, amino acids, lignins or humic and fulvic acids (HA and FA).²⁷

NOM has a high affinity to positively charged (due to electrostatic attraction) or neutral (due to hydrophobic interactions) nanomaterials. The formation of a NOM corona could partially simplify the complex behaviour of the NPs, since the surface bound NOM layer in these cases always shows a negative net charge to the outside. Depending on the nanomaterial and its interactions with NOM, the modes and mechanisms of toxic actions may differ by amplifying or attenuating nanotoxicological effects. Metal oxide NPs tend to cause oxidative stress in organisms which is associated with the formation of reactive oxygen species (ROS).²⁸ Dissolved organic matter (DOC) in natural waters lowered the toxicity of CuO-NPs to crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* as well as protozoan *Tetrahymena thermophila* up to 140-fold.²⁹ NOM adsorption to CeO₂-NPs decreased nanotoxicity to algae *P. subcapitata* by preventing direct interaction between NP and algae, thus reducing the bioavailability of CeO₂-NPs.³⁰ In contrast, SiO₂-NPs are fairly inert in terms of toxicity and likely to have no major toxic effects due to their low affinity to NOM and the fact that their behaviour is almost unaffected by water chemistry.^{19,31}

The role of NOM in the fate of NPs is largely focused on its influence on the stability or toxicity of nanomaterials, but little is known about whether certain subfractions of NOM are preferentially bound to different NPs depending on the physicochemical parameters of the nanomaterial such as charge, size, surface functional groups, etc.¹⁹ and whether such bound materials can be degraded by e.g. microorganisms present in the WWTP. The identified gaps in knowledge are taken up here. In order to develop a better understanding of the behaviour of metal oxide NPs in the environment, we investigated the sorption of NOM as well as representative model substances onto CuO-, CeO₂- and SiO₂-NP and how colloidal properties are influenced by the corona formation. Furthermore, it was investigated if corona molecules are accessible to biodegradation and whether the degradation process changes the colloidal properties and thus the stability and fate of NPs in the environment.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Copper(II) naphthenate (Strem Chemicals, 99.9% pure, 8% Cu) and xylene (Strem Chemicals, 99.95% pure) were used for synthesis of CuO-NPs. Furthermore, Cu(NO₃)₂ (Sigma Aldrich, 99–104% puriss p.a.), HNO₃ (65%, Sigma Aldrich, \geq 99.0% purises p.a.), H₂O₂ (\geq 30%, Supelco, ultratrace analysis) and palladium modifier as Pd(NO₃)₂ (Merck, $c_{(Pd)} = 10.0 \pm 0.2$ g L⁻¹ in 15% HNO₃) were used in atomic absorption spectroscopy (AAS) analysis. Catechin (Sigma Aldrich, ≥96%), tannic acid (Sigma Aldrich, pure), humic acid (Sigma Aldrich, technical) and cetylpyridinium chloride (Sigma Aldrich, pure) were purchased as biomolecule representative. The model substance Nordic Reservoir Natural Organic Matter (NR-NOM) was obtained from a drinking water reservoir at Vallsjøen (Skarnes, Norway) and supplied by the International Humic Substances Society (IHSS, St. Paul, MN, USA). In addition to synthesized CuO-NPs (see section 2.2), JRC standard CeO₂-NP (NM-212) and commercial SiO₂-NP (Levasil 200/30) from AkzoNobel (Bad-Berleburg, Germany) were used (TEM pictures and size as well as BET surface area are shown in Table S1 in ESI). EPA-certified (United States Environmental Protection Agency) thread vials (20 mL, clear glass, ND24) from neo-Lab (Heidelberg, Germany) were used for colloidal stability

testing. MilliQ water (resistivity 18.2 M Ω cm) was produced with a Millipore MilliQ Plus water purification system (Burlington, MA, USA).

2.2 Procedures for synthesis of CuO-NP

Pristine CuO NPs were synthesized via flame spray pyrolysis (FSP) as described in literature.^{32,33} The liquid precursor, copper(II) naphthenate (0.5 M by metal concentration) diluted in xylene, was fed to a nozzle at a flow rate of 5 mL min⁻¹ using a KDS-100-CF syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA, USA). The precursor was dispersed via an O₂ gas flow of 5 L min⁻¹, while a pressure drop of 1.5 bar was maintained at the nozzle tip. A supporting flame mixed with 1.5 L min⁻¹ CH₄ and 3.2 L min⁻¹ O₂ ignites the spray. The particles were collected on a cooled glass fibre filter (Type A/E, 257 mm diameter, Pall, Dreieich, Germany) 60 cm above the nozzle. Subsequently, a specific surface area of the CuO-NP of 74.47 ± 3.0 m² g⁻¹ was determined according to Brunauer-Emmett-Teller theory as described in Naatz et.al.³³

2.3 Instrumental analysis

2.3.1 preparation. Stock solutions of catechin, Sample tannic acid. cetylpyridinium chloride, humic acid and Nordic Reservoir Natural Organic Matter (200 mg L⁻¹) were prepared in MilliQ water and OECD 301 F medium (see section 2.4 for the preparation of this medium). In order to achieve environmentally comparable conditions of the samples, the pH was adjusted to 7-8 with NaOH. The solution was then stirred for 24 h in the absence of light (wrapped in aluminium foil), followed by readjustment of pH. Stock solutions of tannic acid, humic acid and Nordic Reservoir Natural Organic Matter were filtrated with a 0.45 µm regenerated cellulose syringe filter (WICOM, Heppenheim, Germany); the filters were rinsed with 5 mL MilliQ water and then flushed with air to remove excess water prior to use. CuO-NP stock solutions (1 g L⁻¹) were dispersed for 10 min in an ultrasonic bath (VWR, Darmstadt, Germany), whereas CeO₂-NP stock solutions were dispersed via ultrasonic disintegrator (200W, 100% amplitude, tip diameter of 5-7 mm) for 1 min. Commercially available SiO₂-NP solution was already well dispersed.

Tests for colloidal stability of NPs in presence of catechin, tannic acid and Nordic Reservoir Natural Organic Matter or humic acid and cetylpyridinium chloride over 0, 24 and 48 h were performed in MilliQ water and OECD 301 F medium. To achieve a better comparability of the biomolecule concentrations, the total organic carbon content was used to adjust corresponding concentrations of catechin, tannic acid (25 mg L⁻¹ each), humic acid and Nordic Reservoir Natural Organic Matter (50 mg L⁻¹ each) to 10 mg C L⁻¹.

Prior to biodegradation analysis of adsorbed biomolecules, CuO- and CeO₂-NP were coated with catechin, tannic acid, Nordic Reservoir Natural Organic Matter, humic acid or cetylpyridinium chloride. For this purpose, the adsorption maximum of the biomolecules on the target NPs was used. The 2.5 times concentrated OECD 301 medium was used for sample preparation to avoid dilution by adding NPs and biomolecules. NPs and test substances were mixed and incubated 24 h in MilliQ water. The NPs were centrifuged in an Eppendorf 5430R centrifuge (Hamburg, Germany) for 30 min at 30 100 rcf and the supernatant was removed and analyzed. Afterwards the NPs with the model substance corona adsorbed on them were added to the inoculum and redispersed. For a flowchart of sample preparation please see Figure S1 in supplementary information file.

2.3.2 Dynamic and electrophoretic light scattering (DLS/ELS). Analysis was performed with a Delsa[™] Nano C particle analyser (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) with either a cuvette cell for measurement of hydrodynamic diameters or a flow cell for zeta potential measurements. The device featured a diode laser (30 mW, λ_0 = 658 nm), with scattered light detection by a photomultiplier tube and analysis with a digital correlator. DLS experiments were performed at a backscattering angle of 165°. After shaking the samples manually for 10 s to ensure sampling of homogenously distributed particles, a sample (2.5 mL) was placed in a MilliQ-water-cleaned polystyrene cuvette (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) of dimensions $10 \times 10 \times 45$ mm³. This sample was then thermostatted at 25 °C for 5 min in the analytical device before 10 repeated measurements with 120 s measurement time were conducted. The correlation function g^2 was evaluated based on the properties of pure water with a refractive index n (658 nm, 25 °C) = 1.3328 and a viscosity η (658 nm, 25 °C) = 0.8898 cP with Beckman Coulter Software Delsa[™] Nano (version 3.730/2.30). For data interpretation, the cumulants method was used to calculate the z-average of the hydrodynamic diameter *d* and the polydispersity index.

The zeta potentials of the samples were determined by ELS under the same conditions as those used for DLS, except the scattering angle was changed to 15°. A sample (5 mL) was directly injected into a flow cell and equilibrated, after which three repetitions with a measurement time of 300 s were performed. Data were evaluated by the Smoluchowski equation from the refractive index, viscosity, and dielectric constant (ε = 78.3) of pure water with Beckman Coulter software (see DLS section). All measurements were recorded as three independent replicates for each sample.

2.3.3 Ultraviolet-visible spectroscopy (UV/vis). UV/vis spectrophotometer Cadas 200 (Hach Lange, Düsseldorf, Germany) was used to determine sorption isotherms. Measurements were conducted in the spectral range of 190–450 nm with a Herasil quartz cuvette 6030 UV (Hellma, Müllheim, Germany). Calibrations were performed for catechin (278 nm), tannic acid (276 nm), humic acid (257 nm) and cetylpyridinium chloride (259 nm) in a concentration range of 1–30 mg L⁻¹ and for Nordic Reservoir Natural Organic Matter (254 nm) from 1–60 mg L⁻¹ in water and OECD 301 F medium. The wavelength maxima were obtained by measuring UV-visible light absorption spectra from 190–800 nm for all test substances. The detection limit was determined with the student t-test for a confidence interval of 95% and the quantification limit corresponded to three times the detection limit. Three independent repetitions were performed for each measurement.

2.3.4 Determination of K and modelling of the adsorption isotherms. For the analysis of adsorbed model substance concentration on NPs, a concentration series of the respective test substance (catechin, tannic acid, or Nordic Reservoir Natural Organic Matter) in the presence of CuO-NP (100 mg L⁻¹) was performed. Furthermore, adsorption of humic acid and cetylpyridinium chloride on CeO₂- (100 mg L⁻¹) and SiO₂-NP (1000 mg L⁻¹) were determined. The mixture was homogenized for 30 s with a vortex mixer (Heidolph, Schwabach, Germany) and incubated for 2 h until reaching a steady state between nanoparticles and model substance. To avoid signal interferences, the sample was then centrifuged in an Eppendorf 5430R centrifuge (Hamburg, Germany) for 30 min (1h for SiO₂-NPs) at 30 100 rcf. The supernatant was analysed via UV/vis. Then the amount of adsorbed substance can be calculated by subtracting the determined

concentration from the known initial value. The data was evaluated according to different model equations like Langmuir, Freundlich or Brunauer, Emmett and Teller (BET). All compound concentrations were converted with total organic carbon (TOC) values (determined as non purgeable organic carbon) into moles of carbon per litre (mol C L⁻¹; see section 2.3.6). Furthermore, by utilizing the measured BET surface (m² g⁻¹) and the mass of NPs used (g L⁻¹), the concentration can be recalculated into moles of carbon per square meter of NP surface area (mol C m⁻²).

2.3.5 Atomic absorbance spectroscopy (AAS). The copper content was quantified by graphite furnace AAS using a Unicam 989 QZ AA Spectrometer with GF90 plus furnace and FS90 plus autosampler (Unicam, Cambridge, UK) after digestion. The digestion was carried out by adding \geq 65% HNO₃ (50 µL) and 35% H₂O₂ (50 µL) to the samples (100 µL). The mixture was homogenized for 30 s with a vortex mixer (Heidolph, Schwabach, Germany) and then centrifuged for 30 s at 6700 rcf in a Minispin Plus centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany). The open samples were tempered at 65 °C for 1 h and 85 °C overnight in a Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, Germany). The dry residue was dissolved in 1% HNO₃ (1 mL). Subsequently, the samples were measured and if needed further diluted to be in the working range of the AAS (15–200 µg Cu L⁻¹). Calibration was performed with a CuNO₃ standard solution (10 mg L⁻¹) in 1% HNO₃ and Palladium Matrix Modifier was added to all measurements.

All AAS samples were prepared with 100 mg L⁻¹ CuO-NP and a biomolecule concentration corresponding to the maximum adsorption of the biomolecule – resulting from the calculations of the sorption isotherms. Measurements of total and dissolved copper were made in MilliQ water and OECD 301 F medium in 3 replicates each after 0, 24 and 48 h at pH 7 with 60 mg L⁻¹ NR-NOM, 100 mg L⁻¹ catechin or 180 mg L⁻¹ tannic acid. The dissolved copper was measured in the supernatant of the sample after centrifugation with an Eppendorf 5430R centrifuge (Hamburg, Germany) for 30 min at 30 100 rcf.

2.3.6 Total organic carbon analysis. Non purgeable organic carbon (NPOC) was determined with a Multi N/C 2100S (Analytik Jena, Jena, Germany) via catalytic combustion of the sample at 750 °C with the DIC (Dissolved Inorganic Carbon) being expelled beforehand by acidifying the sample and rinsing it with synthetic
air. The detection limit of this method is 0.5 mg C L⁻¹ and the measured values were obtained as NPOC from solutions of 20 mg L⁻¹ for catechin (8.8 ± 0.4 mg C L⁻¹), tannic acid (8.9 ± 0.2 mg C L⁻¹), humic acid (3.7 ± 0.1 mg C L⁻¹) and Nordic Reservoir Natural Organic Matter (4.4 ± 0.1 mg C L⁻¹).

For further calculations, a carbon content of 74.2% was assumed for cetylpyridinium chloride based on the molar mass ratio.

2.4 Biodegradation test

The aqueous mineral medium of the OECD 301 (Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD, 2006) guideline for determination of the environmental fate and behaviour was used for aerobic biodegradation experiments. A manometric respirometry method, namely OECD 301 F was used to measure the pressure decrease in test vessels caused by consumption of oxygen used by bacteria to degrade the sample.³⁴ The test mixture (final volume 432 mL) contained a mineral medium (8.5 mg L⁻¹ KH₂PO₄, 21.75 mg L⁻¹ K₂HPO₄, 22.13 mg L⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O, 1.7 mg L⁻¹ NH₄Cl, 27.5 mg L⁻¹ CaCl₂, 22.5 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, and 0.25 mg L⁻¹ FeCl₃), microbial inoculum, nitrification inhibitor (allylthiourea, 5 mg L⁻¹), and 20 mg O_2 L⁻¹ of the test substance. The microbial inoculum was derived from activated sludge from an aeration tank at the municipal wastewater treatment plant in Delmenhorst, Germany, with an average dry sludge weight of 5.5 ± 0.5 g L⁻¹. Prior to the experiments, flocs were allowed to settle and then discarded. The remaining supernatant was aerated for 7 d and used as the inoculum after addition of a medium. Final test mixture contained 10⁴–10⁵ colony-forming units per millilitre on average, determined by a Paddle test (Hach Lange, Düsseldorf, Germany). The model substances were weighed and combined with 1 L of inoculum in volumetric flasks. Two samples of volume 432 mL were taken from each flask and placed in amber-glass test bottles (OxiTop, WTW, Weilheim, Germany). Because of the limited sensitivity of the technique (lowest measurable range 40 mg O_2 L⁻¹) the concentrations of the test substance were significantly higher than expected environmental concentrations. Each sample test was run in duplicate, with blank samples to account for endogenous cellular breathing, and positive controls containing sodium benzoate in the same concentration as that of the model substance (20 mg O_2 L⁻¹). Based on the determined maximum monolayer adsorption capacity (q_m) , the amount of NP was calculated which is required to bring about 20 mg of test substance per

litre adsorbed on the NP surface into the biodegradation test system (values shown in Table S2 in the ESI). The mixture of NPs and model substance was homogenized for 30 s with a vortex mixer (Heidolph, Schwabach, Germany) and incubated for 2 h until reaching a steady state between nanoparticles and test substance. To avoid adding non adsorbed (dissolved) model substance into the biodegradation test, the sample was then centrifuged in an Eppendorf 5430R centrifuge (Hamburg, Germany) for 30 min at 30 100 rcf. The supernatant was subsequently removed and the NPs were redispersed in OECD 301 medium to add them to the sample. During the test, the temperature was maintained at 20 °C. The decrease in pressure inside the bottle caused by oxygen consumption was measured, recorded, and converted to the biochemical oxygen demand (BOD). Finally, the percentage degradation was calculated from the BOD value and theoretical oxygen demand of the test substance, according to the guidelines.³⁴

Calibrations were performed for the maximum wavelength of each model substance in both media respectively (Figures S2A–E in ESI). The concentration ranges varied between 1–60 mg L⁻¹ for Nordic Reservoir Natural Organic Matter and tannic acid in OECD 301 medium (Figure S2B and C in ESI) and 1–30 mg L⁻¹ for the remaining test substances in both media. The data shown represent mean values with standard deviations (n = 3). These calibration curves showed an average limit of detection (LOD) for all model substances in water of 0.3 ± 0.1 mg L⁻¹ and a limit of quantification (LOQ) of 0.8 ± 0.2 mg L⁻¹. In the OECD 301 medium, the LOD was 0.4 ± 0.3 mg L⁻¹ and the LOQ was 1.3 ± 1.0 mg L⁻¹. The individual values for each test substance are listed in Table S3 in the ESI. All presented degradation curves fit the validity criteria (BOD in blanks and degradation of benzoate within a given time frame).

3. Results and Discussion

3.1 Selection of nanoparticles, model substances and media

The interactions of model substances with three widely used and environmentally relevant nanomaterials (CuO, CeO₂ and SiO₂) were investigated. The positive surface charge of CuO- and CeO₂-NP at environmentally relevant pH values of 5–8 offers good interaction possibilities with mostly negatively charged biomolecules. Their adsorption depends on the surface chemistry of the NPs, with CuO having a slightly higher alkalinity compared to CeO₂, while SiO₂ has an amphoteric character. Therefore, a charge-induced repulsion effect of most

biomolecules is to be expected for SiO₂-NP because of its negative surfaces. Compared to the unstable copper oxide, which easily undergoes complexing or dissolution reactions with ionic components of the surrounding medium, cerium oxide and silicon oxide are much more inert. In order to investigate the effect of environmentally relevant substances on the behaviour of NPs, we reduced the complexity of NOM by analysing simpler model compounds.

Therefore, catechin (Figure IC) was selected for its possible interactions and redoxactive catechol group, which binds well to NP surfaces such as CuO or CeO₂.³⁵ In addition to an environmental sample from the Nordic Reservoir, tannic acid (TA; 5 kDa)³⁶ and humic acid (HA; 5 – 30 kDa)^{37,38} were selected (Figures IA and IB) as representatives of aquatic NOM because of their chemical nature and natural occurrence in the environment.³⁹ To investigate the interaction of NPs with positively charged organic molecules, the selection of biomolecules was extended by including the positively charged cetylpyridinium chloride (CPC; Figure ID), which is a common antiseptic⁴⁰, surfactant⁴¹ and component of ionic liquids⁴². As a result of extensive use, 52 µg L⁻¹ and 47–88 µg L⁻¹ CPC were found in river water or municipal waste water respectively.⁴³ CPC can be regarded as a representative of interactions with any anthropogenic positively charged substance.



Fig. 1: Chemical model structures of A. humic acid/NOM; B. Tannic acid; C. Catechin; D. Cetylpyridinium chloride.

MilliQ water and the test medium for degradation test (OECD 301 medium) were selected to characterize sorption and colloidal properties of NPs in presence of model substances. The calibrations for the corresponding test substances in the selected media as well as discussion about the influence of the medium can be found in the supporting information (see Figure S2 and section "Biomolecules and effect of medium" in ESI).

3.2 Effect of nanomaterial on adsorption behaviour

The equilibrium concentration of the biomolecule was determined via UV/vis spectroscopy after the adsorption step and Langmuir, Freundlich, and BET model isotherms were fitted. The Langmuir and Freundlich curves are comparable judged by the residual standard errors. Both agree with experimental data (Figure 2, Tables 1 and 2). All compound concentrations were converted with TOC values (determined as non purgeable organic carbon) into moles of carbon per litre (mol C L⁻¹; see section 2.3.6). Furthermore, by utilizing the measured BET surface

Table 1: Model parameters and residual standard error (RSE) for the adsorption of catechin, TA, NR-NOM, HA and CPC onto various NPs **in H₂O**. K_L in units of $[L \cdot (mmol \ C)^{-1}]$, q_m in $[\mu mol \ C \cdot m^{-2}]$ and K_F in $[\mu mol \ C \cdot m^{-2} \cdot (L \cdot (mmol \ C)^{-1})^{1/n}]$. RSE and n are dimensionless.

Adsorbate	Adsorbent	Langmuir			Freundlich			
		K∟	q m	RSE	Κ _F	n	RSE	
Catechin	CuO	22.5 ± 23.3	18.0 ± 2.8	3.4	18.2 ± 1.0	6.1 ± 1.3	1.4	
	CeO ₂	2.3 ± 0.8	56.5 ± 7.8	2.7	41.2 ± 1.3	1.9 ± 0.2	1.8	
Tannic acid	CuO	24.1 ± 5.0	83.0 ± 3.2	5.0	84.4 ± 7.5	4.5 ± 1.2	13	
	CeO ₂	8.9 ± 5.5	64.3 ± 8.9	8.2	58.2 ± 4.7	5.0 ± 1.7	7.6	
NR-NOM	CuO	11.2 ± 3.6	24.0 ± 2.6	1.5	32.6 ± 6.5	2.2 ± 0.6	2.7	
Humic acid	CeO ₂	9.0 ± 4.8	44.1 ± 6.7	4.5	44.9 ± 2.8	3.3 ± 0.5	2.5	
CPC	CeO ₂	No adsorption			No adsorpt	ion		
	SiO ₂	0.3 ± 1.6	37.4 ± 7.0	3.5	10.7 ± 1.3	2.4 ± 0.3	1.9	

Table 2: Model parameters and residual standard error (RSE) for the adsorption of catechin, TA, NR-NOM, HA and CPC onto various NPs in **OECD medium**. K_L in units of $[L \cdot (mmol \ C)^{-1}]$, q_m in $[\mu mol \ C \cdot m^{-2}]$ and K_F in $[\mu mol \ C \cdot m^{-2} \cdot (L \cdot (mmol \ C)^{-1})^{1/n}]$. RSE and n are dimensionless.

Adsorbate	Adsorbent	Langmuir			Freundlich			
		ΚL	q _m	RSE	KF	n	RSE	
Catechin	CuO	3.0 ± 1.5	13.3 ±1.5	2.3	9.0 ± 0.9	3.5 ± 1.2	3.0	
	CeO ₂	53.9 ± 65.8	32.3 ± 2.6	4.0	32.8 ± 2.2	11.3 ± 8.5	3.6	
Tannic acid	CuO	0.4 ± 0.1	349 ± 34	15	96.2 ± 8.5	1.7 ± 0.2	23	
	CeO ₂	0.3 ± 0.2	105 ± 72	3.9	20.2 ± 2.2	1.2 ± 0.3	4.3	
NR-NOM	CuO	2.1 ± 1.1	11.2 ± 2.4	0.9	7.8 ± 0.7	1.9 ± 0.5	1.2	
Humic acid	CeO ₂	19.5 ± 17.2	114 ± 25	23	127 ± 18	4.2 ± 1.2	15	
CPC	CeO ₂	3.7 ± 2.1	80.5 ± 11.5	8.7	62.0 ± 2.5	3.1 ± 0.7	5.8	
	SiO ₂	0.5 ± 0.3	120 ± 41	8.6	39.8 ± 4.1	2.0 ± 0.4	6.8	



Fig.2: Sorption isotherms of biomolecules (Langmuir = solid line, BET = dashed line) on NPs for catechin, tannic acid and NR-NOM (respectively humic acid and cetylpyridinium chloride) for **A.** CuO-NP in MilliQ water; **B.** CuO-NP in OECD 301 F medium; **C.** CeO₂-NP in MilliQ water; **D.** CeO₂-NP in OECD 301 F medium. **E.** Sorption isotherms of cetylpyridinium chloride on SiO₂-NP in MilliQ water and OECD 301 F medium.

 $(m^2 g^{-1})$ and the mass of NPs used $(g L^{-1})$, the concentration can be recalculated into moles of carbon per square meter of NP surface area (mol C m⁻²). This allows the comparison of corona formation between different NPs and biomolecules. Values of the maximum monolayer coverage capacity q_m in units of mg C g⁻¹ are shown in Table S4 in the supporting information.

Metal oxides have a positive zeta potential in MilliQ water at pH 7.5–8.0 ranging from 27 ± 4 to 44 ± 9 mV for CuO- and CeO₂-NPs, respectively. Suggesting

electrostatic interactions with negatively charged model substances will be favourable. At the same pH range in the OECD 301 medium, the CuO- and CeO₂-NPs show a negative zeta potential of -21 ± 2 and -18 ± 2 mV resulting from the adsorption of ions (see section 3.4.1 for more details on the nanoparticle characterisation). Compared to ultrapure water, the OECD medium, simulating wastewater, contains different single and multivalent cations and anions with a total ionic strength of 21.5 mM. In addition to electrostatic interactions, this can lead to the formation of ion bridges between two equally charged surfaces with the help of a multivalent ion, enabling the formation of a multilayer biomolecule corona.

The surface saturation (q_m) of catechin on CuO-NP (Figures 2A–B) in MilliQ water ($18 \pm 3 \mu$ mol C m⁻²) and in OECD 301 medium ($13 \pm 2 \mu$ mol C m⁻²) is similar to the maximum adsorption of NR-NOM in both media ($24 \pm 3 \mu$ mol C m⁻² and $11 \pm 2 \mu$ mol C m⁻², respectively) despite the fact, that NPs carry vastly different charge in these two media. This suggests that biomolecule-NPs interactions in that case are rather hydrophobicity driven. Tannic acid on the other hand adsorbed to higher extend compared to catechin and NR-NOM. Here, the surface saturation of tannic acid on CuO-NP in OECD medium ($349 \pm 34 \mu$ mol C m⁻²) is much higher compared to pristine water ($83 \pm 3 \mu$ mol C m⁻²). This suggests that cations present in OECD medium – driven by entropic effects – facilitate sorption of tannic acid. Interactions of cations with phenolic groups of tannic acid, especially chelation with Cu²⁺ and Ca²⁺/Mg²⁺, might lead to electrostatic interactions and the formation of cation bridges which are favourable for further adsorption.

Such a large influence of the medium on the adsorption of tannic acid could not be observed with CeO₂-NP (Figures 2C–D) and the surface coverage was generally lower than for CuO-NPs. A surface saturation of $64 \pm 9 \mu$ mol C m⁻² in MilliQ water and 105 ± 72 µmol C m⁻² in OECD 301 medium was determined for the tannic acid adsorption on CeO₂-NP. Unlike CuO-NP, CeO₂-NPs are chemically more stable and do not dissolve easily, which offers lower possibility of inner sphere complex formation (direct bonds between metal and biomolecules).⁴⁴ Furthermore, a surface saturation of 57 ± 8 µmol C m⁻² and 44 ± 7 µmol C m⁻² in MilliQ water as well as 32 ± 3 µmol C m⁻² and 114 ± 25 µmol C m⁻² in OECD 301 medium were determined for catechin and humic acid on CeO₂-NP, respectively. In OECD 301 medium, catechin adsorbs less compared to MilliQ water, as did tannic acid, due to electrostatic repulsion and competition for the sorption sites with the dissolved ions. This shows that adsorption of catechin and tannic acid in pure water mainly depends on the specific electrostatic interactions between the test substance and surface sites of the nanoparticles. In comparison, humic acid showed higher affinity to CeO_2 -NPs in OECD medium than in MilliQ water. Humic acid has higher molecular weight and more hydrophobic character than catechin or tannic acid. This might be the reason of its higher affinity to CeO_2 -NPs in OECD medium. With increasing ionic strength, the electric double layer around the NPs is compressed and the attractive van der Waals (vdW) forces become greater than electrostatic repulsion resulting in a higher NP surface adsorption of humic acid in OECD 301 medium. Additionally, the possibility of formation of bridges between the NPs surface and humic acid by the multivalent cations present in OECD medium might further enhance adsorption. The latter mechanism seems to be the dominant one as humic acid showed rather low affinity to CeO_2 -NPs in MilliQ water where low amount of cations are present.

As proof of principle, we analysed the interaction of CPC, a positively charged model substance, with CeO₂- and SiO₂-NPs. As expected, no adsorption in MilliQ water was observed due to electric repulsion between the equally charged surface of CeO₂-NPs and the test substance CPC (data not shown). On the contrary, we found quite good adsorption of CPC to CeO₂-NP in OECD 301 medium (81 ± 12 μ g C m⁻²; Figure 2D), which was probably charge driven. In comparison, CPC on SiO₂-NP (Figure 2E) showed a surface saturation of 37 ± 7 μ g C m⁻² in pure water and 120 ± 41 μ g C m⁻² in OECD 301 medium. This is most probably due to the fact that SiO₂-NPs have a very low isoelectric point (pH ≈ 2), meaning that they are negatively charged above that pH.⁴⁵ The adsorption was in accordance with the BET model of multilayer adsorption. No adsorption of catechin, humic acid or tannic acid was found on SiO₂-NP in both media as they are equally charged (electric repulsion) under environmental conditions (data not shown).

Looking at the adsorption of the selected model substances on CuO- and CeO₂-NPs, they behave similarly in MilliQ water and OECD 301 medium (standardized to C) with the exception of humic and tannic acid. There are two main reasons for their behaviour: the ions dissolved in the OECD 301 medium increase the molecular interactions between model substance and NPs. Especially high affinity of tannic acid to CuO can be attributed to the formation of stable innersphere Cu²⁺ complexes with highly abundant O-diphenyl groups of the tannic acid.⁴⁶ The knowledge gained on the adsorption behaviour of the model substances is used for biological degradation studies. With the information on the amount of model

substance adsorbed on the nanoparticle surface, comparable amounts of freely available and surface-bound test substance can be compared in the degradation test.

3.3 Characterization of NPs

3.3.1 DLS and Zeta potential. Pristine as well as NPs pre-treated with the model substances catechin, tannic acid and NR-NOM (humic acid and CPC in case of CeO₂- and SiO₂-NP) have been tested towards their colloidal stability in MilliQ water and OECD 301 medium (Tables 3, 4 and 5) based on the OECD test guideline 318 and the guidance document for testing and interpretation of data on dissolution rate and dispersion stability of nanomaterials (OECD, Draft December 2019)^{47,48} on two subsequent days. The dispersion stability measured without biomolecules determines the homoagglomeration of NPs. It is mainly influenced by the particle molar concentration and ionic strength whereas heteroagglomeration will be more relevant in presence of particulate organic matter and bacteria in biodegradation studies. With this test system, a statement on the agglomeration behaviour can be made in a relatively short period of time, since the examined homoagglomeration takes place within a few hours. For this reason, only a period of 2 d was considered instead of the complete duration of 28 d of the degradation studies. As expected, our investigation indicated that the colloidal stability of pristine CuO and CeO₂ in MilliQ water is higher compared

		Parameter in MilliQ water				Parameter in OECD 301 F medium					
Biomole- cule	Time [d]	<i>d</i> (distri- bution size) [nm]	PI	<i>z</i> [mV]	рН	<i>d</i> (distri- bution size) [nm]	PI	<i>z</i> [mV]	рН		
pristine	0	819 ± 454	0.337	27.2 ± 3.8	8.1	2685 ± 726	0.578	- 21.3 ± 1.9	7.9		
	1	641 ± 249	0.286	25.7 ± 3.4	7.6	2453 ± 276	0.490	- 23.3 ± 1.1	7.9		
	2	697 ± 276	0.317	26.7 ± 2.4	7.9	2703 ± 425	0.455	- 26.6 ± 2.1	7.8		
Catechin	0	526 ± 63	0.252	- 40.7 ± 0.9	8.4	566 ± 42	0.280	- 26.6 ± 0.4	7.7		
	1	552 ± 99	0.269	- 34.3 ± 1.1	7.6	549 ± 26	0.285	- 30.4 ± 0.6	7.7		
	2	544 ± 92	0.253	- 35.4 ± 0.9	7.8	574 ± 34	0.284	- 33.3 ± 0.5	7.7		
Tannic	0	1618 ± 147	0.456	- 39.9 ± 0.4	7.8	1534 ± 94	0.618	- 36.3 ± 0.7	7.5		
acid	1	1934 ± 135	0.493	- 34.6 ± 0.9	7.7	1761 ± 154	0.605	- 33.3 ± 0.3	7.5		
	2	1893 ± 187	0.491	- 31.5 ± 1.1	7.3	1682 ± 109	0.562	- 33.3 ± 0.8	7.5		
NR-NOM	0	1062 ± 168	0.411	- 42.8 ± 3.3	7.7	421 ± 85	0.253	- 31.3 ± 0.4	7.7		
	1	920 ± 131	0.359	- 41.4 ± 2.0	7.6	434 ± 28	0.255	- 29.9 ± 0.8	7.7		
	2	892 ± 107	0.353	- 37.3 ± 1.7	7.5	435 ± 67	0.254	- 32.0 ± 0.5	7.7		

Table 3: Hydrodynamic diameter *d*, polydispersity index PI, zeta potential *z* and pH-value of CuO-NP dispersed in MilliQ water and OECD 301 F medium measured over a period of 2 days.

		Parameter	in Milli	Q water		Parameter in OECD 301 F medium					
Biomole- cule	Time [d]	<i>d</i> (distri- bution size) [nm]	PI	<i>z</i> [mV]	рН	<i>d</i> (distri- bution size) [nm]	PI	<i>z</i> [mV]	рН		
pristine	0	234 ± 2	0.247	43.9 ± 8.8	7.7	1656 ± 206	0.323	- 18.3 ± 1.8	7.6		
	1	261 ± 31	0.232	41.7 ± 11.2	7.7	1899 ± 204	0.368	- 17.9 ± 2.5	7.6		
	2	272 ± 18	0.248	41.0 ± 11.8	7.5	1919 ± 304	0.383	- 17.4 ± 3.5	7.7		
Catechin	0	819 ± 503	0.253	- 24.2 ± 8.3	7.9	1700 ± 32	0.365	- 20.8 ± 0.6	7.6		
	1	522 ± 304	0.221	- 29.9 ± 5.0	7.9	1868 ± 29	0.395	- 22.6 ± 2.5	7.6		
	2	421 ± 223	0.228	- 31.6 ± 0.9	7.7	1945 ± 75	0.376	- 22.6 ± 2.7	7.7		
Tannic	0	215 ± 10	0.213	- 47.6 ± 1.0	7.8	289 ± 50	0.247	- 33.0 ± 2.6	7.7		
acid	1	243 ± 20	0.224	- 55.1 ± 19.3	7.5	381 ± 104	0.238	- 35.0 ± 2.7	7.6		
	2	237 ± 13	0.236	- 44.8 ± 3.1	7.5	400 ± 97	0.244	- 34.0 ± 2.0	7.6		
Humic	0	223 ± 8	0.222	- 51.9 ± 0.7	8.6	214 ± 9	0.230	- 37.7 ± 1.3	7.8		
acid	1	239 ± 6	0.249	- 49.5 ± 2.2	8.3	217 ± 12	0.221	- 36.3 ± 0.9	7.7		
	2	230 ± 26	0.206	- 47.9 ± 2.4	8.4	214 ± 6	0.221	- 38.0 ± 0.8	7.7		
CPC	0	216 ± 1	0.218	43.2 ± 5.0	7.7	1919 ± 35	0.404	- 8.1 ± 1.5	7.7		
	1	228 ± 16	0.228	40.5 ± 1.2	7.8	2337 ± 34	0.466	- 5.4 ± 2.5	7.6		
	2	235 ± 10	0.238	40.4 ± 1.2	7.9	2101 ± 46	0.425	- 2.1 ± 1.5	7.6		

Table 4: Hydrodynamic diameter *d*, polydispersity index PI, zeta potential *z* and pH-value of CeO₂-NP dispersed in MilliQ water and OECD 301 F medium measured over a period of 2 days.

Table 5: Hydrodynamic diameter *d*, polydispersity index PI, zeta potential *z* and pH-value of SiO₂-NP dispersed in MilliQ water and OECD 301 F medium measured over a period of 2 days.

		Parameter	in MilliO	Q water	Parameter in OECD 301 F medium				
Biomole- cule	Time [d]	<i>d</i> (distri- bution size) [nm]	PI	z [mV]	рН	d (distri- bution size) [nm]	PI	<i>z</i> [mV]	рН
pristine	0	46 ± 1	0.235	- 52.0 ± 4.2	8.7	112 ± 67	0.222	- 32.1 ± 1.0	7.7
	1	46 ± 3	0.224	- 53.9 ± 8.1	8.6	250 ± 172	0.217	- 33.6 ± 1.1	7.8
	2	46 ± 4	0.234	- 53.2 ± 7.6	8.2	195 ± 67	0.204	- 32.7 ± 0.7	7.7
Catechin	0	46 ± 3	0.218	- 50.6 ± 9.2	8.6	189 ± 247	0.228	- 30.4 ± 0.4	7.8
	1	44 ± 1	0.210	- 45.5 ± 10.9	8.1	163 ± 201	0.235	- 31.5 ± 2.8	7.8
	2	50 ± 10	0.246	- 46.1 ± 5.1	7.8	124 ± 139	0.224	- 31.0 ± 1.6	7.8
Tannic	0	45 ± 1	0.202	- 43.9 ± 2.2	8.5	456 ± 183	0.248	- 31.9 ± 1.6	7.7
acid	1	44 ± 3	0.225	- 47.8 ± 5.1	7.8	228 ± 211	0.274	- 32.7 ± 2.4	7.7
	2	43 ± 1	0.196	- 41.9 ± 5.8	7.7	307 ± 182	0.216	- 31.5 ± 2.8	7.6
Humic	0	60 ± 2	0.226	- 46.4 ± 4.2	8.9	64 ± 6	0.202	- 33.9 ± 2.9	7.9
acid	1	74 ± 13	0.177	- 49.2 ± 2.0	8.5	68 ± 11	0.158	- 36.6 ± 1.6	7.8
	2	62 ± 10	0.220	- 52.3 ± 2.7	8.4	57 ± 3	0.173	- 35.7 ± 2.2	7.8
CPC	0	256 ± 125	0.208	- 39.4 ± 3.9	8.5	3107 ± 889	0.794	- 32.7 ± 1.3	7.8
	1	337 ± 223	0.235	- 33.7 ± 2.1	8.0	11393 ± 3117	1.871	- 30.0 ± 1.0	7.7
	2	287 ± 64	0.157	- 32.6 ± 1.4	8.0	9209 ± 749	1.279	- 30.6 ± 1.8	7.7

to OECD 301 medium, most probably due to the higher ionic strength and especially the presence of multivalent ions in the latter.

DLS measurements showed that after incubation for 2 days the CuO-NPs hydrodynamic diameter (d) in MilliQ water was about 800 nm in size and had a positive zeta potential of 27 mV (Table 3). Due to the formation of model substance corona the zeta potentials

in water change into the negative (for all the same at around – 40 mV), but their diameter differs. CuO-NPs in presence of catechin show a smaller size (540 nm) compared to tannic acid (1800 nm) or NR-NOM (950 nm). Unlike the other model substances, catechin is expected to show only one negative charge around pH 8 – 9 since the first pK_a value is 8.7^{49} (hydroxyl function of the catechol moiety). The surface-bound catechins do not undergo any further electrostatic interactions with themselves or other NPs, leading to an improved colloidal stability and a reduced agglomeration (smaller NPs diameter). The other model substances are more likely to have multiple charges. Usually phenolic groups have a pK_a of around 10 but their protons are displaced at much lower pH (5 – 8) in presence of metal ions like Cu²⁺ or Fe^{3+,50} Carboxyl and phenolic groups contribute most to the surface charge and reactivity of NR-NOM or humic acid, having a pK_a value close to 4 and 8 for protonation of –COOH or phenolate functional groups respectively.⁵¹ Overall, the test substances treated NPs behaved similar on the start and end point of the measurement and there was little change in zeta potential and hydrodynamic diameter among different test days of the CuO-NPs in water.

Already pristine CuO-NPs show a negative zeta potential in the OECD 301 medium because of interactions with chloride, sulfate or phosphate anions. The uncoated CuO-NP have a larger hydrodynamic diameter (≈ 2600 nm) compared to diluted dispersion in water (≈ 800 nm) as shown in Table 3, which indicates a reduced colloidal stability. According to the Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory, the ionic strength strongly affects the colloidal stability and surface charge of NP dispersions.⁵² As the ionic strength (21.5 mM) of the OECD 301 F medium compared to MilliQ water is higher, particle repulsion is weaker and the probability of contact between particles rises. CuO-NPs with catechin and tannic acid corona however have hydrodynamic diameter of about 550 nm and 1700 nm respectively regardless of whether they were surrounded by water or OECD 301 medium. The favoured copper ion complexation with catechin⁵⁰ might induce biomolecule surface adsorption to CuO, whereas agglomeration with tannic acid was due to cation bridging or electrostatic interactions.⁵³ NR-NOM treated CuO-NPs were about half the size in OECD 301 medium (≈ 430 nm) as in water (≈ 900 nm), which can be explained by the stabilizing properties of NOM substances.^{54,55} Again, no significant change in hydrodynamic diameter and zeta potential could be observed over the time frame of two days for CuO-NPs in OECD 301 medium.

A similar behaviour could be found for CeO₂-NPs with the data shown in Table 4: Pristine particles are destabilized in OECD 301 medium according to DLVO theory (diameter increases from 250 nm to 1800 nm) and the positive zeta potential changes to negative (42 mV to – 18 mV). The formation of a tannic or humic acid corona with CeO₂-NPs has a rather stabilizing effect on the particle size. Hydrodynamic diameters of about 250 nm in MilliQ water as well as OECD 301 medium were found for CeO₂-NPs treated with tannic and humic acid. Only a slight increase in size (up to 400 nm) of the CeO2-NPs in OECD 301 medium containing tannic acid was observed over the investigated time frame of 2d. Especially in OECD medium CeO₂ underwent disaggregation following tannic and humic acid adsorption as evident by decrease of the size from 1900 nm to 400 nm and 214 nm, respectively. Although catechin had a stabilizing influence on CuO-NPs especially in OECD medium (Table 4), the same was not true for CeO₂-NPs. Adsorption of catechin did not influence the size of CeO₂-NPs in OECD medium and even increased the aggregate size in MilliQ water. Cetylpyridinium chloride (CPC) did not adsorb on CeO₂-NPs in water therefore there was no change in size or zeta potential of the NPs. Yet, CPC had considerable affinity to CeO₂-NPs in OECD medium accompanied by small increase in zeta potential (from -18 mV to -8 mV). Overall, no time dependency of the size and zeta potential for CeO₂-NPs was observed.

The results of the DLS and ELS experiments with SiO₂-NPs confirm the interaction potentials already mentioned (see Table 5). No change in size (< 100 nm) and zeta potential (\approx -50 mV) of SiO₂-NP in MilliQ water as well as in the presence of model substances except with CPC was observed. Due to the electrostatic interactions between the negatively charged SiO₂ and the positively charged pyridine group of CPC, a corona is formed increasing the hydrodynamic diameter to 300 nm and the zeta potential to -30 mV. In OECD 301 medium a slight increase in size (\approx 300 nm) and surface potential (\approx -30 mV) of the pristine SiO₂-NPs was observed. The SiO₂-NPs treated with CPC in OECD medium showed a polydispersity index of > 0.7 which indicates the formation of agglomerates of SiO₂-NPs with hydrodynamic diameters around 10000 nm, while the zeta potential still maintains a value of -30 mV. Large errors in diameters determined by DLS can arise because the measurements are based on the intensity of light scattered by particles in solution. Hence, when calculating the diameter, larger particles are weighted more strongly than smaller particles because the contribution of scattered light to the correlation function scales with r^6 (radius to the power of six). Light-scattering techniques such as DLS cannot detect individual particles which have been agglomerated. In these techniques, all agglomerates are therefore regarded as single particles, resulting in a larger calculated diameter.



Fig. 3: Dissolved copper content (NP concentration of 75.6 mg Cu L^{-1}) in supernatant obtained by centrifugation after dispersion for 0, 1 and 2 days in MilliQ water (blue) and OECD 301 F medium (red) for pristine CuO-NP and with catechin, tannic acid or NR-NOM corona.

3.3.2 Dissolution of NPs. Depending on their colloidal stability and the molecular interactions between biomolecule corona and NPs, a considerable amount of ions can be released, especially in the case of copper oxide.^{19,22} Particle dissolution is relevant to the question whether adsorbed corona molecules are biodegradable or not, since particle dissolution would be associated with the release of adsorbed molecules. To differentiate between possible biodegradation of surface adsorbed biomolecules and biomolecules released due to NP dissolution, AAS measurements were performed. CuO-NP (100 mg L⁻¹, approximate 75.6 mg Cu L⁻¹ including 5.4% water content determined as loss on drying) dissolution was evaluated in MilliQ water and OECD 301 F medium without any biomolecules and in presence of catechin, tannic acid and NR-NOM (Figure 3). Pristine CuO-NP had a dissolution rate of 1.8% (1.373 ± 0.045 mg Cu L⁻¹) in MilliQ water after 48 h which is in agreement with recent studies.^{56,57} A lower dissolution rate of 0.1% (0.087 \pm 0.004 mg Cu L⁻¹) was observed in OECD 301 F medium over 2 days, which can be attributed to the agglomerated state and therefore reduced surface area of the particles. Catechin increased the Cu²⁺-ion release on average to 2.8% (2.136 \pm 0.029 mg Cu L⁻¹) and 3.9% (2.939 \pm 0.171 mg Cu L⁻¹) for water and OECD 301 medium respectively through inducing chelation ions by the catechol groups.⁵⁸ Furthermore, only 0.9% of copper $(0.708 \pm 0.006 \text{ mg Cu } L^{-1})$ and 0.6% $(0.479 \pm 0.006 \text{ mg Cu } L^{-1})$ of the total amount of CuO-NPs in water and OECD medium with NR-NOM were dissolved. Compared to pristine CuO-NPs, the dissolution rate in OECD medium is higher

in the presence of NR-NOM, which can be attributed to the improved colloidal stability of the particles (see Table 3). Due to the NR-NOM biomolecule corona, unlike with pristine CuO-NPs, the NPs in OECD medium are smaller and retain high surface area, which supports the dissolution of NPs compared to an agglomerated state with small surface to volume ratio. The copper release due to TA in water is very similar (2.0% and 1.513 \pm 0.051 mg Cu L⁻¹) to pristine CuO-NP in MilliQ water. In contrast, in OECD 301 F medium containing TA dissolution rates of 17.5% (13.218 \pm 0.087 mg Cu L⁻¹) were obtained. This might be explained by much higher affinity of tannic acid to CuO-NPs in OECD medium. In addition, it was found that TA controls the redox activity of metal ions when used as capping agent.⁵⁹ This effect could even be enlarged if chloride is present⁶⁰ as this is the case in OECD 301 F medium. Together, this might explain the strong effect of this combination of ions and ligands on the solubility of CuO.

Due to the chemical stability of CeO_2 and SiO_2 it is assumed that no cerium and silicon ions are released under the selected conditions.⁴⁴

Furthermore, the differences between static laboratory tests and dynamic environmental systems must be taken into account. These include, for example, the need to test concentrations that are beyond the realism of the environment when it comes to making safety assessments for decision making and thus possibly achieving equilibrium concentrations compared to the environment before complete NP dissolution.

3.4 Biodegradability

This section deals with the potential biodegradability of free (dissolved) and NP adsorbed NOM model substances. A key factor in the microbial degradation of biomolecules is the physical accessibility of the substance. For NPs or large biomolecules, the pathways for cellular entry into microorganisms are insufficiently understood.⁶¹ In addition to the diffusion of small molecules through the membrane pores, endocytosis-like processes have been observed in which extracellular material is imported into the cells via the membrane transport system.^{62,63}

3.4.1 Effect of adsorption on biodegradability of biomolecules. Firstly, control experiments with uncoated CuO-/CeO₂-NPs and sodium benzoate showed that

CeO₂-NPs had no significant effect on the biodegradability of an easily degradable substance (Figure S3 in ESI). Whereas the presence of CuO-NPs slightly reduced the biodegradation of sodium benzoate, presumably by adsorption on the NP surface. Furthermore, free Cu²⁺ elongates the lag phase of biodegradation but does not affect the degradation extent of the microbial community, as shown in control experiments with sodium benzoate and high concentrations of Cu²⁺ (Figure S4 in ESI). The lag phase is prolonged because other bacterial strains less affected by copper ions probably had to grow up first. This shows that presence of NPs or ions released from CuO-NPs (dissolution of CeO₂-NP under test conditions is unlikely) did not have any negative impact on the microbial community.

Quantitative structure-activity relationship models (BIOWIN v.4.10, US Environmental Protection Agency Estimation Programs Interface Suite⁶⁴) predict biodegradability of catechin as well as CPC and that the chemical structure of tannic acid is readily biodegradable. No predictions could be made for humic acid and NR-NOM because they are mixtures of substances and only model structures are assumed. Furthermore, microbial conversion of humic acid and NR-NOM is unlikely under the selected laboratory conditions, since the biodegradation of the substances is likely an interplay of biotic and abiotic processes.

Dissolved catechin (Figures 4A and D) and tannic acid (Figures 4B and E) showed biodegradation of $49 \pm 7\%$ and $31 \pm 14\%$, respectively, after 18 days. Therefore, both biomolecules can be considered biodegradable, which corresponds to the BIOWIN predictions. Although they do not achieve biodegradation levels of 60% to be considered fully mineralizable (the rest of the carbon is assumed to be integrated into the biomass) according to the OECD 301 guideline. No significant biodegradation of NR-NOM and humic acid was found (Figures 4C and F). Moreover, no biodegradation of CPC was observed under selected conditions (Figure 4G), although BIOWIN predicts its biodegradability. Low CPC concentrations demonstrated rapid biodegradability, whereas concentrations > 3 mg L⁻¹, as chosen here based on adsorption data, showed large inhibitory effects according to Timmer et.al.⁶⁵

Furthermore, NP surface adsorption has no influence on the biodegradability of non-biodegradable model substances. In contrast, the biodegradability for the other test substances (catechin and tannic acid) adsorbed onto CuO- and CeO₂-NPs was smaller compared to free species as shown in Figures 4A, B, D and E. NP-bound catechin biodegrades to only about 10 \pm 3% (Figure 4A) and



Fig. 4: A–C. Biological degradation of catechin, tannic acid and NR-NOM in dissolved form (red circle) or adsorbed on the surface of CuO-NP (blue circle). **D–G.** Biological degradation of catechin, tannic acid, humic acid and cetylpyridinium chloride in dissolved form (red circle) or adsorbed on the surface of CeO₂-NP (blue circle).

 $24 \pm 10\%$ (Figure 4D) after 18 days for CuO- and CeO₂-NPs, respectively. Although the adsorption maximum of catechin on CeO₂-NPs is 2.5 times higher compared to CuO-NPs, a 2.5-fold biodegradation rate is observed in presence of CeO₂-NPs. The surface binding for catechin can take place via electrostatic and hydrophobic interactions, cation bridging or surface ion chelation of Cu²⁺ with the catechol group, stabilizing the CuO-NP.⁶⁶ In comparison, catechin will most likely not chelate Ce^{2+}/Ce^{3+} from the CeO₂-NP surface, which might lead to easier desorption and subsequent biodegradation of catechin. Given the lower biodegradation rate of catechin with CuO-NPs, one can expect that the dissolution of CuO and the resulting release of model substance is not the driving force of biodegradation here.

For surface bound tannic acid, degradation rates of $15 \pm 5\%$ (Figure 4B) and $8 \pm 11\%$ (Figure 4E) were determined after 18 days for CuO- and CeO₂-NPs, respectively. Even though tannic acid with CuO-NPs in OECD 301 medium has the highest adsorption and dissolution rate of all model substances investigated, the biodegradation rate is only approximately double that of CeO₂-NPs. The effect of the NP dissolution on the biodegradation of tannic acid is much lower than expected, which means that complete NP dissolution does not take place and the NPs are colloidally stabilized over time.

4 Conclusions

The stability and interactions of biomolecule coronas are important for defining the fate of NPs in the environment. Furthermore, the environmental media can be complex due to the presence of practically infinite number of different biomolecules and their different physicochemical properties. We have chosen model substances ranging from pure chemicals to more complex environmental isolates based on their structural similarity to NOM. Formation of a biomolecule corona with NOM model substances influences the colloidal stability of NPs under conditions (high ionic strength, pH changes, etc.) which have a major impact on particle behaviour. Adsorption depends on the properties of the nanomaterial as well as on the adsorbing biomolecule with respect to possible molecular interactions in the surrounding medium. Formation of corona was observed on CuO- and CeO₂-NPs with all biomolecules and was accompanied by decrease of zeta potential (in MilliQ water also reversal of zeta potential from positive to negative values). No adsorption of catechin, humic or tannic acid on SiO₂-NPs occurred due to the repulsion between the equally charged NP surface and the biomolecule. Tannic acid showed particularly high affinity to CuO-NPs in OECD 301 medium where it also decreased the aggregate size. Tannic acid also had a stabilizing effect on CeO2-NPs in both media despite lower surface coverage. Our investigations showed that small NOM model substance catechin increased colloidal stability of CuO-NPs but not CeO₂ which it destabilized or did not influence their stability. Meaning that colloidal stability of CuO compared to CeO₂ might be hydrophobicity driven. More complex environmental isolates stabilized CeO₂ (humic acid) and stabilized CuO in pure water or caused slight aggregation in OECD medium (NR-NOM). The formation of biomolecule coronas with different model substances and their effect on colloidal stability needs further investigation.

Taking into account the most environmentally realistic scenario, that is OECD 301 medium and humic acid or NR-NOM as biomolecules, stabilisation of NPs can be expected. Consequently, NPs and biomolecules would stay longer in the water phase and thus be more mobile, allowing them to travel further (exposure to aquatic organisms) before reaching their final sink (exposure to sediment organisms).

Cetylpyridinium chloride (CPC), as a model pollutant, interacted with SiO₂-NPs in both media causing their agglomeration (much more pronounced in OECD medium) – this can be explained by the fact that SiO₂-NPs were negatively charged in both media. CPC did not interact with CeO₂-NPs in MilliQ water (where the NPs are positively charged) while it had high affinity to this NPs in OECD 301 medium causing their destabilisation and decreasing the zeta potential.

Complex biomolecules – humic acid and NR-NOM – were not biodegraded, neither in freely dissolved nor in NPs-bound form. This is often assigned to their high molecular weight. The NOM model substances – catechin and tannic acid – were partially degraded under selected aerobic test conditions. The biodegradation was slower and reached lower extent when these biomolecules were present in NPs corona as compared to freely dissolved state. Biomolecules must be desorbed from the NP surface or the whole NP has to be absorbed by the microbe in order to biodegrade the biomolecules. This means that biomolecules are released by physicochemical processes such as NP dissolution or a thermodynamically or kinetically more stable equilibrium with other molecules/ions from the surrounding medium is achieved. The presence of catechin and tannic acid in combination with the high ionic strength of the OECD 301 biodegradation medium increased the dissolution of CuO-NPs 10- to 20-fold as compared to biomolecule free medium. CuO-NPs tend to partial dissolution leading to formation of Cu²⁺ complexes. The increasing adsorption of tannic acid also influences its effect as a solubilizer of CuO. Without coronas, many NPs would quickly lose their nanoparticulate properties under

environmental conditions due to agglomeration or dissolution. Depending on the environmental conditions at the release site, coating of NPs can affect particle behaviour, transport, or possible release of adsorbed substances and metal ions. Careful evaluation and interpretation of laboratory data is needed to transfer the generated knowledge on real environmental systems in order to predict the fate of nanomaterials.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dennis Neukirch, Elena Paustian and Tanja Wannmacher for performing some experiments in the context of student projects. This study was financially supported by the Hans-Böckler Foundation within the Graduate School for NanoCompetence and by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, funding code 03X0152, project "DENANA").

References

- 1 S. Laurent, S. Boutry and R. N. Muller, in *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications*, Elsevier, 2018, pp. 3–42.
- 2 F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger and B. Nowack, *J. Nanoparticle Res.*, 2012, 14, 1109.
- 3 A. Hernández Battez, R. González, J. L. Viesca, J. E. Fernández, J. M. Díaz Fernández, A. Machado, R. Chou and J. Riba, *Wear*, 2008, **265**, 422–428.
- 4 F. Perreault, A. Oukarroum, S. P. Melegari, W. G. Matias and R. Popovic, *Chemosphere*, 2012, **87**, 1388–1394.
- 5 C. Paquet, R. James, A. J. Kell, O. Mozenson, J. Ferrigno, S. Lafrenière and P. R. L. Malenfant, *Org. Electron.*, 2014, **15**, 1836–1842.
- 6 G. Ren, D. Hu, E. W. C. Cheng, M. a Vargas-Reus, P. Reip and R. P. Allaker, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2009, **33**, 587–590.
- K. Delgado, R. Quijada, R. Palma and H. Palza, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2011, 53, 50–54.
- 8 R. Dastjerdi and M. Montazer, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2010, **79**, 5–18.
- 9 B. Derjaguin and L. Landau, *Prog. Surf. Sci.*, 1993, **43**, 30–59.
- 10 R. D. Handy, F. von der Kammer, J. R. Lead, M. Hassellöv, R. Owen and M. Crane, *Ecotoxicology*, 2008, **17**, 287–314.

- 11 M. Smith, M. McKeague and M. C. DeRosa, *MethodsX*, 2019, **6**, 333–354.
- 12 A. Sood, V. Arora, J. Shah, R. K. Kotnala and T. K. Jain, *Mater. Sci. Eng. C*, 2017, **80**, 274–281.
- 13 A. Guerrero-Martínez, J. Pérez-Juste and L. M. Liz-Marzán, *Adv. Mater.*, 2010, **22**, 1182–1195.
- 14 R. Y. Hong, B. Feng, L. L. Chen, G. H. Liu, H. Z. Li, Y. Zheng and D. G. Wei, *Biochem. Eng. J.*, 2008, **42**, 290–300.
- 15 M. G. Soliman, B. Pelaz, W. J. Parak and P. del Pino, *Chem. Mater.*, 2015, **27**, 990–997.
- 16 C. Lemarchand, R. Gref and P. Couvreur, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, **58**, 327–341.
- 17 M. C. Surette and J. A. Nason, *Environ. Sci. Nano*, 2019, **6**, 540–553.
- 18 D. Docter, D. Westmeier, M. Markiewicz, S. Stolte, S. K. Knauer and R. H. Stauber, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 1–3.
- 19 M. Markiewicz, J. Kumirska, I. Lynch, M. Matzke, J. Köser, S. Bemowsky, D. Docter, R. Stauber, D. Westmeier and S. Stolte, *Green Chem.*, 2018, **20**, 4133–4168.
- 20 J. Zhang, W. Guo, Q. Li, Z. Wang and S. Liu, *Environ. Sci. Nano*, 2018, **5**, 2482–2499.
- 21 A. A. Keller, H. Wang, D. Zhou, H. S. Lenihan, G. Cherr, B. J. Cardinale, R. Miller and Z. Ji, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44, 1962–7.
- 22 H. Naatz, B. B. Manshian, C. Rios Luci, V. Tsikourkitoudi, Y. Deligiannakis, J. Birkenstock, S. Pokhrel, L. Mädler and S. J. Soenen, *Angew. Chemie*, 2020, **132**, 1844–1852.
- 23 X. Liu, M. Wazne, T. Chou, R. Xiao and S. Xu, Water Res., 2011, 45, 105–12.
- 24 C. M. Park, K. H. Chu, N. Her, M. Jang, M. Baalousha, J. Heo and Y. Yoon, *Sep. Purif. Rev.*, 2017, **46**, 255–272.
- 25 K. Gromadzka, A. Waśkiewicz, P. Goliński and J. Świetlik, *Water Res.*, 2009, **43**, 1051–1059.
- 26 A. Nebbioso and A. Piccolo, Anal. Bioanal. Chem., 2013, 405, 109–124.
- 27 B. J. R. Thio, D. Zhou and A. a Keller, J. Hazard. Mater., 2011, 189, 556–63.
- 28 T. Xia, M. Kovochich, M. Liong, L. Mädler, B. Gilbert, H. Shi, J. I. Yeh, J. I. Zink and A. E. Nel, *ACS Nano*, 2008, **2**, 2121–2134.
- 29 I. Blinova, A. Ivask, M. Heinlaan, M. Mortimer and A. Kahru, *Environ. Pollut.*, 2010, **158**, 41–47.
- 30 K. Van Hoecke, K. A. C. De Schamphelaere, P. Van der Meeren, G. Smagghe and C. R. Janssen, *Environ. Pollut.*, 2011, **159**, 970–976.
- 31 K. Yang, D. Lin and B. Xing, *Langmuir*, 2009, **25**, 3571–3576.
- 32 L. Mädler, H. K. Kammler, R. Mueller and S. E. Pratsinis, *J. Aerosol Sci.*, 2002, **33**, 369–389.

- H. Naatz, S. Lin, R. Li, W. Jiang, Z. Ji, C. H. Chang, J. Köser, J. Thöming, T. Xia, A. E. Nel, L. M\u00e4dler and S. Pokhrel, ACS Nano, 2017, 11, 501–515.
- 34 OECD, *Test No. 301: Ready Biodegradability*, OECD Publishing, 1992, vol. 301.
- 35 A. Othman, D. Andreescu, D. P. Karunaratne, S. V Babu and S. Andreescu, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 12893–12905.
- 36 L. Bravo, Nutr. Rev., 2009, 56, 317–333.
- I. V. Perminova, F. H. Frimmel, A. V. Kudryavtsev, N. A. Kulikova, G. Abbt-Braun,
 S. Hesse and V. S. Petrosyan, *Environ. Sci. Technol.*, 2003, 37, 2477–2485.
- 38 J. Song, W. Huang, P. Peng, B. Xiao and Y. Ma, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 2010, 74, 2013.
- 39 F. J. Stevenson, *Humus chemistry: genesis, composition, reactions, John Wiley & Sons, 1994.*
- 40 L. N. Nguyen and S. Oh, Int. Biodeterior. Biodegradation, 2019, 137, 23–29.
- 41 T. Ivanković and J. Hrenović, Arch. Ind. Hyg. Toxicol., 2010, 61, 95–110.
- 42 J. N. Pendleton and B. F. Gilmore, Int. J. Antimicrob. Agents, 2015, 46, 131–139.
- 43 K. Shrivas and H.-F. Wu, J. Mass Spectrom., 2007, 42, 1637–1644.
- 44 J. T. Dahle, K. Livi and Y. Arai, *Chemosphere*, 2015, **119**, 1365–1371.
- 45 M. Kosmulski, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2009, **152**, 14–25.
- 46 M. Baalousha, K. Afshinnia and L. Guo, *Environ. Sci. Nano*, 2018, 5, 868–881.
- 47 F. Abdolahpur Monikh, A. Praetorius, A. Schmid, P. Kozin, B. Meisterjahn, E. Makarova, T. Hofmann and F. von der Kammer, *NanoImpact*, 2018, **11**, 42–50.
- 48 OECD, Guidance Document for the testing and interpretation of data on dissolution rate and dispersion stability of nanomaterials for effects and exposure assessment -Draft (December 2019), Paris, 2019.
- 49 J. M. Herrero-Martínez, M. Sanmartin, M. Rosés, E. Bosch and C. Ràfols, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 1886–1895.
- 50 R. C. Hider, Z. D. Liu and H. H. Khodr, in *Methods in Enzymology*, 2001, vol. 335, pp. 190–203.
- 51 E. A. Ghabbour and G. Davies, *Humic substances: structures, models and functions*, Royal Society of Chemistry, 2007.
- 52 M. Pavlin and V. B. Bregar, *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, 2012, 7, 1389–1400.
- 53 J. Zhao, Y. Liu, B. Pan, G. Gao, Y. Liu, S. Liu, N. Liang, D. Zhou, M. G. Vijver and W. J. G. M. Peijnenburg, *Water Res.*, 2017, **127**, 59–67.
- 54 P. J. Harbour, D. R. Dixon and P. J. Scales, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2007, **295**, 38–48.
- 55 S. Assemi, P. G. Hartley, P. J. Scales and R. Beckett, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2004, **248**, 17–23.
- 56 S. Ortelli, A. L. Costa, M. Blosi, A. Brunelli, E. Badetti, A. Bonetto, D. Hristozov and A. Marcomini, *Environ. Sci. Nano*, 2017, 4, 1264–1272.

- 57 Z. Wang, L. Zhang, J. Zhao and B. Xing, *Environ. Sci. Nano*, 2016, **3**, 240–255.
- 58 L. Mira, M. Tereza Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M. Helena Florêncio and K. R. Jennings, *Free Radic. Res.*, 2002, **36**, 1199–1208.
- 59 A. L. Suherman, G. Zampardi, H. M. A. Amin, N. P. Young and R. G. Compton, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2019, **21**, 4444–4451.
- 60 G. Zampardi, J. Thöming, H. Naatz, H. M. A. Amin, S. Pokhrel, L. Mädler and R. G. Compton, *Small*, 2018, 14, 1801765.
- S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon,
 S. Mahendra, M. J. McLaughlin and J. R. Lead, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2008, 27, 1825.
- 62 A. Kumar, A. K. Pandey, S. S. Singh, R. Shanker and A. Dhawan, *Chemosphere*, 2011, **83**, 1124–1132.
- 63 J. A. Fuerst and E. Sagulenko, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 2014, **1843**, 1732–1738.
- 64 US EPA, 2018.
- 65 N. Timmer, D. Gore, D. Sanders, T. Gouin and S. T. J. Droge, *Ecotoxicol. Environ*. *Saf.*, 2019, **182**, 109417.
- 66 E. J. BROWN, H. KHODR, C. R. HIDER and C. A. RICE-EVANS, *Biochem. J.*, 1998, **330**, 1173–1178.

3. Zusammenfassende Diskussion

3.1 Einflüsse auf die Entstehung einer Biomolekül-Corona und deren Bedeutung für Metalloxid-Nanopartikel

Nicht nur die Vielfalt unterschiedlicher Nanomaterialien sorgt aufgrund ihrer abweichenden Materialeigenschaften für die voneinander Komplexität in Untersuchungen zum Verhalten von Nanopartikeln. Die in Kapitel 2.1 (Unterkapitel 10) beschriebenen Konsequenzen und Herausforderungen die Gestaltung an umweltfreundlicher Nanomaterialien liegen in einer variablen natürlichen Umgebung. In die Umwelt eintretende Nanomaterialien werden durch die Adsorption ubiquitär vorhandener organischer Materie beeinflusst und verändern ihren chemischen Charakter. Reine Nanopartikel (NP) haben aufgrund ihrer hohen Oberflächenenergie ein großes Interaktionspotential mit Makromolekülen der Umgebung; es kommt zu einer spontanen Wechselwirkung zwischen Nanomaterial und Komponenten der Umweltmatrix. Die in der Umwelt vorzufindende natürliche organische Materie (NOM) stellt eine komplexe Mischung organischer Substanzen dar, welche ihren Ursprung im Zersetzungsprozess von Biomasse (beispielsweise Lignin und Zellulose) oder Ausscheidungsprodukten von Organismen hat (Hayes & Swift, 2020). Analog zur Ausbildung einer Protein-Corona sorgt die Adsorption von NOM für eine schwer charakterisierbare heterogene Schicht aus Makromolekülen auf der Oberfläche von Nanomaterialien. Diese sogenannte Makromolekül-Corona interagiert primär mit der Umgebung und kann die biophysikalischen Eigenschaften der Nanopartikel verändern. Sie trägt damit einen großen Teil zur bio- und ökologischen Identität der Partikel bei und hat Einfluss auf das Verhalten sowie den Verbleib der Nanomaterialien (Arvidsson, Hansen, & Baun, 2020; Corsi, Bergami, & Grassi, 2020; Markiewicz et al., 2018; Walkey et al., 2014).

Um ein Verständnis für die Formierung einer NP-Corona sowie deren unterschiedliche Wechselwirkungspotentiale zu erlangen, können die Einflüsse des Adsorbats und Adsorbens betrachtet werden. Die in den Kapiteln 2.2 (Bemowsky et al., 2019) und 2.3 beschriebenen Daten sollen helfen, dieses Verständnis weiter zu entwickeln. Adsorbierte heterogene Schichten unterscheiden sich hierbei zu den während der Herstellung der Nanopartikel applizierten homogenen Coatings. Die Adsorption von NOM an Nanopartikeloberflächen ist dabei abhängig von verschiedenen inter- und intramolekularen Wechselwirkungen, wie beispielsweise den Van-der-Waals- sowie Coulomb-Kräften (Kapitel 2.1, Unterkapitel 6). Interaktionen der Biomoleküle und NPs führen zur Änderung des Oberflächenpotentials und der Partikelgröße, welche Einfluss auf das Verhalten sowie das Schicksal der NPs haben. Sind die interagierenden Biomoleküle ungeladen oder zwitterionisch und groß, so können diese auf der Nanopartikeloberfläche adsorbieren und das Nanomaterial sterisch stabilisieren (Zhiqiang Li, Greden, Alvarez, Gregory, & Lowry, 2010). Eine potenzielle Stabilisierung von NPs durch Interaktion mit NOM kann neben elektrostatischen Abstoßungskräften demnach auch über hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen. Wie in Kapitel 2.1 (Abbildung 3 - erstellt von Steve Bemowsky) dargestellt, kann eine Interaktion von Adsorbat und Adsorbens aber auch durch die Ausbildung von Brücken mittels mehrwertiger Ionen, die Komplexierung von Ionen der Nanopartikeloberfläche, den Austausch von Liganden oder die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen (Markiewicz et al., 2018). Im Fall der Metalloxid-NPs stabilisiert die Gegenwart von NOM durch Interaktionen zwischen Carboxylaten (-COO⁻) und den Hydroxylen der Nanopartikeloberfläche (Yu, Liu, Yin, & Shen, 2018). In Abhängigkeit der NOM-Konzentration können somit z.B. die Auswirkungen einer hohen Ionenstärke auf die kolloidale Stabilität reiner CuO- und CeO₂-NPs gemildert werden (Zhen Li et al., 2017; Peng et al., 2017). Ob es zum Schutz vor Agglomeration der NPs durch Adsorption von NOM kommt, ist aber überwiegend abhängig von dem Interaktionspotential, also der Zusammensetzung der NOM und den vorliegenden Ionen im Medium, da die Brückenbildung durch zweiwertige Ionen auch den gegenteiligen Effekt erzielen kann und die kolloidale Stabilität der NPs senkt (Maiga, Nyoni, Nkambule, Mamba, & Msagati, 2020).

Das Verhalten der NPs und die entsprechenden Adsorptionsmechanismen werden durch die Eigenschaften der Biomoleküle, Nanonomaterialien und des umgebenden Mediums beeinflusst. Dazu gehören neben physikochemischen Parametern der NPs Oberflächeneigenschaften, (Elementzusammensetzung, Partikelgröße) sowie Biomoleküle (funktionelle Gruppen, Hydrophobie, Polarität) auch Eigenschaften der umgebenden Matrix (Ionenstärke, pH-Wert) wie in Kapitel 2.1 in Abbildung 4 (Markiewicz et al., 2018, erstellt von Steve Bemowsky) verdeutlicht. Die adsorbierten Moleküle beeinflussen durch ihre Struktur und funktionellen Gruppen das NP-Verhalten, indem sie die Oberflächenladung, dargestellt durch das Zeta-Potential, und das Wechselwirkungspotential der NPs modifizieren. Speziell Metalle und Metalloxide mit leicht zu ionisierenden Oberflächen werden durch Änderungen im pH-Wert und die Anwesenheit von Ionen leicht beeinflusst. Abhängig vom isoelektrischen Punkt (IEP) des Nanomaterials kann sich die kolloidale Stabilität der Partikel durch variierende Zeta-Potentiale verändern. Der IEP von CuO liegt beispielsweise zwischen pH 8,5 – 10 (Sousa & Teixeira, 2013), von CeO₂ bei rund pH 8

(Quik et al., 2010) und von SiO₂ bei pH 2 (Kosmulski, 2009). Ab einem pH-Wert unterhalb des IEPs ist ein Stoff positiv geladen, wohingegen höhere Werte eine negative Ladung zur Folge haben. Nanomaterialien bei pH-Werten nahe dem IEP sind aufgrund fehlender elektrischer Abstoßungskräfte daher oftmals destabilisiert. Unter natürlichen Umweltbedingungen weisen CuO- und CeO₂-NPs im Gegensatz zu SiO₂-NPs eine positive Oberflächenladung auf. Prinzipiell gilt für die meisten Metall- und Metalloxide, dass bei niedrigeren pH-Werten das Zeta-Potential der NPs stärker positiv und somit die Adsorption von negativ geladenen Biomolekülen begünstigt ist. Der pH-Wert hat demnach einen maßgeblichen Einfluss auf die Ausbildung einer Biomolekül-Corona, wenn zu adsorbierende Substanzen einen ionischen Charakter aufweisen (Docter et al., 2015). In Gewässern mit einem durchschnittlichen pH-Wert von 6,5 – 8,5 (Nogueira et al., 2018) führt dies mitunter zur Reduktion der kolloidalen Stabilität von reinen CeO₂oder CuO-NPs (Dippon, Pabst, & Klitzke, 2018; Odzak, Kistler, Behra, & Sigg, 2014; Quik et al., 2010), weil der pH-Wert nahe dem IEP der NPs liegt und nur schwache elektrostatische Abstoßungskräfte zwischen den Partikeln vorherrschen. Die zur Verfügung stehende Nanopartikeloberfläche reduziert sich aufgrund der Agglomeration der NPs, wodurch die Ausbildung einer Biomolekül-Corona eingeschränkt und der Einfluss des Adsorbats auf das Verhalten der NPs verringert wird. Physikalische Kräfte übersteigen dann die Auswirkungen der potenziell stabilisierenden elektrostatischen

Eine hohe Ionenstärke reduziert in einer wässrigen Umgebung häufig ebenso die Metallund Metalloxid-NPs, kolloidale Stabilität von wenn diese eine Biomolekül-Corona vorweisen. Beispielsweise kann in natürlichen Gewässern beim Übergang von Flüssen über die Flussmündungen ins Meer die ansteigende Konzentration zweiwertiger Ionen wie Ca²⁺ und Mg²⁺ (Conway, Adeleye, Gardea-Torresdey, & Keller, 2015) zur Brückenbildung zwischen benachbarten NPs führen, sodass die von der adsorbierten NOM induzierte negative Ladung reduziert wird und es zur Destabilisierung durch Agglomeration kommt (Delay, Dolt, Woellhaf, Sembritzki, & Frimmel, 2011; Liu, Wazne, Chou, Xiao, & Xu, 2011). Dies bedeutet, dass ein Teil der in Gewässern freigesetzten Nanomaterialien langfristig die wässrige Phase verlässt und im Sediment wiederzufinden sein wird.

Wechselwirkungen und es kommt zur Sedimentation der NPs.

Neben der Änderung der Partikelgröße und des Interaktionspotentials von NPs kann adsorbierte NOM oder deren bloße Gegenwart auch Einfluss auf deren Auflösung haben (Kapitel 2.3, Abbildung 3 – erstellt von Steve Bemowsky). In wässrigen Lösungen können sich suspendierte Nanomaterialien in Abhängigkeit der physikochemischen Parameter der Umgebung auflösen, agglomerieren bzw. aggregieren und/oder in andere Spezies transformieren. Die Auflösung von NPs ist ein dynamischer Prozess, weshalb zu jedem Zeitpunkt unterschiedliche Anteile gelöster und partikulärer Nanomaterialien vorliegen können. Alle gebildeten Spezies können einen unterschiedlichen Effekt auf das System ausüben und damit das Verhalten sowie den Verbleib der NPs beeinflussen (Amde, Liu, Tan, & Bekana, 2017). Für CeO₂- und SiO₂-NP kann die Auflösung unter umweltnahen Bedingungen vernachlässigt werden. Beide Nanomaterialien sind in Wasser nur schwer löslich (Diedrich, Dybowska, Schott, Valsami-Jones, & Oelkers, 2012; Lv et al., 2020). Hingegen ist die Auflösung von CuO stark abhängig vom umgebenden Medium. In Abhängigkeit des pH-Wertes steigt die Auflösungsrate im sauren Milieu kleiner pH 5 schnell bis zur nahezu vollständigen Auflösung der Partikel an. Um pH 6 liegt eine Auflösungsrate von rund 10 % vor; mit ungefähr 1 % ist CuO bei neutralem und basischem pH-Wert nur geringfügig löslich (Khan et al., 2019).

Im Wesentlichen kann die Adsorption von NOM auf zwei verschiedene Arten die NP-Auflösung beeinflussen. Formen die Biomoleküle durch den Austausch von Liganden eine direkte Bindung mit dem Nanomaterial, so können die Metall-Sauerstoffbzw. Metall-Metall-Bindungen geschwächt werden. Dies hat eine signifikante Erhöhung der Auflösungsrate der NPs zur Folge (Mudunkotuwa, Pettibone, & Grassian, 2012). Werden die Biomoleküle hingegen über elektrostatische Wechselwirkungen oder schwache Wasserstoffbrückenbindungen gehalten, werden diese eine schützende NP-Corona formen und die kolloidale Stabilität der NPs verbessern (Setyawati, Zhao, & Ng, 2020). Beispielsweise werden CeO₂- (Quik et al., 2010) und CuO-NPs (Sousa & Teixeira, 2013) aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit NOM eher stabilisiert als SiO₂-NPs, deren negatives Zeta-Potential die Interaktion mit NOM hemmt (Zhang, Chen, Westerhoff, & Crittenden, 2009).

Für die Ausbildung einer Corona ist neben dem Gleichgewicht zwischen den Makromolekülen und der Nanopartikeloberfläche ebenso die Dauer der Interaktion zwischen Biomolekül und Nanomaterial relevant (Surette & Nason, 2019). Die Einflüsse dieser unterschiedlichen Faktoren führen in Verbindung mit der Vielfalt der Umwelt zur Komplexität der sich ausbildenden Biomolekül-Corona, wodurch eine Vorhersage des Partikelverhaltens erschwert wird (Corsi et al., 2020; Docter et al., 2015; Markiewicz et al., 2018). Dabei stellen die Interaktionen mit allgegenwärtigen Makromolekülen der Umwelt eine entscheidende Rolle in der Bestimmung des NP Schicksals und Verhaltens dar. In den im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Experimenten wird neben Reinstwasser nur ein weiteres Medium – das OECD 301 Medium – untersucht. Die Ausbildung einer Biomolekül-Corona wird jedoch maßgeblich von ihrer Umgebung beeinflusst, weshalb weitere Untersuchungen mit verschiedenen Parametern des

Mediums (z.B. pH-Wert, Ionenstärke) Verständnis umgebenden zum des NP-Verhaltens beitragen können. In diesem Zusammenhang können durch die Betrachtung der Wechselwirkungen von Nanomaterialien gleichzeitig auch die Grenzen der Interaktionen mit der Umwelt aufgezeigt werden. Abhängig von den Parametern des umgebenden Mediums kann es dabei aber zum Verlust der nanopartikulären Eigenschaften der Partikel - beispielsweise durch Agglomeration oder Auflösung kommen. Dies beeinflusst das Adsorptionsverhalten der NPs und geht einher mit der Änderung ihres Gefahrenpotentials. Für die Bewertung von Nanomaterialien ist dieses Wissen neben der Charakterisierung der NPs unerlässlich.

3.2 Vergleich des Adsorptionsverhaltens ausgewählter Metalloxide am Beispiel von Kupferoxid-, Cerdioxid- und Siliziumdioxid-Nanopartikeln

Die Fähigkeit eines Nanomaterials, mit Biomolekülen zu interagieren, liegt in seiner Beschaffenheit begründet, d.h. je nach dem Verhältnis von Oberfläche zu Volumen sowie den physikochemischen Eigenschaften der NPs und Biomoleküle wird durch Adsorption an der NP-Oberfläche eine Biomolekül-Corona gebildet. Problematisch ist die Anzahl möglicher Faktoren mit Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen NP und Biomolekül. Um ein Verständnis für das NP-Verhalten und die Ausbildung einer NP-Corona zu entwickeln bedarf es der Untersuchung der komplexen Beziehungen zwischen Umgebung, NP und Biomolekül.

Der Vergleich der Daten zur Adsorption verschiedener Modellsubstanzen in Kapitel 2.3 (Abbildung 2 – erstellt von Steve Bemowsky, Tabelle 1 und 2) zeigt Unterschiede zwischen den Metalloxid-NPs. Zuallererst ändert sich die Adsorption von Biomolekülen mit dem Zeta-Potential der Nanomaterialien, welches abhängig vom pH-Wert der Umgebung ist. Viele Biomoleküle sind unter umweltrelevanten Bedingungen negativ geladen, weshalb elektrostatische Wechselwirkungen mit z.B. SiO₂-NPs aufgrund der ebenfalls negativ geladenen Oberfläche zu gegenseitiger Abstoßung führen (Kapitel 2.3, Tabelle 5). Bei sterischen Interaktionen zwischen NP und Biomolekül ist die Adsorption unabhängig vom Zeta-Potential.

Betrachtet man die Adsorption eines Biomoleküls auf einem Nanomaterial in Reinstwasser, so kann davon ausgegangen werden, dass alle auftretenden Interaktionen ausschließlich auf das Adsorbat und Adsorbens zurückzuführen sind und keine äußeren Einflüsse vorhanden sind. Durch Vergleich mit der Adsorption in einem zweiten Medium bekannter Komposition können Rückschlüsse auf das Verhalten der NPs gezogen werden, solange die Unterschiede in den physikochemischen Parametern zwischen den beiden Medien nicht extrem sind. Liegt z.B. ein vergleichbarer pH-Wert vor, aber das Vergleichsmedium enthält multivalente Ionen (höhere Ionenstärke), können aufgrund der Unterschiede im Adsorptionsverhalten Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen der Biomoleküle mit den NPs gezogen werden. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Adsorptionsexperimente ergänzen damit das Wissen zu den Interaktionen der Nanomaterialien mit Biomolekülen und deren NP-Verhalten nach Ausbildung einer Biomolekül-Corona.

Sowohl CuO-NPs mit Catechin und NR-NOM sowie CeO₂-NPs mit Catechin und Tanninsäure (im Rahmen Standardabweichung) weisen im OECD 301 Medium ein niedrigeres Adsorptionsmaximum gegenüber Reinstwasser auf (Kapitel 2.3, Tabelle 1 und 2). Die reduzierte Adsorption der Biomoleküle lässt vermuten, dass in diesen Fällen kaum Interaktionen durch Brückenbildung zwischen mehrwertigen Ionen und an der NP-Oberfläche adsorbierten Biomolekülen auftreten. Andernfalls würde aufgrund der Mehrschichtadsorption ein Anstieg des Adsorptionsmaximums beobachtet, wie dies bei Huminsäure und Cetylpyridiniumchlorid (CPC) an CeO₂-NPs und bei CPC mit SiO₂-NPs der Fall ist (Kapitel 2.3, Tabelle 2). Insbesondere die Adsorption von CPC kann vollständig auf Wechselwirkungen über Ionenbrücken zurückgeführt werden, da bei dem vorliegenden pH-Wert die positiv geladenen CeO2-NPs und CPC einerseits und das CPC untereinander andererseits sich nach der Adsorption an negativ geladenen SiO₂-NPs elektrostatisch abstoßen würden. In Anbetracht der Interaktion von Tanninsäure mit CeO2-NPs kann für CuO-NPs angenommen werden, dass das sehr hohe Adsorptionsmaximum (Kapitel 2.3, Tabelle 1 und 2) - in Reinstwasser und OECD 301 Medium - im Vergleich zu allen anderen untersuchten Modellsubstanzen auf einer starken Wechselwirkung beruht. Es ist bekannt, dass Kupfer hervorragend mit natürlichen Liganden wie Tanninsäure interagiert (Conway et al., 2015; Zhao et al., 2017), sodass die Adsorption durch Komplexierung von Ionen der NP-Oberfläche gefördert wird. Diese Wechselwirkungen zwischen NPs und NOM treten vor allem mit aromatischen Doppelbindungen (C=C), phenolischen Hydroxiden (C-O) und Carboxylen (-COOH) auf (Wang et al., 2015; Yu et al., 2018).

Die innerhalb dieser Dissertation durchgeführten Experimente können nur einen Einblick in die Komplexität des Adsorptionsverhaltens von Metalloxid-NPs gewähren. Durch die Untersuchung der Adsorption weiterer Modellsubstanzen und dem daraus gewonnenen Wissen über die verschiedenen Wechselwirkungen zwischen NPs, Biomolekül und Umwelt kann Aufschluss über die Gestaltung von umweltfreundlichen Nanomaterialien gewähren. Beschichtungen mit hoher Affinität zum NP könnten so gestaltet werden, dass die negativen Einflüsse eingesetzter Nanomaterialien - beispielsweise Toxizität gegenüber Organismen verschiedener trophischer Ebenen oder dem unkontrollierten Verbleib in den Kompartimenten der Umwelt - reduziert werden und trotzdem noch entsprechend ihres Anwendungsbereiches zielgerichtet wirken (Buchman, Hudson-Smith, Landy, & Haynes, 2019). In Studien mit Mikrokosmen können saisonunabhängig ganzjährig die Interaktionen zwischen Biomolekülen, Nanomaterialien und Organismen untersucht werden. Eine Herausforderung für die im Labormaßstab durchgeführten Experimente stellt aber die Simulation des sich über die Zeit verändernden Einflusses des Umweltmediums auf die Nanomaterialien dar. Abiotische Faktoren wie z.B. Kohlenstoffgehalt, Temperatur, Ionenstärke oder pH-Wert können mit der Zeit variieren (Jahreszeitenwechsel) und

haben einen Einfluss auf das NP-Verhalten. In der Regel verhält sich die ausgebildete Biomolekül-Corona dynamisch und verändert sich in Abhängigkeit des umgebenden Mediums. Hinsichtlich der regulatorischen Anforderungen für das Inverkehrbringen sowie für die Risikobewertung von Nanomaterialien könnten diese Veränderungen mit Hilfe von Mesokosmenstudien im Freiland unter realen Bedingungen über lange Zeiträume beobachtet werden (Klaper, 2020). Ebenso wie in den natürlichen Umgebungen variiert die Zusammensetzung der Mesokosmen in Abhängigkeit der eingesetzten Sedimente, des Wassers und der sich ansiedelnden Organismen. Erste Ansätze zur Standardisierung des Testsystems und zur Festlegung von Kriterien (zu beobachtende Parameter, Probenahmeintervall, Applizierung der Nanomaterialien, etc.) für die verschiedenen Phasen des Tests sind in der Literatur bereits diskutiert, sollten aber noch beispielsweise in Form eines Leitfadens zusammengefasst werden (Auffan et al., 2019). Ähnlich wie bei den klinischen Studien für die Zulassung von Medikamenten könnten auf diese Weise die Auswirkungen der Umwelteinflüsse von Nanomaterialien, aber auch von anderen Chemikalien wie beispielsweise Pflanzenschutzmitteln (Insektizide, Pestizide) untersucht werden.

3.3 Charakterisierung von Biomolekül-Coronas und Analyse ihrer Interaktionen mit Nanopartikeln

Bis heute sind die Struktur-Wirkungs-Beziehungen vieler Umweltmoleküle bei der Bildung einer NP-Corona nicht ausreichend verstanden (Xu et al., 2020). Die Analyse der Eigenschaften des Nanomaterials und der Biomolekül-Corona sind wichtig, um das Verhalten von NPs in verschiedenen Medien zu verstehen. Insbesondere die Charakterisierung der Wechselwirkungen von NPs mit NOM der Umwelt und die daraus resultierende Ausbildung einer Biomolekül-Corona ist aufgrund der Komplexität der NOM-Zusammensetzung sowie des Einflusses verschiedener Parameter der Umgebung problematisch.

Neben den Untersuchungen der kolloidalen Stabilität, des Auflösungsverhaltens und anderer physikochemischer Eigenschaften der NPs in Gegenwart von NOM kann auch das Adsorptionsverhalten Rückschlüsse auf den Verbleib der NPs zulassen. Nur selten werden jedoch in Studien Vergleiche zwischen dem Verhalten unterschiedlicher Nanomaterialien bezüglich ihrer Adsorption und Interaktion mit NOM angestellt (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020), wie Awad et.al am Beispiel organischer Schadstoffe demonstriert (Awad et al., 2020). Insofern ist die Bestimmung von Sorptionsisothermen eine Möglichkeit, diese Abhängigkeiten zu untersuchen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden die Adsorptionen von Modellsubstanzen an drei Metalloxid-NPs – CuO, CeO₂ und SiO₂ – untersucht (Kapitel 2.3, Unterkapitel 3.2). Die erworbenen Erkenntnisse dienen hierbei dem Verstehen des NP-Verhaltens und der Ausbildung einer Biomolekül-Corona. Allerdings sind die gewonnenen Daten für den Vergleich zwischen verschiedenen Nanomaterialien nicht gut geeignet. Üblicherweise wird die adsorbierte Menge in mg g⁻¹ (Milligramm Adsorbat je Gramm NP) bestimmt, daher hängen die Daten sowohl von der Art des Nanomaterials als auch vom Adsorbat ab. So variiert z.B. die Adsorption zwischen den gleichen Nanomaterialien mit verschiedenen NP-Oberflächen. Darüber hinaus kann die Masse des Adsorbats für gelöste Komponenten unbekannter Konzentration nicht direkt ermittelt werden, wie dies bei NOM in der Umwelt der Fall ist.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Adsorptionen können die Daten über die BET-Oberfläche der NPs und den Gesamtkohlenstoffgehalt des Biomoleküls in mol C m⁻² (Mol Kohlenstoff je Quadratmeter) umgerechnet werden. Dies ermöglicht es, die Adsorption von Molekülen in aquatischer Umgebung zu untersuchen, ohne deren strukturelle Eigenschaften und detaillierte Zusammensetzung zu kennen (Kapitel 2.3, Tabelle 1 und 2). Ferner können Laborversuche genutzt werden, um das Verhalten

unterschiedlicher NPs gegenüber Biomolekülen und Gruppen von NOM (z.B. Biopolymere, Säuren mit geringem Molekulargewicht, neutralen und amphiphilen Molekülen) zu studieren. Der Vergleich des Adsorptionsverhaltens in einem Medium und in Reinstwasser kann somit zur Charakterisierung und Klassifizierung des Verhaltens von "undefinierter" NOM beitragen. Da in Reinstwasser nur molekulare Wechselwirkungen zwischen Adsorbens und Adsorbat auftreten, können Rückschlüsse auf das Verhalten der Biomolekül-Corona im Vergleich zur Adsorption in einem anderen Medium gezogen werden, solange sich die beiden Medien nicht zu sehr unterscheiden – also beispielsweise einen ähnlichen pH-Wert, aber eine andere Ionenstärke haben. Mit Hilfe solcher Analysen können aus einer größeren Anzahl von Biomolekülen und NPs fundierte Schlussfolgerungen für eine umfassende Bewertung der Biomolekül-Corona gezogen werden.

Anstelle der hergestellten reinen bzw. beschichteten NPs, sollten die durch Ausbildung von Makromolekül-Coronas transformierten Nanomaterialien als relevante Form für Untersuchungen nanopartikulärer Effekte in der Umwelt angesehen werden. Nicht zuletzt, auch weil das Interesse an dem Verhalten und der Toxizität von NPs sowie den NP-Coronas steigt. Dies würde den benötigten Aufwand zum Bewerten vorhandener Nanomaterialien erhöhen, aber schlussendlich ein realistischeres Abbild des Verhaltens der NPs liefern. Häufig werden in Studien nur die Auswirkungen von der An-/Abwesenheit von NOM auf das NP-Verhalten wie beispielsweise deren kolloidale Stabilität untersucht und nicht die genaue Ausbildung der Biomolekül-Corona bestimmt. Die Charakterisierung der NP-Corona und experimentelle Bestimmung der Adsorption organischer Materie – wie in den Kapiteln 2.2 (Bemowsky et al., 2019) und 2.3 untersucht - kann aber hilfreich in der Vorhersage des Verhaltens der Nanomaterialien in der Umwelt sein (Ellis, Baalousha, Valsami-Jones, & Lead, 2018). Eine mögliche Ursache für die mangelnde Datenlage liegt in der Komplexität der Makromoleküle in NOM, welche aufgrund der großen räumlichen und zeitlichen Variation in aquatischen und terrestrischen Umgebungen deutlich schlechter charakterisiert sind als beispielsweise Proteine oder kleinere Biomoleküle (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020; Zhen Li et al., 2017; Xu et al., 2020). Eine Herangehensweise an die Untersuchung der Interaktionen zwischen NOM und NPs besteht in der Reduktion der Komplexität durch Einsatz verschiedener NOM-Modellsubstanzen mit bekannten Molekülstrukturen (Kapitel 2.3, Abbildung 1 – erstellt von Steve Bemowsky). Anhand der im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersuchten Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen und NPs - beispielsweise für CuO-/CeO2-NPs mit Catechin oder Tanninsäure - können Rückschlüsse auf das NP-Verhalten gezogen werden. So bindet Tanninsäure Kupfer vermutlich als einzige der ausgewählten Modellsubstanzen bei den vorliegenden pH-Werten durch Komplexreaktionen (Vergleich Zhao et al., 2017), zu erkennen an der gleichzeitig erhöhten NP-Auflösung und der hohen Adsorption des Biomoleküls auf der NP-Oberfläche (Kapitel 2.3, Abbildung 2 und 3 – erstellt von Steve Bemowsky).

Für die Entwicklung eines Verständnisses des NP-Verhaltens in der Umwelt sollten künftige Studien der nanopartikulären Effekte ihren Fokus erweitern und neben den reinen Auswirkungen auch die Zusammenhänge mit der Ausbildung einer Biomolekül-Corona untersuchen. Beispielsweise zeigen Untersuchungen für NPs wie CuO, CeO₂ oder SiO₂ eine Abhängigkeit der Toxizität gegenüber Organismen von der Oberflächenbeschaffenheit (Abbas, Yousaf, Ullah, et al., 2020). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten geben nur einen kleinen Einblick in das Wechselwirkungspotential der ausgewählten Nanomaterialien. Unter Einbezug der Vielfalt von NOM müssen die Interaktionen weiterer Modellsubstanzen mit NPs untersucht werden, um sich einen Überblick über das Verhalten von NPs mit einer Biomolekül-Corona zu verschaffen. Aus einer breiten Auswahl getesteter chemischer Moleküle lassen sich dann möglicherweise Gruppen mit vergleichbarem Verhalten auf Basis ihrer chemischen Reaktivität bestimmen. Daraus könnte ein kosteneffektives Testsystem für regulatorische Zwecke abgeleitet werden, um die Effekte und Mechanismen von NP-Coronas zu untersuchen. Hinsichtlich der Adsorption können unter realen Bedingungen viele verschiedene Biomoleküle der NOM gleichzeitig mit der NP-Oberfläche wechselwirken. Dabei ist die exakte Quantifizierung einzelner Adsorbate häufig eine analytische Herausforderung. Zur Interpretation eines solchen Systems ist zunächst die Entwicklung geeigneter Methoden der Charakterisierung der Biomolekül-Corona oder der Zusammensetzung von NOM in Umweltmedien notwendig, wie es beispielsweise für die Bestimmung der adsorbierten Konzentration von Dimercaptobernsteinsäure nach Bemowsky et al. (2019) etabliert wurde. Schwefel gehört zu den Elementen, die einerseits anteilig mit bis zu 3 % in NOM vorkommen (Baalousha, Afshinnia, & Guo, 2018), aber auch in anderen Verbindungen wie Aminosäuren in Proteinen enthalten sein können. Fortführende Untersuchungen könnten die Anwendbarkeit der entwickelten Methode auf verschiedene schwefelhaltige NP-Coronas untersuchen.

3.4 Biologische Abbaubarkeit von auf Nanopartikeln adsorbierten Biomolekülen

Die Transformationen von Nanomaterialien in der Umwelt sind vielfältig und umfassen viele verschiedene Wechselwirkungen zwischen NPs und dem Umgebungsmedium. Ein vorhandenes Coating oder eine ausgebildete Biomolekül-Corona verändern die kolloidale Stabilität von Nanomaterialien in wässrigen Medien wesentlich, indem sie die zwischenmolekularen Kräfte und die freie Oberflächenenergie beeinflusst. Infolgedessen ändert sich das NP-Verhalten in Bezug auf Bioverfügbarkeit, Toxizität und Verbleib in der Umwelt (Xu et al., 2020).

Bei den meisten Chemikalien hängt die ökologische Verweilzeit weitgehend von den biologischen Abbauraten ab, die letztendlich zur vollständigen Mineralisierung zu anorganischem Kohlenstoff führen (Boethling et al., 2009). Darüber hinaus stellen die mikrobiellen Prozesse im Klärschlamm von Abwasseraufbereitungsanlagen den größten Anteil an der Verringerung der Umweltkonzentrationen vieler Stoffe dar. Demnach ist die Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit für die Beurteilung des allgemeinen Gefahrenpotentials einer Chemikalie von Bedeutung. Diesen Studien sind aber Grenzen für Substanzen gesetzt, welche beispielsweise in den relevanten Testkonzentrationen eine toxische Wirkung auf das Inokulum haben (Prado, Montéléon, Ochoa, & Amrane, 2009). Kationische Tenside mit antiseptischen Eigenschaften, wie z.B. CPC, stellen eine solche Substanzklasse dar.

Neben dem biologischen Abbau organischer Moleküle können auch die Coatings und Biomolekül-Coronas von NPs durch Mikroorganismen in der Umwelt biologisch abgebaut werden (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020; Kirschling et al., 2011). Dies fördert potenziell die Agglomeration und Sedimentation der Nanomaterialien, erlaubt aber auch weitere Interaktionen mit anderen Bestandteilen von NOM in aquatischen Medien. Detaillierte Studien über das biologische Abbaupotenzial verschiedener organischer Oberflächenbeschichtungen durch Mikroben in der Umwelt und den Einfluss auf das Verhalten der Nanomaterialien sind jedoch kaum vorhanden (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020).

Die in Kapitel 2.2 und 2.3 untersuchte biologische Abbaubarkeit unterscheidet sich zwischen den an CuO-, CeO₂- und Eisenoxid-NPs adsorbierten und gelösten Modellsubstanzen. Substanzgemische wie NR-NOM und Huminsäure, aber auch CPC und Dimercaptobernsteinsäure (DMSA) zeigen unter den gewählten Bedingungen keine biologische Abbaubarkeit (Kapitel 2.2, Abbildung 5; Kapitel 2.3, Abbildung 4; Abbildungen erstellt von Steve Bemowsky). Die Adsorption an der NP-Oberfläche

beeinflusst die Bioverfügbarkeit der Biomoleküle Catechin und Tanninsäure, sodass die Mikroben diese weniger gut biologisch abbauen können, als wenn diese Substanzen frei im Medium vorliegen.

Das beschriebene Testdesign zur Untersuchung der biologischen Abbaubarkeit von auf Nanomaterialien adsorbierten Biomolekülen (Kapitel 2.2, Unterkapitel 2.4; Kapitel 2.3, Unterkapitel 2.4) ermöglicht neue Einblicke in das NP-Verhalten und ihren Wechselwirkungen mit der Umgebung. Prinzipiell wird die biologische Abbaubarkeit von Biomolekülen durch Adsorption an Nanomaterialien stark beeinflusst, aber die genauen Abläufe sind bisher unzureichend untersucht. In Abhängigkeit von der Wechselwirkung der adsorbierten Substanzen mit der NP-Oberfläche können sie z.B. weniger bioverfügbar sein, durch Desorption über einen längeren Zeitraum verzögert freigesetzt werden oder die für toxische Wirkungen verantwortlichen funktionellen Gruppen abschirmen. Diese Untersuchungen sind dabei abhängig von der kolloidalen Stabilität der Nanomaterialien, da es im Falle der Auflösung der NPs unter den ausgewählten Bedingungen keine Partikeleffekte geben würde. Weiterhin kann es zu der ungewünschten Effekten aufgrund notwendigen Konzentrationen der Modellsubstanzen kommen. Neue Untersuchungen zeigen, dass die hemmende Wirkung einiger Substanzen auf das Inokulum durch Adsorption an Nanopartikeln negiert und damit für den mikrobiellen biologischen Abbau verfügbar gemacht werden können (Timmer, Gore, Sanders, Gouin, & Droge, 2019). So können potenziell zum einen Chemikalien untersucht werden, welche geringe Umweltkonzentration vorweisen aber in den eingesetzten Testkonzentrationen aufgrund ihrer Toxizität keine biologische Abbaubarkeit zeigen. Zum anderen kann der gezielte Einsatz von Nanomaterialien durch möglichweise dazu beitragen, Ausbildung einer Biomolekül-Corona die Persistenz von organischen Umweltschadstoffen zu reduzieren (Gutierrez, Dziubla, & Hilt, 2017).

Die gesammelten Informationen über das Verhalten der Nanomaterialien und Modellsubstanzen können für die Regulierung genutzt werden. Durch die Gruppierung von Nanomaterialien mit ähnlichem Verhalten könnten für die Risikobewertung auf der Grundlage etablierter Struktur-Wirkungs-Beziehungen auch Rückschlüsse auf das Verhalten von bisher nicht geprüften Materialien gezogen werden. Für eine entsprechende Analogiebildung ist daher der Zusammenhang zwischen den Eigenschaften der NPs (Form, Größe, Oberflächenladung, etc.) und ihrem Verhalten ein wichtiges Kriterium, das es zu untersuchen gilt.

3.5 Zukunftsaussichten

Die in dieser Promotionsarbeit entwickelte analytische Methode zeigt sich als geeignetes Instrument der Quantifizierung von auf NPs adsorbiertem DMSA (Kapitel 2.2), welches beispielsweise als Hilfsmittel zur Verbesserung der kolloidalen Stabilität von Nanomaterialien für Untersuchungen in verschiedenen biologischen Systemen zum Einsatz kommt (Joshi et al., 2016; Joshi, Thiel, Jog, & Dringen, 2019). Neben DMSA können mit der vorgestellten ionenchromatographischen Methode potenziell auch andere schwefelhaltige Beschichtungen von Nanomaterialien quantifiziert werden. Allerdings können nur begrenzte Informationen über die Biomolekül-Coronas von beispielsweise in Umweltgewässern freigesetzten NPs gewonnen werden. Dies ist auf den niedrigen Schwefelgehalt in natürlichen Biomolekülen und die komplexe Zusammensetzung von NOM zurückzuführen. Für ein besseres Verständnis der unter Umweltbedingungen entstehenden Biomolekül-Corona besteht die Notwendigkeit weitere analytische Methoden zur strukturellen Identifizierung auf NPs adsorbierter Substanzen zu entwickeln. Obwohl es bereits eine Reihe fortschrittlicher Techniken zur Charakterisierung reiner Nanomaterialien gibt, ist die Analyse von NP-Coronas und Unterscheidung von natürlichen Kolloiden in der Umwelt oder komplexen Matrices wie dem Inokulum eines biologischen Abbautests immer noch eine Herausforderung (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020; Paterson, Macken, & Thomas, 2011). In dieser die Kombination Verfahren Hinsicht kann von bildgebenden (Transmissionselektronenmikroskopie) mit massenspektroskopischen Ansätzen (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) ein vielversprechender Ansatz für die Untersuchung des Nanomaterials sein (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020; Abdolahpur Monikh, Chupani, Vijver, Vancová, & Peijnenburg, 2019). Darüber hinaus kann die Übertragung von thermodesorptiven gaschromatographischen Methoden (TD-GC/MS) zur Untersuchung auf Mikroplastik adsorbierter organischer Komponenten (Reichel, Graßmann, Letzel, & Drewes, 2020) möglicherweise Informationen über die Zusammensetzung von auf NPs adsorbierter NOM liefern.

Ein Verständnis für das NP-Verhalten kann neben der potenziellen Analyse der Biomolekül-Corona und anderer physikochemischer Eigenschaften des Nanomaterials auch durch die Bestimmung von Adsorptionsisothermen unterschiedlicher NOM- und Modellsubstanzen entwickelt werden. Dabei stellt die Bewertung und Gegenüberstellung von Adsorptionsdaten verschiedener, aber auch gleicher Nanomaterialien mit variierender Gesamtoberfläche eine Herausforderung dar. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Adsorptionsfähigkeit wurden die in dieser Doktorarbeit gewonnenen Daten auf ihre Oberfläche statt auf die Masse der NPs bezogen und die
Menge des adsorbierten Biomoleküls wurde in Mol Kohlenstoff (mol C) unter Verwendung der ermittelten Werte für den Gesamtkohlenstoffgehalt ausgedrückt. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnten nur eine geringe Anzahl von Substanzen betrachtet werden (Kapitel 2.3). Die Durchführung weiterer Messungen strukturell bekannter Modellsubstanzen und verschiedener Proben von NOM an diversen Nanomaterialien kann unser Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen NP und NOM erweitern. Durch den Vergleich der Adsorption in Reinstwasser gegenüber einem salzhaltigen Medium können so mögliche Formen der Interaktion zwischen Biomolekül und NP sowie die daraus resultierende Bildung einer Biomolekül-Corona abgeschätzt werden.

Nach der gezielten Bildung einer Biomolekül-Corona auf CuO- und CeO₂-NPs wurde der Einfluss der Adsorption auf die Bioverfügbarkeit untersucht (Kapitel 2.3, Unterkapitel 3.4). Die biologische Abbaubarkeit von auf Nanomaterialien adsorbierten Substanzen ist nach dem derzeitigen Stand der Literatur nicht Gegenstand vieler Studien (Abbas, Yousaf, Amina, et al., 2020). Deren Untersuchung erfordert Kenntnisse über die Konzentrationen der im System vorhandenen Testsubstanzen auf der NP-Oberfläche. Für NOM wird die Konzentration für die Adsorptionsisothermen häufig durch Beobachtung der für aromatische Gruppen typischen UV Absorption bei 254 nm bestimmt (Albrektienė, Rimeika, Zalieckienė, Šaulys, & Zagorskis, 2012). Die NPs werden aus der Lösung abgetrennt (beispielsweise durch Zentrifugation) und die Konzentration des Biomoleküls im Überstand bestimmt. Bei realen Proben mit NOM ist jedoch die Ausgangskonzentration unbekannt und das Absorptionsverhalten verschiedener NOM unterschiedlich, sodass eine NOM-Kalibrierung nicht universell eingesetzt werden sollte. Außerdem zeigen Nanomaterialien oft selbst Absorptionen im UV-Bereich und können die Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Messung verfälschen, sodass die direkte Bestimmung des Gesamtkohlenstoffgehaltes auf der NP-Oberfläche nach Separation vom Medium eine Alternative darstellen kann.

Weiterhin müssen bei bekannten Tests zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit über den biochemischen Sauerstoffbedarf in der Regel hohe Massen an NPs eingebracht Biomolekülkonzentrationen werden. um relevante zu erreichen. Um die Empfindlichkeit des Testsystems zu verbessern und auch den biologischen Abbau von Umweltkonzentrationen im ng oder µg L⁻¹ Bereich zu untersuchen, sind detailliertere Informationen über die Zusammensetzung von NOM erforderlich. Durch die Verknüpfung von Pyrolyse und Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Kopplung (PY-GC/MS) können die einzelnen Fraktionen von NOM potenziell identifiziert werden (Picó & Barceló, 2020). Ein wichtiger Faktor ist dabei die Separation

der Nanomaterialien des Mediums. Die Kombination der PY-GC/MS mit multidimensionaler Gaschromatographie (GC×GC) und hochauflösender MS kann die Trennleistung weiter steigern und die Identifizierung einzelner Bestandteile von NOM ermöglichen. Zudem können aufgrund der Empfindlichkeit der GC/MS auch Aussagen über die biologische Abbaubarkeit getroffen werden, da Rückschlüsse auf sehr kleine Konzentrationen von Biomolekülen möglich sind.

Der biologische Abbau der Biomolekül-Corona oder des Coatings eines Nanomaterials geht mit Veränderungen der Stabilität und Reaktivität einher. Diese beeinflussen z.B. die Verweilzeit und Mobilität von NPs in der wässrigen Phase, was wiederum die Exposition gegenüber Organismen verändert (Spurgeon, Lahive, & Schultz, 2020). Studien zeigen, dass intermolekulare Interaktionen von NPs mit Biomolekülen sehr dynamisch sind und dass die Bildung einer Biomolekül-Corona von der Geschichte der NP-Oberfläche abhängt (Shakiba, Hakimian, Barco, & Louie, 2018). Für eine nachhaltige Entwicklung der Nanotechnologie können "grüne" Synthesewege (umweltfreundliche, energieschonende Synthesen mit Pflanzenextrakten oder Mikroorganismen) eine Möglichkeit sein, das Verhalten eines NPs in der Umwelt gezielt zu gestalten und die Gefährdung für dortige Organismen zu reduzieren (Singh et al., 2018). Aber auch in diesem Fall ist ein Verständnis des Verhaltens der NP-Corona in der Umwelt erforderlich, dass zunächst durch die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen und Nanomaterialien gewonnen werden muss.

Im Rahmen des Promotionskollegs "NanoCompetence in der Gesellschaft – Forschung, Vermittlung, Gestaltung" wurden verschiedene Fragestellungen mit wissenschaftlichem und gesellschaftlichem Hintergrund rund um das Thema CuO- und CeO2-NPs betrachtet. Unter anderem wurden Untersuchungen zur ökologischen Wirkung von NPs in aquatischen sowie terrestrischen Umgebungen durchgeführt und im physiologischen Bereich Experimente zu den nanopartikulären Effekten auf verschiedene Zelltypen (beispielsweise Gehirnzellen) vorgenommen. In dieser Arbeit wurde das Verhalten von Metalloxid-NPs in Gegenwart verschiedener Modellsubstanzen betrachtet. Eines der Ziele von "NanoCompetence" ist der Wissenstransfer der in den verschiedenen Promotionsarbeiten des Kollegs erworbenen Erkenntnisse - also der Transfer aus der Wissenschaft in die Gesellschaft. Angesichts der Vielzahl möglicher Interaktionen zwischen NPs, Medium und Biomolekülen ist die Regulierung von Nanomaterialien eine große Herausforderung. Daher ist die Kenntnis der Wechselwirkungen einer Biomolekül-Corona ausgebildeten notwendig für die Klassifizierung und Risikobewertung von Nanomaterialien. Die innerhalb dieser Dissertation entwickelten Methoden und gewonnenen Daten zum Verhalten von CuO-, CeO2- und SiO2-NPs in

Gegenwart verschiedener Modellsubstanzen stellen eine Möglichkeit dar, das Gefährdungspotentials von Nanomaterialien besser zu beurteilen. Durch die Berücksichtigung der Wechselwirkungen weiterer Modellsubstanzen mit den NPs und die Analyse ihrer Biomolekül-Corona könnten die Nanomaterialien möglicherweise hinsichtlich ihres Verhaltens gruppiert werden. Dies würde eine annähernde Vorhersage der Auswirkungen ähnlicher Nanomaterialien ermöglichen.

3.6 Quellenangaben

- Abbas, Q., Yousaf, B., Amina, Ali, M. U., Munir, M. A. M., El-Naggar, A., ... Naushad, M. (2020). Transformation pathways and fate of engineered nanoparticles (ENPs) in distinct interactive environmental compartments: A review. *Environment International*, 138, 105646.
- Abbas, Q., Yousaf, B., Ullah, H., Ali, M. U., Ok, Y. S., & Rinklebe, J. (2020). Environmental transformation and nano-toxicity of engineered nano-particles (ENPs) in aquatic and terrestrial organisms. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50, 2523–2581.
- Abdolahpur Monikh, F., Chupani, L., Vijver, M. G., Vancová, M., & Peijnenburg, W. J. G. M. (2019). Analytical approaches for characterizing and quantifying engineered nanoparticles in biological matrices from an (eco)toxicological perspective: old challenges, new methods and techniques. *Science of The Total Environment*, 660, 1283–1293.
- Albrektienė, R., Rimeika, M., Zalieckienė, E., Šaulys, V., & Zagorskis, A. (2012). Determination of organic matter by UV absorption in the ground water. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 20, 163–167.
- Amde, M., Liu, J., Tan, Z.-Q., & Bekana, D. (2017). Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review. *Environmental Pollution*, 230, 250–267.
- Arvidsson, R., Hansen, S. F., & Baun, A. (2020). Influence of natural organic matter on the aquatic ecotoxicity of engineered nanoparticles: Recommendations for environmental risk assessment. *NanoImpact*, 20, 100263.
- Auffan, M., Masion, A., Mouneyrac, C., de Garidel-Thoron, C., Hendren, C. O., Thiery, A., ... Rose, J. (2019). Contribution of mesocosm testing to a single-step and exposure-driven environmental risk assessment of engineered nanomaterials. *NanoImpact*, 13, 66–69.
- Awad, A. M., Jalab, R., Benamor, A., Nasser, M. S., Ba-Abbad, M. M., El-Naas, M., & Mohammad, A. W. (2020). Adsorption of organic pollutants by nanomaterialbased adsorbents: An overview. *Journal of Molecular Liquids*, 301, 112335.
- Baalousha, M., Afshinnia, K., & Guo, L. (2018). Natural organic matter composition determines the molecular nature of silver nanomaterial-NOM corona. *Environmental Science: Nano*, *5*, 868–881.
- Bemowsky, S., Rother, A., Willmann, W., Köser, J., Markiewicz, M., Dringen, R., & Stolte, S. (2019). Quantification and biodegradability assessment of meso-2,3dimercaptosuccinic acid adsorbed on iron oxide nanoparticles. *Nanoscale Advances*. https://doi.org/10.1039/C9NA00236G
- Boethling, R., Fenner, K., Howard, P., Klečka, G., Madsen, T., Snape, J. R., & Whelan, M. J. (2009). Environmental Persistence of Organic Pollutants: Guidance for Development and Review of POP Risk Profiles. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 5, 539.

- Buchman, J. T., Hudson-Smith, N. V., Landy, K. M., & Haynes, C. L. (2019). Understanding Nanoparticle Toxicity Mechanisms To Inform Redesign Strategies To Reduce Environmental Impact. Accounts of Chemical Research, 52, 1632–1642.
- Conway, J. R., Adeleye, A. S., Gardea-Torresdey, J., & Keller, A. A. (2015). Aggregation, Dissolution, and Transformation of Copper Nanoparticles in Natural Waters. *Environmental Science & Technology*, 49, 2749–2756.
- Corsi, I., Bergami, E., & Grassi, G. (2020). Behavior and Bio-Interactions of Anthropogenic Particles in Marine Environment for a More Realistic Ecological Risk Assessment. *Frontiers in Environmental Science*, *8*, 1–21.
- Delay, M., Dolt, T., Woellhaf, A., Sembritzki, R., & Frimmel, F. H. (2011). Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: Influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength. *Journal of Chromatography A*, *1218*, 4206–4212.
- Diedrich, T., Dybowska, A., Schott, J., Valsami-Jones, E., & Oelkers, E. H. (2012). The Dissolution Rates of SiO 2 Nanoparticles As a Function of Particle Size. *Environmental Science & Technology*, 46, 4909–4915.
- Dippon, U., Pabst, S., & Klitzke, S. (2018). Colloidal stabilization of CeO2 nanomaterials with polyacrylic acid, polyvinyl alcohol or natural organic matter. *Science of The Total Environment*, 645, 1153–1158.
- Docter, D., Westmeier, D., Markiewicz, M., Stolte, S., Knauer, S. K., & Stauber, R. H. (2015). The Nanoparticle Biomolecule Corona: Lessons learned Challange accepted. *Chemical Society Reviews*, 1–3.
- Ellis, L.-J. A., Baalousha, M., Valsami-Jones, E., & Lead, J. R. (2018). Seasonal variability of natural water chemistry affects the fate and behaviour of silver nanoparticles. *Chemosphere*, *191*, 616–625.
- Gutierrez, A. M., Dziubla, T. D., & Hilt, J. Z. (2017). Recent advances on iron oxide magnetic nanoparticles as sorbents of organic pollutants in water and wastewater treatment. *Reviews on Environmental Health*, *32*, 111–117.
- Hayes, M. H. B., & Swift, R. S. (2020). Vindication of humic substances as a key component of organic matter in soil and water. In *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 163, pp. 1–37). Elsevier Inc.
- Joshi, A., Rastedt, W., Faber, K., Schultz, A. G., Bulcke, F., & Dringen, R. (2016). Uptake and Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles in C6 Glioma Cells. *Neurochemical Research*, *41*, 3004–3019.
- Joshi, A., Thiel, K., Jog, K., & Dringen, R. (2019). Uptake of Intact Copper Oxide Nanoparticles Causes Acute Toxicity in Cultured Glial Cells. *Neurochemical Research*, 44, 2156–2169.
- Khan, R., Inam, M. A., Zam Zam, S., Akram, M., Shin, S., & Yeom, I. T. (2019). Coagulation and Dissolution of CuO Nanoparticles in the Presence of Dissolved Organic Matter Under Different pH Values. *Sustainability*, *11*, 2825.

- Kirschling, T. L., Golas, P. L., Unrine, J. M., Matyjaszewski, K., Gregory, K. B., Lowry, G. V., & Tilton, R. D. (2011). Microbial Bioavailability of Covalently Bound Polymer Coatings on Model Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 45, 5253–5259.
- Klaper, R. D. (2020). The Known and Unknown about the Environmental Safety of Nanomaterials in Commerce. *Small*, *16*, 2000690.
- Kosmulski, M. (2009). pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach. *Journal of Colloid and Interface Science*, *337*, 439–448.
- Li, Z., Greden, K., Alvarez, P. J. J., Gregory, K. B., & Lowry, G. V. (2010). Adsorbed Polymer and NOM Limits Adhesion and Toxicity of Nano Scale Zerovalent Iron to E. coli. *Environmental Science & Technology*, 44, 3462–3467.
- Li, Z., Sahle-Demessie, E., Aly Hassan, A., Pressman, J. G., Sorial, G. A., & Han, C. (2017). Effects of source and seasonal variations of natural organic matters on the fate and transport of CeO2 nanoparticles in the environment. *Science of The Total Environment*, 609, 1616–1626.
- Liu, X., Wazne, M., Chou, T., Xiao, R., & Xu, S. (2011). Influence of Ca2+ and Suwannee River Humic Acid on aggregation of silicon nanoparticles in aqueous media. *Water Research*, 45, 105–112.
- Lv, B., Wang, C., Hou, J., Wang, P., Miao, L., & Xing, B. (2020). Development of a comprehensive understanding of aggregation-settling movement of CeO2 nanoparticles in natural waters. *Environmental Pollution*, *257*, 113584.
- Maiga, D. T., Nyoni, H., Nkambule, T. T., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. M. (2020). Impact of zinc oxide nanoparticles in aqueous environments: influence of concentrations, natural organic matter and ionic strength. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 50, 680–692.
- Markiewicz, M., Kumirska, J., Lynch, I., Matzke, M., Köser, J., Bemowsky, S., ... Stolte, S. (2018). Changing environments and biomolecule coronas: consequences and challenges for the design of environmentally acceptable engineered nanoparticles. *Green Chemistry*, 20, 4133–4168.
- Mudunkotuwa, I. A., Pettibone, J. M., & Grassian, V. H. (2012). Environmental Implications of Nanoparticle Aging in the Processing and Fate of Copper-Based Nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, *46*, 7001–7010.
- Nogueira, J., António, M., Mikhalev, S., Fateixa, S., Trindade, T., & Daniel-da-Silva, A. (2018). Porous Carrageenan-Derived Carbons for Efficient Ciprofloxacin Removal from Water. *Nanomaterials*, 8, 1004.
- Odzak, N., Kistler, D., Behra, R., & Sigg, L. (2014). Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. *Environmental Pollution*, *191*, 132–138.
- Paterson, G., Macken, A., & Thomas, K. V. (2011). The need for standardized methods and environmental monitoring programs for anthropogenic nanoparticles. *Analytical Methods*, *3*, 1461.

- Peng, C., Shen, C., Zheng, S., Yang, W., Hu, H., Liu, J., & Shi, J. (2017). Transformation of CuO Nanoparticles in the Aquatic Environment: Influence of pH, Electrolytes and Natural Organic Matter. *Nanomaterials*, 7, 326.
- Picó, Y., & Barceló, D. (2020). Pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry in environmental analysis: Focus on organic matter and microplastics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 130, 115964.
- Prado, N., Montéléon, C., Ochoa, J., & Amrane, A. (2009). Evaluation of the toxicity of veterinary antibiotics on activated sludge using modified Sturm tests - application to tetracycline and tylosine antibiotics. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85, 471–477.
- Quik, J. T. K., Lynch, I., Hoecke, K. Van, Miermans, C. J. H., Schamphelaere, K. A. C. De, Janssen, C. R., ... Meent, D. Van De. (2010). Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. *Chemosphere*, 81, 711– 715.
- Reichel, J., Graßmann, J., Letzel, T., & Drewes, J. E. (2020). Systematic Development of a Simultaneous Determination of Plastic Particle Identity and Adsorbed Organic Compounds by Thermodesorption–Pyrolysis GC/MS (TD-Pyr-GC/MS). *Molecules*, 25, 4985.
- Setyawati, M. I., Zhao, Z., & Ng, K. W. (2020). Transformation of Nanomaterials and Its Implications in Gut Nanotoxicology. *Small*, *16*, 2001246.
- Shakiba, S., Hakimian, A., Barco, L. R., & Louie, S. M. (2018). Dynamic Intermolecular Interactions Control Adsorption from Mixtures of Natural Organic Matter and Protein onto Titanium Dioxide Nanoparticles [Research-article]. *Environmental Science & Technology*, 52, 14158–14168.
- Singh, J., Dutta, T., Kim, K.-H., Rawat, M., Samddar, P., & Kumar, P. (2018). 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Journal of Nanobiotechnology*, *16*, 84.
- Sousa, V. S., & Teixeira, M. R. (2013). Aggregation kinetics and surface charge of CuO nanoparticles: the influence of pH, ionic strength and humic acids. *Environmental Chemistry*, *10*, 313.
- Spurgeon, D. J., Lahive, E., & Schultz, C. L. (2020). Nanomaterial Transformations in the Environment: Effects of Changing Exposure Forms on Bioaccumulation and Toxicity. *Small*, *16*, 2000618.
- Surette, M. C., & Nason, J. A. (2019). Nanoparticle aggregation in a freshwater river: the role of engineered surface coatings. *Environmental Science: Nano, 6*, 540–553.
- Timmer, N., Gore, D., Sanders, D., Gouin, T., & Droge, S. T. J. (2019). Sorbent-modified biodegradation studies of the biocidal cationic surfactant cetylpyridinium chloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109417.
- Walkey, C. D., Olsen, J. B., Song, F., Liu, R., Guo, H., Olsen, D. W. H., ... Chan, W. C. W. (2014). Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cellular Interaction of Gold and Silver Nanoparticles. ACS Nano, 8, 2439–2455.

- Wang, L.-F., Habibul, N., He, D.-Q., Li, W.-W., Zhang, X., Jiang, H., & Yu, H.-Q. (2015). Copper release from copper nanoparticles in the presence of natural organic matter. *Water Research*, 68, 12–23.
- Xu, L., Xu, M., Wang, R., Yin, Y., Lynch, I., & Liu, S. (2020). The Crucial Role of Environmental Coronas in Determining the Biological Effects of Engineered Nanomaterials. *Small*, *16*, 2003691.
- Yu, S., Liu, J., Yin, Y., & Shen, M. (2018). Interactions between engineered nanoparticles and dissolved organic matter: A review on mechanisms and environmental effects. *Journal of Environmental Sciences*, 63, 198–217.
- Zhang, Y., Chen, Y., Westerhoff, P., & Crittenden, J. (2009). Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles. *Water Research*, *43*, 4249–4257.
- Zhao, J., Liu, Y., Pan, B., Gao, G., Liu, Y., Liu, S., ... Peijnenburg, W. J. G. M. (2017). Tannic acid promotes ion release of copper oxide nanoparticles: Impacts from solution pH change and complexation reactions. *Water Research*, 127, 59–67.

4. Anhang

4.1 Elektronische Zusatzinformationen zu Kapitel 2.3

Table SI: TEM pictures and BET surface of A. CuO-NP, B. CeO₂-NP and C. SiO₂-NP.

TEM pictures		
A: CuO-NP	B: CeO ₂ -NP	C: SiO ₂ -NP
5 nm CuO 50 nm	20 nm	2000.1 D39401E1 2010
TEM size [nm]		
20	33	15
BET surface [m ² g ⁻¹]		
74,5	28	200



Figure SI: Flow chart for sample preparation of biodegradation test according to OECD 301 F guideline with NP adsorbed model substances.

Biomolecules and effect of medium

To investigate the number of biomolecules adsorbed on NPs, the supernatant of NP dispersions was examined by UV/vis spectroscopy. Calibrations of the selected substances were performed in MilliQ water and OECD 301 medium (Fig. S2).



A: Catechin



Figure S2: Calibration (n = 3) of **A.** catechin (278 nm); **B.** tannic acid (276 nm); **C.** NR-NOM (254 nm); **D.** humic acid (257 nm); **E.** Cetylpyridinium chloride (259 nm) over the concentration range. Data represent mean values ± SD and measured wavelength for each test substance is shown in brackets.

A comparison of the two calibration curves in MilliQ water and OECD 301 medium showed for catechin, NR-NOM and CPC no significant differences. In contrast, the extinction of tannic and humic acids in OECD 301 medium are slightly decreased. The lower signal intensity might be due to the oxidation of phenolic groups to quinones by metal salts from medium1 coming along with an increased absorption and a shift of colour into a light yellow.2 For catechin (pKa 8.64)3 this was not observed probably because it is mainly protonated (unlike TA with a pKa 4.9)4 under selected conditions at pH 7–8 and oxidation to quinones

is then very slow. Nevertheless, metal ions such as Fe3+ or Cu2+, which are either contained in the OECD 301 medium or released over time by the dissolution of corresponding NPs, can promote the formation of quinones. The proton displacement of phenol derivatives can occur at significantly lower pH values in the presence of suitable cations, which leads to chelation with and reduction of the metal ion.5

Table S2: Individual limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for all test substances in MilliQ water and OECD 301 medium.

	MilliQ water		OECD 301 medium	
Test substance	LOD	LOQ	LOD	LOQ
	[mg L ⁻¹]			
Catechin	0.35	1.06	0.70	2.10
Tannic acid	0.19	0.57	0.16	0.48
NR-NOM	0.17	0.52	0.19	0.57
Humic acid	0.29	0.87	0.85	2.55
Cetylpyridinium chloride	0.30	0.91	0.22	0.65

Table S3: Model parameter q_m for the adsorption of catechin, TA, NR-NOM, HA and CPC onto various NPs in H₂O and OECD 301 medium recalculated in mg C g⁻¹.

Adsorbate	Adsorbent	Langmuir q _m [mg C g ⁻¹]		
		MilliQ water	OECD 301	
Catechin	CuO	16.1	11.9	
	CeO ₂	19.0	10.9	
Tannic acid	CuO	74.2	312.2	
	CeO ₂	21.6	14.3	
NR-NOM	CuO	21.5	10.0	
Humic acid	CeO ₂	4.5	28.5	
CPC	CeO ₂	No adsorption	27.1	
	SiO ₂	89.8	288.3	



Figure S3: Control experiments with uncoated CuO-/CeO2-NPs and sodium benzoate.



Figure S4: Control experiments with Cu²⁺ (CuCl₂) and sodium benzoate.

References

- 1 J. Pracht, J. Boenigk, M. Isenbeck-Schröter, F. Keppler and H. . Schöler, *Chemosphere*, 2001, 44, 613–619.
- 2 T. Ahmad, J. Nanotechnol., 2014, 2014, 1–11.
- 3 M. Muzolf-Panek, A. Gliszczyńska-Świgło, H. Szymusiak and B. Tyrakowska, *Eur. Food Res. Technol.*, 2012, **235**, 1001–1009.
- 4 P. Kraal, B. Jansen, K. G. J. Nierop and J. M. Verstraten, *Chemosphere*, 2006, **65**, 2193–2198.
- 5 R. C. Hider, Z. D. Liu and H. H. Khodr, in *Methods in Enzymology*, 2001, vol. 335, pp. 190–203.