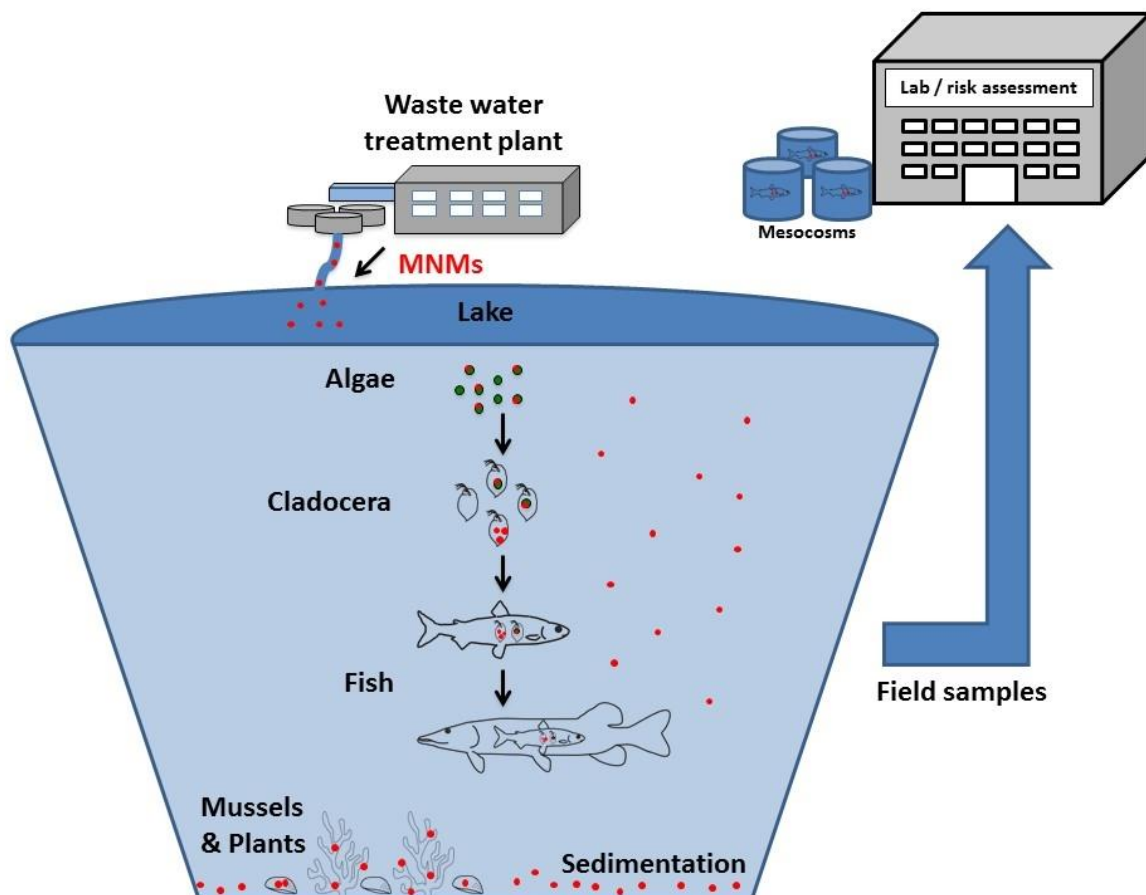


# FENOMENO - Fate and effect of waste water-borne manufactured nanomaterials in aquatic ecosystems 2015-2017



## *ERA-NET SIINN im Rahmen des NANO EHS Forschungsschwerpunktes*

**Internationaler Koordinator:** Universität Siegen (Deutschland)

**Nationaler Koordinator:** Forschungsinstitut für Limnologie, Mondsee, der Universität Innsbruck (Österreich)

**Internationaler Partner:** Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (Deutschland)

**Internationaler Partner:** Universität Aveiro (Portugal)



## **Kurzzusammenfassung (Deutsch):**

FENOMENO ist ein integratives Projekt mit dem Ziel, die Auswirkungen von künstlichen Nanomaterialien (MNMs) auf Gewässer besser zu verstehen. Die verbleibenden Mengen an MNMs in Kläranlagenausflüssen sind erheblich und können eine gegenüber der Reinform erhöhte Toxizität für aquatische Organismen aufweisen. Mit innovativen analytischen Ansätzen möchten wir erstmals die Verteilung und den Effekt ausgewählter Nanomaterialien (TiO<sub>2</sub> und Ag) aus Kläranlagen auf aquatische Ökosysteme (z.B. Mondsee) untersuchen.

**FENOMENO hat zum Ziel, die Verteilung von künstlichen Nanomaterialien (MNMs) aus Kläranlagen und deren Wirkung auf aquatische Ökosysteme zu untersuchen.** FENOMENO sollte uns ermöglichen, die offenkundige Kluft zwischen Laborstudien einerseits und der realen Situation im Freiland andererseits zu überbrücken. Wir wären somit in der Lage, den Verbleib und die Wirkung von MNMs aus Kläranlagen in aquatischen Ökosystemen aufzuklären und neue Frühwarnsysteme sowie eine fundierte Risikobewertung zu etablieren. Aufgrund ihrer weitverbreiteten und stetig zunehmenden Nutzung sind MNMs praktisch überall in der Umwelt vorhanden. Unter ihnen haben Silber-(Ag) und Titanoxid (TiO<sub>2</sub>)-Nanopartikel die höchste kommerzielle Bedeutung und bilden somit den größten Anteil an Nanopartikeln (NPs). Ihr Verbleib und die Auswirkungen auf die Umwelt bleiben, wie so oft, unklar. In der Natur werden MNMs normalerweise nicht in Reinform vorgefunden. Vielmehr kann ihre Reaktivität durch die sog. Corona-Bildung dominiert werden (Proteine oder oberflächenaktive Moleküle). Ein entscheidender Beweggrund für dieses Projekt ist die Tatsache, dass die **Veränderung der Eigenschaften von Nanopartikeln als Folge der Abwasserbehandlung zu einem erheblichen Anstieg der Toxizität führen kann.** Aus analytischer Sicht haben die niedrigen MNM-Konzentrationen noch bis vor kurzem ernsthafte Probleme für eine quantitative Analyse dargestellt und somit den direkten Vergleich zwischen Laborstudien und Freilandproben ausgeschlossen. Doch neueste Methoden, die mitunter von Mitgliedern dieses Konsortiums entwickelt wurden, erlauben seit kurzem auch quantitative Analysen von Freilandproben.

Grundlegend für den methodisch übergreifenden Ansatz in FENOMENO sind **innovative analytische Verfahren zur Bestimmung und Charakterisierung von MNMs in sehr niedrigen Konzentrationen (Einzelpartikel) in Wasser und Organismen**, sowie neuartige Ansätze in der Mikroskopie. Alle diese Ansätze werden speziell für die Analyse dieser Proben weiter entwickelt. Insbesondere werden wir Ag und TiO<sub>2</sub> NPs in Reinform sowie nach Passage durch Kläranlagen nach dem Modell der OECD-Prüfrichtlinien quantitativ charakterisieren. Auch Form, Größe und Oberflächenfunktion von NPs im Abwasser werden bestimmt. In Laborstudien wird die Aufnahme und chronische Wirkung von MNMs aus Kläranlagen auf Schlüsselorganismen in einem 3-stufigen Nahrungsketten-Modell (Algen, Wasserflöhe und Fische) untersucht werden. Die Auswirkungen der MNMs auf wichtige toxikologische Endpunkte werden anhand etablierter OECD -Tests eruiert. Die Ergebnisse von Bioakkumulation und Verhaltensstudien werden mit den Daten aus dem Mondsee (und einem Referenzsee) verglichen: In definierten Abständen zum Ausfluss der kommunalen Kläranlage werden saisonal Schlüsselorganismen (Wasserpflanzen, Muscheln, Algen, Wasserflöhe, Fische) gesammelt und sogenannte Biomarker (wichtige Enzyme im Stoffwechsel) auf MNM-induzierte Veränderungen untersucht. Laborbeobachtungen werden mit Ergebnissen der Freilandstudie verglichen, um die Auswirkungen von MNMs aus Kläranlagen auf die Umwelt zu beurteilen. Dies sollte in einer zuverlässigen, ethisch fundierten Risikobewertung resultieren. Darüber hinaus werden zwei unterschiedliche Ansätze entwickelt, um Frühwarnsysteme mit Diagnosefunktion zu etablieren. Diese basieren (1) auf Veränderungen im Verhalten von Wasserflöhen (Daphnien), die anhand von intelligenten Kamerasystemen mit erweiterten Mustererkennungsalgorithmen erfasst werden; und (2) auf der Analyse von Biomarkern als Anzeiger für oxidativen Stress.

**Neben wertvoller Methodenentwicklung und neuartiger nano-ökotoxikologischer Datenerhebung wird FENOMENO dazu beitragen, die Grundlagen einer adäquaten Risikoevaluierung für den Einsatz und das Management von MNMs für Mensch und Umwelt zu schaffen.**

## Short summary (English):

FENOMENO is an integrative project aiming at an understanding of the impact of end-of-life manufactured nanomaterials (MNM) on the environment. Even though MNMs are mostly removed during wastewater treatment (WWT), the remaining MNM levels in the effluents are significant and MNMs may show an increased toxicity for aquatic organisms due to their modification during the WWT. With innovative analytical approaches we will study the fate and effect of wastewater-borne MNMs in an aquatic ecosystem, develop the basis for robust evaluation systems, and design analytical sensor systems for quantitative nanoparticle detection using biochemical markers and *Daphnia* and fish as sensors. We will use cutting edge approaches to analyse and monitor the biological impact of TiO<sub>2</sub> and Ag MNMs on different trophic levels within a relevant food chain (algae-*Daphnia*-fish) at different levels, from behavioural to biochemical, from laboratory to complementary field studies.

FENOMENO is focused on the elucidation of the fate and effect of waste water-borne manufactured nanomaterials (MNM) in the aquatic ecosystem. The project comprises (i) comparative quantitative studies of neat MNMs, **MNMs in model wastewater effluents** and their **bioaccumulation in a three level food chain in laboratory studies** as well as the **effects on daphnia behaviour** and (ii) refined **chemical analyses of MNMs with down to single particle sensitivity in field samples**. The field samples will be collected at an ideal site for unravelling the effect of a real wastewater treatment plant on food webs in conjunction with the **analyses of relevant biochemical biomarkers** to elucidate the impact of MNMs on the biochemical level. By combining these two themes for the first time in a coherent study employing the latest analytical chemical and microscopic methodologies, new knowledge will be generated that enables the understanding of the impact of end-of-life MNMs on the environment and will provide the basis for robust evaluation and early warning systems, also developed in the project, with the final aim of providing adequate **risk assessment for the safe implementation of MNMs**. Due to their widespread and steadily increasing use, MNMs are found practically everywhere the environment. Among the MNMs, silver (Ag) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles (NPs) represent two MNMs examples, which are commercially applied in various high volume applications and are hence very widespread. The end-of-life MNMs fate and the impact on the environment remain here, as in many other cases, unclear. Typical MNMs are not found in pristine state in the environment. On the contrary, their behaviour may be dominated by the corona coating the NPs, often proteins or surface active molecules, aggregated or sedimented forms. A crucially important motivation for this proposed project is the fact that the **alteration of nanoparticle properties as a consequence of wastewater treatment may lead to significant increase in toxicity**. From a practical analytical point of view, the low MNMs concentrations have until recently posed serious problems for quantitative analysis and precluded a direct link between model studies and samples from field studies. However, using techniques also developed by members of this consortium, field samples have become very recently amenable to quantitative analysis. In FENOMENO we hence propose to bridge this apparent gap between lab studies on the one hand and the situation in the field on the other hand in order to be able to elucidate the fate and effect of waste water-borne MNMs in the aquatic ecosystem for the first time and to facilitate in addition to new early warning tests a well-founded risk assessment.

Key to the methodology and overall approach in FENOMENO are **innovative analytical procedures for the determination and characterization of MNMs in very low environmental concentrations in water and biological matrices** as well as novel microscopy approaches. All these approaches will be further developed, refined and applied for the analysis of samples collected during the project. In particular, we will quantitatively characterize neat Ag and TiO<sub>2</sub> NPs and NPs in effluents from model wastewater treatment plants according to OECD test guidelines. The NP shape, size, and surface functionalization in the presence of the waste water matrix will also be determined. In designated laboratory studies, the uptake and subsequent chronic effects of waste water-borne MNMs in appropriate environmental key species will be investigated in a 3-step model (laboratory) food web,

comprising algae, daphnia and fish. Following established OECD tests the impact of these MNMs on the different toxicological endpoints will be elucidated. The analytical studies on bioaccumulation and bioconcentration of MNMs in biotic components in the 3-step laboratory food chain mentioned above will be compared to data acquired from water samples and biotic components (algae, daphnia and fish), which will be collected from Lake Mondsee, Austria, at defined distances to a municipal waste water treatment plant and from a reference lake. The biotic components will be further analysed for MNM-induced effects on the previously calibrated biomarkers. Observations made during the laboratory approaches will be compared with the results of field monitoring and used to assess the environmental effects caused by waste water-borne MNMs, which will culminate, aided by distinct ethical considerations, in a reliable risk assessment. In addition, the development of two different approaches to establish early warning systems with diagnostic function are targeted, based on behavioural changes in daphnia that are analysed in line by intelligent camera systems and advanced pattern recognition algorithms and on the analysis of biomarkers for oxidative stress, among others, respectively. In addition to invaluable methodology development and novel nanoecotoxicology data, FENOMENO will contribute to provide the foundations for a **consolidated framework to address risks of MNM use and its management for humans and the environment.**