

# Samenvatting

**Lange-termijn effecten van gefabriceerde nanomaterialen:  
bodem ecotoxicologische en moleculaire benaderingen**

Het toegenomen gebruik van gefabriceerde nanomaterialen en hun mogelijke verspreiding in het milieu vereist een beoordeling van mogelijke chronische effecten op ecologische doelwitorganismen, inclusief het bodemecosysteem. Bodemorganismen spelen een cruciale rol in processen binnen het bodemecosysteem. Het gaat hierbij om processen zoals decompositie en het recyclen van voedingsstoffen. Bodemorganismen worden blootgesteld aan nanomaterialen die in de grond terecht komen, onder andere door het gebruik van rioolslib als meststof (een toepassing die in Nederland overigens niet is toegestaan maar in de meeste andere Europese landen wel) of door atmosferische depositie. Het is daarom essentieel om de effecten van nanomaterialen in deze groep organismen te bestuderen, zodat we de potentiële effecten van deze materialen in het bodem milieu beter kunnen begrijpen. Hierdoor kunnen ongewervelde bodemorganismen zoals regenwormen, pissebedden, nematoden en springstaarten worden geschaad. Negatieve effecten van blootstelling aan nanomaterialen kunnen zowel op fysiologisch als op genetisch en zelfs epigenetisch niveau optreden. Daarom zijn deze drie biologische niveaus in verschillende hoofdstukken van dit proefschrift onderzocht. Ik heb deze effecten onderzocht in de springstaart *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) en de potworm *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae). Beide soorten zijn belangrijke modelorganismen in de ecotoxicologie vanwege hun ecologische relevantie, gevoeligheid voor omgevingsstress, korte generatietijden en het gemak van kweken in het laboratorium. Fysiologische effecten zijn onderzocht door middel van lange-termijn multigeneratie testen voor nanomateriaal (NM) effecten op de overleving en reproductie van *F. candida*. Genetische effecten zijn beoordeeld door het bepalen van genexpressieprofielen bij meerdere generaties van *F. candida* blootgesteld aan twee geselecteerde nanomaterialen. Ten slotte zijn epigenetische effecten verkend door het bepalen van DNA-methyleringspatronen in zowel *F. candida* als *E. crypticus*. Samen kunnen deze drie benaderingen helpen bij het verkrijgen van een beter begrip van de onderliggende stress respons mechanismen bij in de bodem levende ongewervelde dieren.

Als eerste heb ik de toxiciteit van vijf verschillende gefabriceerde nanomaterialen beoordeeld voor de springstaart *F. candida*. Geselecteerde nanomaterialen waren: wolframcarbide-kobalt (WCCo), koperoxide (CuO), ijzeroxide (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), organisch pigment en meerwandige koolstofnanobuisjes (MWCNT's). Oplosbare koper(II)-, kobalt- en ijzerchloride-zouten waren als positieve controles meegenomen in de testen. Een gestandaardiseerde test is gebruikt waarbij is gewerkt volgens de richtlijnen van de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO) om de effecten op overleving en reproductie te meten. Toxiciteit is gerelateerd aan totale metaalconcentraties in bodem en opgeloste metaalconcentraties in het poriewater. Geen van de nanomaterialen had nadelige effecten op de overleving en voortplanting van de springstaarten bij concentraties tot 6400 mg per kg droge grond. Blootstelling aan de als ionische referenties geteste Cu-, Co- en Fe-chlorides veroorzaakte een daling van 50% in springstaartreproductie bij concentraties van respectievelijk 981, 469 en 569 mg metaal per kg droge grond. De afwezigheid van directe (korte termijn-) toxiciteit van de nanomaterialen kon gedeeltelijk worden verklaard door de lage poriewatermetaalconcentraties, wat een lage oplosbaarheid of langzame oplosnelheid suggereert (*Hoofdstuk 2*).

In *Hoofdstuk 3* onderzocht ik de fenotypische respons van *F. candida* geassocieerd met blootstelling gedurende meerdere generaties aan CuO en WCCo nanomaterialen. Dit zijn twee nanomaterialen op metaalbasis, die veel worden gebruikt voor commerciële en industriële toepassingen. Overleving en reproductie werden in geen van vier opeenvolgende generaties van *F. candida* beïnvloed door CuO-NM in concentraties tot maar liefst 6400 mg Cu per kg droge LUFA 2.2. grond. WCCo had echter wel degelijk invloed op de overleving en reproductie vanaf de derde generatie, met EC50-waarden tussen 2400 en 5600 mg NM per kg droge grond. Echter, populatieherstel werd waargenomen in de 5e en 6e generatie die in schone grond werden gehouden. Histologisch onderzoek toonde aan dat hoge concentraties WCCo-NM (3200 mg/kg) weefselschade en verlies van microvilli van de darmepitheelcellen induceerden. Dat de negatieve effecten van WCCo-NM pas tot uiting komen in de derde generatie, terwijl bij de twee voorgaande generaties geen waarneembare effecten genoteerd werden, suggereert dat de toegebrachte schade accumuleert van de ene generatie op de andere. Zulke multigeneratie-effecten worden niet meegenomen in de gangbare risicobeoordeling.

In *Hoofdstuk 4* onderzocht ik de transcriptionele respons van *F. candida* geassocieerd met blootstelling aan meerdere generaties aan CuO en WCCo NM's. Expressie van vier doelgenen waarvan bekend is dat ze reageren op stress, is onderzocht met behulp van kwantitatieve PCR op verschillende blootstellingsniveaus (controle, 800 en 3200 mg/kg droge grond) en gedurende verschillende generaties. Hoewel de blootstellingsniveau 's onder de toxische

drempelconcentraties lagen, werd de expressie van alle genen significant beïnvloed als reactie op NM-blootstelling. Bovendien werd een significante interactie waargenomen tussen historische en huidige blootstelling en ook tussen historische blootstelling en generatie. We suggereren dat genexpressie-testen fysiologische veranderingen kunnen detecteren als gevolg van NM-toxiciteit bij blootstellingsniveaus zonder fenotypische (reproductie) gevolgen voor de springstaartgeneraties blootgesteld aan CuO nanomaterialen of de eerste generaties blootgesteld aan WCCO nanomaterialen.

Een van de mogelijke manieren waarop effecten van stress doorgegeven kunnen worden naar een volgende generatie is via overerving van epigenetische merkers. Daarom onderzocht ik of fenotypische plasticiteit veranderingen veroorzaakt in epigenetische effecten tijdens de stress-respons van springstaarten en enchytraeën die blootgesteld zijn aan koper. We wilden onderzoeken of totale cytosine en locus-specifieke CpG-methylering aanwezig zijn in *F. candida* en *E. crypticus*. Tevens wilden we achterhalen of methyleringspatronen, indien aanwezig, beïnvloed worden door blootstelling aan toxische concentraties. LC-MS/MS-analyses en bisulfietsequencing werden uitgevoerd om CpG-methylering van de organismen te bepalen. We toonden voor de eerste keer een totaal niveau van 1,4% 5-methylcytosine methylering aan in het genoom van *E. crypticus* en afwezigheid van zowel totaal cytosine als locus-specifieke CpG methylering in *F. candida*. In *E. crypticus* werd methylering van CpG-sites waargenomen in de coderende sequentie (CDS) van het huishoudgen elongatiefactor 1-alfa (*Ef1α*), terwijl cytosine-methylering in de CDS van het stress-induceerbare Heat Shock Protein 70-gen (*HSP70*) heel laag was. Dit bevestigde eerdere waarnemingen dat cytosine-methylering verschilt tussen huishoud- en stress-induceerbare genen in ongewervelde dieren. Deze patronen werden echter niet beïnvloed door blootstelling van *E. crypticus* aan koper (II) sulfaatpentahydraat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) gemengd met LUFA 2.2. grond bij sub-letale effectconcentraties die de reproductie met 10%, 20% en 50% verminderden (*Hoofdstuk 5*). Hoewel verschillen in CpG-methyleringspatronen tussen specifieke loci een functionele rol suggereren voor DNA methylering in *E. crypticus*, is genoom-brede bisulfietsequencing nodig om te verifiëren of omgevingsstress dit epigenetische mechanisme daadwerkelijk beïnvloedt.

Met dit proefschrift is onze kennis over toxiciteit en milieurisico's van verschillende gefabriceerde nanomaterialen voor het bodem-ecosysteem belangrijk toegenomen. Verder draagt dit proefschrift bij aan een beter begrip van de effecten van langdurige NM-blootstelling door een uitgebreide analyse van de fenotypische en transcriptionele responsen die zijn geassocieerd met NM-blootstelling over meerdere generaties. We hebben ontdekt dat geen van de geselecteerde gefabriceerde nanomaterialen nadelige effecten heeft op de overleving en reproductie van springstaarten na blootstelling gedurende een enkele generatie. Nadelige effecten waren zelfs niet zichtbaar bij concentraties zo hoog als 6400 mg/kg droge grond: een concentratie die aanzienlijk hoger is dan de te verwachten concentratie in het milieu. Hiermee lijken onze resultaten de zorgen

over mogelijke effecten van nanomaterialen op de bodemfauna weg te nemen. Echter, een blijvende zorg is dat blootstelling aan nanomaterialen op de lange termijn (bij blootstelling over meerdere generaties) wel negatieve milieueffecten kan hebben als gevolg van de opname van nanomaterialen door organismen en de lotgevallen van nanomaterialen in het milieu. Lange-termijn effecten van nanomaterialen kunnen ook van invloed zijn op lagere niveaus zoals celweefsels, genexpressie en epigenetica. Dit kan vervolgens leiden tot schadelijke effecten op organismeniveau en wellicht zelfs op populatieniveau. Onze resultaten hebben ons bijvoorbeeld geleerd dat nadelige effecten van nanomaterialen soms pas optreden na een aantal opeenvolgende generaties zonder dat er hierbij waarneembare effecten waren opgetreden in eerdere generaties. Dit suggereert dat de toegebrachte schade accumuleert van de ene generatie op de andere. Zulke multigeneratie-effecten worden niet meegenomen in de gangbare risicobeoordeling van stoffen. De mogelijkheid dat schade zich over meerdere generaties kan ophopen, vereist dus meer aandacht bij de risicobeoordeling van (persistente) stoffen.

Verder suggereert de waargenomen inductie van stress-respons genen bij blootstellingsniveau 's waarbij nog geen fenotypische effecten optraden, dat het gebruik van moleculaire benaderingen zoals genexpressie-testen, geschikt is om te testen of organismen daadwerkelijk worden beïnvloed door blootstelling aan gefabriceerde nanomaterialen.

Ik raad aan om multigeneratie-testen uit te voeren voor toxische stoffen zoals nanomaterialen, die nieuw en moeilijk te beoordelen zijn, aangezien lange-termijn gedrag van nanomaterialen in de omgeving vrijwel onbekend is en omdat de meeste nanomaterialen naar verwachting niet afbreekbaar zijn en gedurende langere tijd in het milieu aanwezig zullen blijven. Gezien de complexiteit van de (lange-termijn) lotgevallen van nanomaterialen in het milieu en de daaropvolgende toxische effecten, stel ik ook voor om meer dissolutie- en bioaccumulatiestudies te doen in plaats van reproductie-testen, omdat dergelijke studies meer informatie zullen verschaffen over het lot en gedrag van nanomaterialen op de lange termijn.

Ten slotte, als alternatieve benadering op bovenstaande genoemde onderzoeksmethoden, heb ik onderzocht of epigenetica-gemedieerde fenotypische plasticiteit (d.w.z. DNA methylering in dit proefschrift) een rol speelt in de stressrespons van springstaarten en enchytraeën blootgesteld aan koper, een metaal waarvan eerder is aangetoond dat het toxische effecten veroorzaakt bij deze organismen. Ik nam alleen DNA methylering waar in *E. crypticus* en merkte hierbij op dat dit niet werd beïnvloed door blootstelling aan koper. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat koper andere moleculaire processen kan beïnvloeden, die heel anders zijn dan de processen die optreden na blootstelling aan bijvoorbeeld cadmium of zink en dat koper daarom mogelijk geen invloed lijkt te hebben op DNA methylering. Het zou interessant zijn om in de toekomst andere metalen te testen om te zien of specifieke metalen een specifiek stressrespons mechanisme veroorzaken met betrekking tot veranderingen in DNA methyleringspatronen. Ik raad ook aan om alternatieve epigenetische mechanismen, zoals histon-modificaties, te onderzoeken, omdat dergelijke mechanismen al zijn waargenomen bij andere organismen die geen DNA methylering hebben. Hoewel niet overdraagbaar naar de volgende generatie, kunnen zulke alternatieve mechanismen mogelijk betrokken zijn bij de stressrespons van organismen.

Hoewel dit proefschrift voortbouwt op onze huidige kennis over nano-ecotoxicologie, zijn we nog ver verwijderd van een volledig begrip van multi-generatie effecten van nanomaterialen in de omgeving.