천연유기물을 포함한 산화아연 나노입자 분산배지의 생태독성평가 적용성 연구

Study on ZnO Nanoparticle Dispersions in Test Media Including Natural Organic Matter for Ecotoxicological Assessment

박선영 · 김경태 · 신유진 · 김지은 · 이재우 · 조은혜 · 성화경 · 김필제 · 최경희 · 엄익춘[†]
Sun-Young Park · Kyung-tae Kim · Yu-jin Shin · Ji-eun Kim · Jae-woo Lee · Eunhye Jo
Hwa kyung Sung · Pil-je Kim · Kyung-hee Choi · Ig-chun Eom[†]

국립환경과학원 환경건강연구부 위해성평가연구과

Risk Assessment Division, National Institute of Environmental Research (NIER)

(Received January 4, 2017; Revised July 4, 2017; Accepted November 27, 2017)

Abstract : Toxicity and fate assessment is necessary in the evaluation of the environmental, health and safety risks of engineered nanomaterials (ENMs). Therefore, in order to ensure the reproducibility, reliability and relevance of ENMs toxicity results, stable and monomodal dispersion protocols in toxicity test media are needed. Zinc oxide nanoparticles (nZnO) are widely used in various products such as cosmetic products, paper, paints etc. In this study, nZnO dispersions in ecotoxicity test media were produced by following a series of steps of modified National Institute of Standards and Technology (NIST) Special publication 1200-5. In addition, natural organic matter (humic acid (HA)) was used as a stabilizing agent to disperse nZnO in the test media. The hydrodynamic diameters (HDD) of the nZnO in dispersion ranged between 150 and 200 nm according to the dynamic light scattering (DLS) measurement. Based on these dispersions in ecotoxicity test using ecological species (*Oryzias latipes*, *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chironomus riparius*), dispersion protocol was found to have a considerable potential in ecotoxicity test of ENMs.

Key Words : Zinc Oxide Nanoparticles (nZnO), Ecotoxicity, Nanoecotoxicity Test Media

요약 : 나노 물질의 활용이 증가하면서, 환경 내 나노물질의 독성 및 거동에 관한 연구가 필수적인데, 나노독성평가의 신뢰도를 확보하기 위해서는 노출 배지 내 나노물질의 안정적인 분산방법에 대한 연구가 필요하다. 이에 본 연구에서는 National Institute of Standards and Technology (NIST)에서 제안한 천연유기물을 활용한 나노 분산액 제조 방법을 토대로 화장품 등 다양한 분야에서 널리 사용되고 있는 산화아연 나노입자 생태독성 평가를 위한 분산배지 조제방법을 정립하여 다양한 시험종에 대한 수생태시험 적용성 평가를 수행하였다. 천연유기물을 활용하여 분산성이 향상된 시험배지 내 나노 입자의 분산 안정성을 확인하기 위해 제조 후, 96시간까지의 동적광산란(Dynamic Light Scattering, DLS)측정 결과 입자 크기 분포의 평균값이 약 150-200 nm의 수준을 유지하면서 나노입자의 안정성을 확인할 수 있었다. 이를 통해 천연유기물을 활용하여 급속계 나노물질의 배지 내 분산력을 향상시키는 방법이 수생태독성시험에 적용 가능성이 높을 것으로 판단되었고, 수생태독성 시험종(어류, 물벼룩, 갈따구, 조류 등)에서의 독성 영향을 확인한 결과 물벼룩 및 갈따구를 이용한 급성 독성 실험에 적합한 것으로 확인되어 향후 나노물질의 수생태독성평가에서 재현성 높은 결과 확보 방안을 도출에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

주제어 : 산화아연 나노입자, 생태독성, 나노생태독성 분산배지

1. 서론

일반적으로 나노물질은 100 nm 이하의 입자를 총칭하는데, 이 때 원 물질과는 다른 독특한 특성을 가지게 되어 의약학, 전자 산업 등의 다양한 분야에서 이용되고 있다.¹⁻⁵⁾ 특히, 은, 금, 산화아연 등의 금속성 나노물질의 활용도는 매우 높아, 급증하는 사용량으로 인해 환경으로의 배출량이 증가하는 추세이고, 기존의 물질과는 생태계 및 인체에 기존의 물질과는 다른 악영향을 미칠 수 있어서 이를 평가하는 독성 평가 기법의 개발의 필요성이 대두되고 있다.¹⁻⁶⁾ 특히, 나노물질이 포함된 제품은 생산, 사용 및 폐기 후 수계 환경으로 최종적으로 배출되는 되기 때문에 현재 나노물질에 대한 수생태시험종에 대한 다수의 독성 영향에 대한 연구가 진행되고 있지만, 나노물질에 대한 노출 시험법

에 대해서는 명확한 기준이 제시되어 있지 않다. 특히 시험 노출 기간 동안 나노물질 입자의 분산을 유지되지 않으면 나노입자 자체의 독성 평가 결과의 신뢰성을 보장하기 어렵다. 일반적인 독성 평가용 배지에 나노물질을 노출했을 경우, 급격한 응집으로 인해 나노입자 자체의 독성 영향을 명확하게 규명할 수 없기 때문이다.⁷⁻¹⁰⁾ 이에 NIST (National Institute of Standards and Technology)에서는 나노입자의 생태독성평가에서 명확하고, 재현 가능한 결과를 도출하기 위한 이산화티타늄 나노입자의 표준화된 노출 배지 내 나노입자 분산액 조제방법을 제안하였다.⁷⁾ 수생태독성시험 노출 기간 동안 이산화티타늄 나노입자의 적절한 분산 유지하기 위해서는 입자 간의 응집을 억제할 안정제가 필요하다. 이에 NIST의 표준화 배지에서는 안정제로 환경 매체에서 비특이적인 안정적인 분산을 유도하는 것으로 알려진 천연

[†] Corresponding author E-mail: hansaramnim@korea.kr Tel: 032-560-7230 Fax: 032-560-2038

유기물(natural organic matter)을 적용하였다.⁷⁻¹⁰⁾ 나노입자의 분산력을 향상시키는 방안으로 휴믹산을 활용한 이산화티타늄의 분산액은 72시간까지 안정적으로 입자 분산을 유지하고 있음을 확인할 수 있었고, 수생태독성평가의 활용 가능성을 확인하였다.⁷⁾ 본 연구에서는 NIST에서 제안한 제조방법을 바탕으로 이산화티타늄 외 금속계 나노입자의 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

본 연구에서 대상 나노물질로 선정한 산화아연 나노입자는 주로 화장품 등 개인미용 및 위생용품 사용되어 있고, 특히 자외선 차단제의 주요 성분으로 실생활에 밀접하게 연결되어 있다. 그 외에도 광촉매 등의 다양한 사용용도로 확대됨에 따라 생태계로의 배출의 가능성이 매우 높은 것으로 알려져 있다.²⁻⁵⁾ 국내에서는 금속 나노물질 중 이산화티타늄과 이산화구소에 이어 세 번째로 유통량이 많고 2008년 환경부 조사 이후 기하급수적으로 제조 및 수입량이 증가하고 있다.^{11,12)} 산화아연 나노입자의 주요 환경 중 배출 경로로는 수계로 파악되는데,³⁾ 무척추동물(물벼룩 등),^{6,13,14)} 어류(잉어, 송사리 등),^{6,13,14)} 어패류¹⁴⁾ 등의 수생생물에 독성영향을 미치는 것으로 확인되고 있다.

주로 산화아연 나노입자에서의 아연이온(Zn^{2+})의 발생으로 인한 산화적 스트레스와 광활성 특성에 따른 독성 영향이 중요한 메커니즘으로 파악되고 있으나,⁶⁾ 물벼룩을 이용한 최근 연구에서 산화아연 나노입자의 생체 내 축적이 독성 영향이 미치는 영향이 크게 미치는 것으로 확인되었다.¹²⁾ 따라서 명확한 독성 경로 파악을 위해서는 평가 대상 생물 종의 확대, 다양한 노출 조건(이온강도, pH, 유기탄소 등)에 대한 평가 및 필요할 것으로 보인다.^{6,14)}

기존 연구들^{4,11,12)}에서는 산화아연 나노입자의 노출 방법이 통일되지 않아 연구 결과의 단순 비교는 불가능하다. 다만, 천연유기물 등의 분산 보조제를 사용하지 않고 본 연구와 유사한 노출 조건에서 수생태시험을 진행한 연구¹³⁾에서는 기존 생태 독성 평가용 배지(ISO 표준 배지, EPA 배지, OECD M4 배지)에 산화아연 나노입자를 분산시킨 후, 시험 수행 기간 동안 700마이크로미터 수준까지 급격하게 나노입자가 응집되는 것을 확인할 수 있었다.¹³⁾ 기존 나노 독성 평가에서는 이러한 배지 내 나노입자의 응집으로 인해 노출기간 동안의 입자 분산의 안전성을 확보할 수 없어 나노물질의 입자 자체에 대한 명확한 독성 파악에는 어려움이 있었다. 따라서 산화아연 나노입자의 수생태 독성 평가에서 배지 내 나노입자의 안정성을 확보한다면 다양한 생물종에서의 입자 본래의 독성을 평가하는데 유용할 것으로 보인다.

이에 본 연구에서는 NIST 표준화 분산 배지 제조방법을 바탕으로 하여 천연 유기물을 이용한 산화아연 나노입자의 생태독성평가를 위한 표준화 배지를 제조하였다. 또한 분산 안정성이 확인된 본 배지로 다양한 수생태독성시험종(조류, 어류, 무척추동물 등)에 대한 급성 노출 시험을 수행하여 수생태독성 평가 적용성을 확인하였다.

2. 연구방법

2.1. 산화아연 나노입자 생태독성 시험배지 제조

본 연구에서는 일반적인 ISO 배지의 80% 정도의 염이 포함된 배지(Table 1)에 20 mg/L의 천연유기물을 적용하여 나노입자의 분산을 향상시키는 NIST에서 제안한 이산화티타늄나노입자 생태독성 평가용 분산액 제조법⁷⁾을 바탕으로 수행하였다. 이 때 분산 안정제로 사용된 천연 유기물은 NIST 방법과 동일하게 Swansee river에서 채취한 휴믹산(humic acid, HA)을 구매하여 적용하였고, 대상 나노물질은 입자크기가 50 nm 이하의 산화아연 나노입자(Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA)를 사용하였다. 먼저, 시험배지를 제조하기 위해 먼저, 증류수에 HA 분말을 넣고, 48시간 이상 교반하여 100 mg/L HA 농축용액 제조하였다(pH 4.0 ± 0.2). 그 다음 증류수에 200 mg/L 농도의 산화아연 나노입자를 넣고, 15분간 초음파 분쇄기로 분산시켜 산화아연 나노입자 분산액, ISO 생태 시험 배지용 원액(Table 1) 및 휴믹산 농축 용액을 Table 2와 같이 최종 조성으로 혼합하여 사용하였다. 이 때, 제조된 배지의 경도 170 mg/L (as $CaCO_3$) 및 pH는 7.0 ± 0.5 를 유지되는 것으로 확인되었고, 이 때 배지 내 염 농도는 일반적인 ISO 배지의 80% 정도로 기존의 M4, EPA 배지 등에 비해 낮은 편으로 확인되었다.

2.2. 배지 내 산화아연 나노입자의 특성분석

제조된 배지 내 산화아연 나노입자의 크기를 확인하기 위해 제조된 배지를 그리드(300 mesh, 구리)에 떨어뜨린 후 데시케이터에서 자연 건조한 다음 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL, Japan)을 이용하여 확인하였다.

또한 시간에 따른 생태 배지 내 산화 아연 입자의 입도 분포의 변화를 동적광분산계(Dynamic light scattering, DLS) 측정을 통해 확인하였다. 분산액 제조 후, 시간 별(2, 6, 24,

Table 1. ISO test 6341 aqueous stocks¹³⁾

ISO test water stock	g/L DI water
A: 3 mmol potassium chloride (KCl)	0.23
B: 31 mmol sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	2.59
C: 20 mmol magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	4.93
D: 80 mmol calcium chloride dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	11.76

Table 2. Composition of nZnO dispersions

Substance	Concentration
HA	20 mg/L
ZnO	100 mg/L
Potassium chloride (KCl)	0.052 mmol
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	0.54 mmol
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.33 mmol
Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.14 mmol

48, 72, 96시간)로 동적광산란 입도분석기(ELS-Z Otsuka, Japan)를 이용하여 600 nm의 레이저 파장에서 입자 직경 변화 및 표면전하의 변화를 확인하였다.

2.3. 급성독성실험

2.3.1. 어류 배아 및 난황단계 치어 독성시험

OECD 시험지침 212¹⁶⁾에 준하여 다음과 같이 수행하였다. 실험에 이용한 어종은 개량송사리(Medaka, Orange-red, *Oryzias latipes*)로, 초기단계(수정란 단계)에서 산화아연 나노입자를 노출시킨 후, 배아(embryo) 시기와 부화 직후의 난황단계 자어(sac-fry)에서 치사영향, 발생장애, 기형 등을 관찰하였다. 시험물질의 노출은 시험군 수정란에서부터 부화한 자어 개체의 난황이 완전히 흡수되기 직전 또는 대조군의 자어가 먹이 공급 없이 생존 가능한 기간 동안 실시하였다. 이때, 수정란은 건강한 송사리 성어로부터 산란된 알 중에서 수정 후 낭배기이전 단계의 개체를 현미경 관찰로 선별하여 각 처리군 별로 10개씩을 6웰 플레이트에 노출하여 4반복 시험하였다. 노출시점은 수정란에서부터 대조군의 부화 후 난황 흡수가 완료되는 시점(부화 후 5일)까지 설정하였다. 천연유기물을 포함한 배지와 포함하지 않은 배지에서 노출농도를 대조군, 25, 50, 100 mg/L로 설정하여 비교 평가하였다. 노출기간은 14~16일간 노출하였으며, 48시간마다 노출용액을 교환하여 배지 내 산화아연의 농도 및 분산정도를 균일하게 조정하였다. 초기 발생과정에서 시험물질의 영향을 확인하기 위하여 실체현미경(Stemi SV11, Zeiss co., 독일)을 이용하여 24시간 마다 치사율, 기형 발생률, 부화율을 주요 종말점으로 측정하였다. 부화율은 난 상태에서 치사한 것과 부화되지 아니한 것을 모두 포함하고, 배아는 심장박동을 정지한 것을 기준으로 하였다.

2.3.2. 물벼룩 급성독성시험

산화아연 나노입자에 대한 영향을 평가하기 위해 OECD 시험지침 202에 따라 물벼룩(*Daphnia magna*) 급성독성시험을 수행하였다.¹⁷⁾ 실험에 이용한 *D. magna*는 생후 24시간미만의 개체를 이용하였으며, 48시간 동안 노출 후 24시간 및 48시간 경과 시점에 유영저해 개체를 확인 후 관찰하였다. 노출농도는 대조군(사육수, 천연유기물 포함/비포함 ISO배지)을 포함하여 총 8개 농도(대조군, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/L)이며, 농도마다 총 20마리(5마리/비커, 4반복)를 노출하였다. 노출조건은 사육조건과 동일한 20°C ± 1°C, 조명 명/암 = 16시간/8시간이며 노출기간 동안 먹이공급은 하지 않았다.

2.3.3. 조류 독성시험

시험에 사용된 조류(*Pseudokirchneriella subcapitata*)는 23°C ± 2°C, 24시간 광조건, 6,000 Lux, 100 rpm 조건으로 주 1회 계대 배양한 것을 사용하였으며, OECD 시험지침 201¹⁸⁾에 따라 실제 독성 평가 수행 전 본 생태독성 시험배지에서 조류 성장저해시험 가능성 여부를 판단하기 위하여

노출 배지의 안정성을 확인할 예비 시험을 진행하였다. 이때, 대조군은 OECD 시험지침에 제시된 배지를 이용하고, 기존의 ISO 배지와 HA이 20 mg/L 농도로 분산된 ISO 배지를 이용하였다. 시험은 농도 당 3회 반복 설정하여 시행하였다. 농도별로 준비된 시험용액을 100 mL 용량의 삼각플라스크에 넣고 조류를 1 × 10⁴ cells/mL 농도로 접종하였다. 시험은 배양과 동일한 조건으로 수행하였으며 시험기간 동안 시험용액을 교환하지 않는 지수식 방법으로 노출하였다. 조도가 균일하게 가해지도록 24시간 간격으로 진탕배양기 내 플라스크 배치의 열과 행을 순차적으로 바꿔주었다. 노출 후 24시간, 48시간 및 72시간에 대조군과 시험물질 처리군의 모든 플라스크에서 시료를 채취하여 세포계수기로 조류의 수를 계수하고 현미경으로 형태이상 등의 특징을 관찰하였다. 이때, 예비실험 결과 천연유기물을 포함한 배지의 안정성이 확보되지 않아 본 실험은 진행되지 않았다.

2.3.4. 갈따구 급성독성시험

시험에 사용된 갈따구(*Chironomus riparius*)는 20°C ± 2°C, 명/암 = 16시간/8시간 조건에서 배양되었고, 일반적으로 갈따구 독성 시험에서 사용되는 4기 유충을 이용하여 예비실험을 진행하였다. 4기 유충 각 10마리씩 24시간, 48시간 동안 EPA배지(사육수) 대조군, ISO 배지 대조군, 천연유기물을 포함한 ISO 배지를 포함하여 산화아연 나노입자 25, 50, 100 mg/L에 3반복 노출하였다. 예비실험 결과 행동 저해 및 치사 등이 나타나지 않아 OECD 시험지침 235¹⁹⁾에 따라 본 실험을 다음과 같이 진행하였다. 10 mL의 배지를 포함한 100 mm 페트리디쉬에 1기 유충을 각 10마리씩 대조군(사육수, 천연유기물 포함/비포함 ISO배지), 0.1, 1, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg/L 농도로 24시간 동안 3반복 처리한 후, 치사 및 유영저해 영향을 확인하였다.

2.3.5. 통계 처리

각 대상 시험종의 치사율 등의 종말점은 미국 환경보호청에서 제공하는 프로빗 분석 프로그램을 이용하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분산 안정성

배지 제조 후, 배지 내 산화아연 나노물질을 투과전자현미경으로 확인한 결과 다양한 형태로 고르게 분산되어 있음을 확인할 수 있었고(Fig. 1), 시험배지 내 산화아연 나노입자의 분산 안정성을 확인하기 위해 제조 후, 96시간까지의 DLS 측정 결과 입자 크기 분포의 평균값이 약 150 nm - 200 nm를 유지됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

또한, 표면 전하는 제조 직후부터 72시간까지 -20~-17 mV 수준으로 나타나고 있는데, 이를 통해 천연유기물이 포함된

Fig. 1. TEM image of the particles in media.

Fig. 2. DLS measurement of nZnO dispersion.

Table 3. Zeta potential of nZnO dispersion

Time (h)	Zeta (mV)
0	-19.45 ± 1.88
24	-17.12 ± 2.66
48	-17.17 ± 0.41
72	-17.44 ± 1.13

배지 내에서 나노 입자 표면이 음전하를 띠면서 전기적 반발력을 유지하게 되어, 나노물질의 입도 분포가 안정적으로 유지되는 것으로 판단된다(Table 3).

산화아연의 나노입자의 분산성에 대한 고려 없이 진행된 선행연구¹³⁾에서 확인한 ISO 표준 배지, EPA 배지, OECD M4 배지 등의 일반적인 생태독성배지 내 산화아연 나노입자의 분산 실험 결과를 보면,¹³⁾ 초기 분산은 100 nm 정도의 평균 입자크기 분포를 유지하였지만, 48시간 이후에는 약 4 μm에서 720 μm까지 입자 분포가 증가하는 것으로 나타났다. 기존 생태독성배지를 이용한 급속계 나노물질의 수 생태독성 평가에서는 나노입자가 급격하게 응집되어 노출 기간 동안의 입자 분산의 안전성을 확보하기 어려운 것으로 확인되었다. 본 연구에서의 천연유기물을 적용한 분산성이 향상된 본 배지의 경우에는 생태독성평가 적용성이 높다고 판단된다. 그러나 Mohd Omar²⁰⁾에 따르면 유기물이 나노입자의 표면전하에 영향을 미치면서 수환경 중 산화아연 나노입자의 응집이나 분산 안정성에 큰 영향을 미치는 것

으로 보이는데, 이러한 천연유기물의 존재가 독성 평가를 진행하는데 나노입자의 분산을 향상시키는 반면, 나노입자의 독성에 영향을 미칠 가능성에 대한 고려가 필요할 것으로 보인다.

3.2. 독성 영향 평가

앞서 제조된 100 mg/L의 산화아연 나노입자를 포함한 생태독성 시험배지를 이용하여 각 생태독성 시험종(송사리, 물벼룩, 조류, 깔따구 등)에서의 독성영향을 확인하였다.

먼저, 송사리 배아 및 난황단계 치어를 이용한 독성 시험에서는 치사, 부화 및 기형 여부에 대해서 확인한 결과, 산화아연 나노입자의 노출에 따른 영향을 확인할 수 없었으나, 천연유기물의 유무와 상관없이 두 대조군 모두에서 부화 지연율이 높게 나타났다. 또한 산화아연 나노물질 50 mg/L 처리군에서 가슴지느러미가 접힌 채 움직이지 못하는 개체가 한 마리 확인되었으나 다른 반복 노출군에서는 관찰되지 않아, 산화아연 나노입자의 노출에 대한 영향인지를 판단할 수 없었다. 이를 통해 산화아연 나노물질이 어류의 배아 및 난황 단계에서의 독성 영향을 크게 유발하지 않았음을 확인할 수 있었으나, 나노물질이 포함되지 않은 대조군에서의 부화 지연이 관찰되었다. 이는 송사리 초기발달 단계에서 산화아연 나노입자 노출에 따른 독성 영향이 낮은 것으로 보이지만, 염 농도가 비교적 낮은 ISO 배지에 노출된 송사리 배아 및 수정란이 영향을 받은 것으로 판단되어 노출군과 대조군 간의 비교 분석이 불가능하였다. 본 나노 분산이 향상된 배지는 어류 초기발달단계 영향시험에 활용할 경우 명확한 독성 영향을 확인할 수 없어 적용하기 어려울 것으로 보인다.

물벼룩 급성독성시험에서는 대조군에서의 배지의 변화에 따른 영향이 없는 것으로 나타났다. 산화아연 나노입자 노출 결과 노출 최저농도인 0.78 mg/L에서는 유영저해를 보이는 개체는 관찰되지 않았으나, 1.56 mg/L 이상의 모든 농도군에서 유영저해 개체가 관찰되었다(Table 4). 노출된 물벼룩의 유영저해율은 1.56 mg/L, 3.13 mg/L, 6.25 mg/L 농도군에서 각각 15%, 80% 및 100%로 나타나, 물벼룩 48시간 EC₅₀은 2.29 (1.94-2.70) mg/L으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 국립환경과학원¹³⁾에서 확인한 일반 ISO배지에 산화아연 나노입자를 단순 분산시켜 도출한 물벼룩 48시간 EC₅₀인 1.28 (1.13-1.44) mg/L과 비교한 결과 천연 유기물의 유무에 따른 큰 독성의 차이를 확인할 수 없었다. 일반

Table 4. Acute toxicity of nZnO in *D. magna*

nZnO conc (mg/L)	24 h Immobilization (%)	nZnO conc (mg/L)	48 h Immobilization (%)
0.78	0 ± 0	0.78	0 ± 0
1.56	0 ± 0	1.56	15.0 ± 16.6
3.13	20.0 ± 14.1	3.13	80.0 ± 20.0
6.25	65.0 ± 16.6	6.25	100.0 ± 0
12.5	80.0 ± 14.1	12.5	100.0 ± 0

Fig. 3. Media test for alga growth inhibition test.

적으로 천연유기물이 다량 포함된 수질 조건에서 산화아연 나노물질 등 급속계 나노물질의 독성영향이 저감된다고 알려져 있는데, 본 배지에서 사용한 Suwannee river의 휴믹산이 다른 천연유기물에 비하여 황의 용량이 부족하기 때문에 독성영향의 저감이 나타나지 않았을 가능성이 있지만,²¹⁾ 배지 내에서 급격한 나노입자가 응집된 경우에 물벼룩 등의 수생생물종에서의 섭취 등으로 인한 체 내 축적의 차이가 나타날 가능성도 있다. 최근 연구²⁰⁾에서 산화아연 나노입자의 체내 축적이 독성 유발의 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었기 때문에 본 배지를 이용한 향후 독성연구에서는 나노입자의 응집 차이로 인한 독성 영향에 대한 고려가 필요할 것으로 보인다.

OECD 시험지침서¹⁸⁾에 따르면 조류를 이용한 급성 독성 실험에서는 시험기간 동안 대조군에서 초기접종량 대비 최소 16배 정도 생물량 증가해야 한다고 제시되어 있다. 그러나 본 연구의 조류 실험 결과 천연유기물의 유무와 상관없이 대조군에서 약 6배 정도 생물량 증가하는 것으로 관찰되어, 본 배지는 조류를 이용한 급성 독성 평가에는 적합하지 않은 것으로 보인다(Fig. 3). 이러한 결과의 원인으로는 어류 초기단계 노출 시험 결과와 유사하게 본 연구에서 사용되는 ISO 배지의 조성이 OECD 시험지침서에 첨부된 조류의 시험배지에 사용되는 필수영양소가 부족하기 때문에 발생된 구조적인 문제점으로 생각된다.¹⁸⁾ 또한 천연유기물이 일부 조류의 생장에 영향을 미친다고 알려져 있어 이로 인한 조류 성장 저해의 가능성도 있을 것으로 보인다.²²⁾

갈따꾸에 대한 급성 독성 영향을 확인하기 위해서 노출 농도 설정 및 배지 염의 영향을 확인하기 위해 4기 유충을 사용한 예비 급성 독성 평가를 수행하였다. EPA배지(사육수) 대조군, 천연유기물 포함 ISO 배지 대조군 및 전 처리군(25, 50, 100 mg/L)에서 치사 및 이상 개체(유형 저해) 관찰되지 않아 어류 배아 및 수정란, 조류 등과 달리 배지 내 염, 유기물 등의 영향을 받지 않는 것으로 확인되었고, 다른 수생생물종에 비해 산화아연 나노입자에 대해 감수성이 가장 예민하지 않은 것으로 보인다. 이에 최대 노출 농도를 100

mg/L으로 설정하여 OECD 시험지침¹⁹⁾에 따라 1기 유충을 사용한 급성 유형 저해 실험을 0.1, 1, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg/L의 산화아연 나노입자를 노출시킨 결과, 가장 높은 처리 농도 100 mg/L에서도 4기 유충과 마찬가지로 치사 및 유형저해를 관찰되지 않았다. 다른 생물종에 비해 산화아연 나노입자에 대한 치사 등의 급성 독성을 확인할 수 없었지만 본 배지를 활용한 단기 노출에 따른 분자 수준의 독성 지표 등의 활용을 통한 독성 기작 연구의 적용 가능성을 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과로 미루어 보아 본 연구에서의 분산 배지의 경우, 초기 어류 및 조류에 대해서는 배지 내 염 농도, 천연유기물 유무 등의 영향을 받아 적용이 어려울 것으로 보이지만, 물벼룩 및 갈따꾸를 이용한 급성 독성 노출 평가에서는 유용하게 활용될 수 있을 것으로 보인다.

본 연구는 나노입자의 생태독성 평가를 위하여 표준화된 실험법을 개발하고, 적용하기 위하여 진행되었다. 나노입자 자체의 독성을 파악하기 위해서는 응집을 최소화하여 노출 매체에 나노 크기로 존재하게 하는 표준화된 분산 배지의 제조가 필수적인데, 다수의 기존 연구들에서 나노물질의 수체에서의 응집을 막는 요인으로 휴믹산과 같은 천연유기물의 유용성이 확인되었다.^{5-8,18)} 이에 본 연구와 같이 천연유기물 및 이와 유사한 역할을 할 수 있는 물질을 적용하여 나노입자 자체의 분산 안전성을 증가시켜 입자 자체에 대한 노출 영향에 대한 연구에 적용할 수 있음을 확인하였다. 본 연구의 천연유기물 중 휴믹산을 첨가한 생태독성 시험 배지의 경우 물벼룩, 갈따꾸 등의 일부 시험종의 경우 적용 가능성을 확인할 수 있어, 이들 생물종을 활용한 산화아연 나노입자의 급성독성평가에 있어서 재현성 있는 결과를 확보할 수 있을 것으로 보인다.

기존 산화아연 나노입자의 수생태 독성 연구결과들에 따르면 일반적으로 입자에서 발생하는 아연 이온으로 인해 생체 내에 산화적 스트레스가 유발된다고 알려져 있으나,⁶⁾ Bhuvaneshwaria 등¹⁴⁾에 따르면 산화아연 나노입자 자체의 생체 내 축적이 독성 발현에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한 수환경 내 유기물의 농도, pH, 이온 강도 등의 조건에 따라 산화아연 나노입자의 거동이 변화하고 이로 인해 노출 생물종에 대한 독성 영향이 저감되는 등의 영향을 미칠 가능성이 확인되었다.^{6,20,23)} 특히, 수계 내 존재하는 천연유기물은 산화아연과 같은 급속계 나노입자와 상호반응을 유발하여 응집 및 분산에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{14,20,22)}

본 연구에서는 제한적으로 천연유기물인 휴믹산이 포함되어 산화아연 나노입자의 분산이 최대 96시간까지 유지할 수 있는 배지의 적용성 및 급성독성시험을 통해 천연유기물의 유무가 산화아연나노입자의 독성에 대해 영향을 미칠 가능성을 확인하였다. 본 연구의 산화아연 나노입자의 노출 시, 단순히 분산성이 향상된 배지에서의 급성독성 결과를 보면 산화아연나노입자의 입자 자체로 인한 급성영향은 낮은 것으로 보이나, 지속적인 나노입자의 노출로 인한 나노입자

자체의 독성 영향을 확인하기 위해서는 분자수준의 독성 기작 연구 및 만성 노출에 따른 나노입자의 수계 내 거동과 독성 영향의 관계를 파악하는 추가 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한 배지 내 존재하는 천연유기물이 산화아연 나노입자의 분산성을 향상시키는 것으로 보아, 실제 환경 중에 포함된 천연유기물이 환경 중에 배출되는 나노입자의 거동에 영향을 미칠 가능성을 확인할 수 있었다. 따라서 산화아연 나노입자 등의 금속계 나노물질에 대한 보다 명확한 독성영향을 파악하기 위해서는 향후 연구를 통해 또한 나노입자와 천연유기물 간의 상호 영향에서는 pH, 이온 강도, 황이온 등의 환경 요인들에 따라 변동되는 것에 대한 거동 연구가 필요할 것으로 보인다.

4. 결론

본 연구에서는 천연유기물을 적용하여 산화아연 나노입자와 같은 금속계 나노물질의 입자 영향에 파악을 위한 노출 방법 구축하고, 생태독성 실험에 적용 가능성 및 천연유기물의 존재에 따른 독성영향을 확인하고자 하였다. 다양한 생태독성시험종을 이용한 급성독성평가를 수행한 결과 천연유기물 포함된 본 연구의 분산 배지는 재현성 높은 나노생태독성평가에 활용 가능성이 높은 것으로 확인되었으나, 천연유기물과 같은 유기물이 산화아연 나노입자와 같은 금속계 나노물질 입자의 수중 분산성을 향상시키는 반면, 낮은 염 농도 및 과부하된 유기물 농도의 영향으로 초기 발달 단계의 어류 및 조류를 이용한 급성 노출 조건에서는 적용이 어려운 것으로 보인다. 본 연구에서는 상대적으로 황 함량이 낮은 것으로 알려진 휴믹산 적용으로 독성 저감 영향을 명확하게 확인할 수 없었으나, 천연유기물의 유무가 수생생물의 급성독성에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 천연유기물을 산화아연 나노입자의 분산력 향상을 위해 활용한 연구 결과를 바탕으로 보면 산화아연 나노입자를 포함한 나노물질의 수생태 독성 연구에서는 수질 매체에서 천연유기물 유무, 다양한 배지 내 성분, 나노입자 형태 등의 영향으로 거동 및 독성에 영향을 미칠 것으로 보인다. 환경 매체에서의 나노물질의 노출에 따른 영향을 명확하게 규명하기 위해서는 유기물함량 등을 포함한 여러 환경 인자 및 다양한 수준에서의 독성연구 필요할 것으로 보인다.

KSEE

References

1. Choi, J., Kim, H. and Park, K., "Dispersion Characteristics of Zinc Oxide Nanoparticles in Ionic and Non-ionic Isotonic Solution," *Yakhak Hoeji*, 57(2013).
2. Gu, B. and Kong, I. C., "Toxicity Assessment of Nanoparticles Based on Seed Germination and Germination Index,"

- J. Korean Soc. Environ. Eng.*, **36**(6), 396~401(2014).
3. Ha, M. J., Lee, Y. E. and Jang, A., "Effect of ZnO and TiO₂ Nanoparticles (NPs) on Microorganisms Growth in Activated Sludge," *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, **38**(4), 177~183(2016)
4. Aschberger, K., Micheletti, C., Sokull-Klüttgen, B. and Christensen, F. M., "Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health--lessons learned from four case studies," *Environ. Int.*, **37**(6), 1143~1156(2011).
5. Farré, M., Sanchis, J. and Barceló, D., "Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment," *TrAC*, **30**(3), 517~527(2011).
6. Ma, H., Williams, P. L. and Diamond, S. A., "Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review," *Environ. Pollut.*, **172**, 76~85(2013).
7. NIST Special Publication 1200-5, Preparation of Nanoscale TiO₂ Dispersions in an Environmental Matrix for Eco-Toxicological Assessment(2012).
8. Thio, B. J., Zhou, D. and Keller, A. A., "Influence of natural organic matter on the aggregation and deposition of titanium dioxide nanoparticles," *J. Hazard. Mater.*, **189**(1-2), 556~563(2011).
9. Keller, A. A., Wang, H. T., Zhou, D. X., Lenihan, H. S., Cherr, G., Cardinale, B. J., Miller, R. and Ji, Z. X., "Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices," *Environ. Sci. Technol.*, **44**(6), 1962~1967(2010).
10. Gao, J., Youn, S., Hovsepyan, A., Llana, V. L., Wang, Y., Bitton, G. and Bonzongo, J. C. J., "Dispersion and toxicity of selected manufactured nanomaterials in natural river water samples: Effects of water chemical composition," *Environ. Sci. Technol.*, **43**(9), 3322~3328(2009).
11. Ministry of Environment, A Study on Actual Conditions and Construction integrated inventory of nanomaterials(2012).
12. Ministry of Environment, A Study on Actual Conditions of nanomaterials and Application of the Globally Harmonized System for Classification and Labelling of nanomaterials(2012).
13. National Institute of Environmental Research, Applicability of Test Methods for Hazard Assessment of Nanomaterials(I) (2012).
14. Bhuvaneshwari, M., Iswarya, V., Nagarajan, R., Chandrasekaran, N. and Mukherjee, A., "Acute toxicity and accumulation of ZnO NPs in *Ceriodaphnia dubia*: Relative contributions of dissolved ions and particles," *Aquat. Toxicol.*, **177**, 494~502(2016).
15. ISO 6341, Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -Acute toxicity test(2012).
16. OECD, OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages, No. 212(1998).
17. OECD, OECD Guideline for the Testing of Chemicals. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test, No. 202(2004).
18. OECD, OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Fresh-

- water Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, No. 201(2006).
19. OECD, OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Chironomus sp., Acute Immobilisation Test, No. 235(2011).
 20. Mohd Omar, F., Abdul, A. H. and Stoll, S., "Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid," *Sci. Total Environ.*, **468-469**, 195~201(2014).
 21. Manceau, A. and Nagy, K. L., "Quantitative analysis of sulfur functional groups in natural organic matter by XANES spectroscopy," *Geochim. Cosmochim. Acta.*, **99**, 206~223(2012).
 22. Karasyova, T. A., Klose, E. O., Menzel, R. and Steinberg, C. E., "Natural organic matter differentially modulates growth of two closely related coccal green algal species," *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **14**(2), 88~93(2007).
 23. Yin, Y., Shen, M., Tan, Z., Yu, S., Liu, J. and Jiang, G., "Particle coating-dependent interaction of molecular weight fractionated natural organic matter: impacts on the aggregation of silver nanoparticles," *Environ. Sci. Technol.*, **49**(11), 6581~6589(2015).