

아연, 산화 아연 나노 입자가 오이에 미치는 독성 및 생물이용성 Phytotoxicity and Bioavailability of Zinc, Zinc Oxide Nanoparticles to the *Cucumis sativus*

송이레 · 남윤선 · 이인숙 †
Yireh Sohng · Yoon-sun Nam · In-sook Lee †

이화여자대학교 에코과학부
Division of EcoScience, Ewha Womans University

(2009년 2월 16일 접수, 2009년 6월 26일 채택)

ABSTRACT : Seedling growth test is used to assess toxicity of nanoparticles (NPs). This study evaluates toxicity of zinc, zinc oxide NPs on *Cucumis sativus* using two methods; phytigel and filter paper. From the comparison, phytigel method prevents precipitation of water insoluble NPs. Seeding length was negatively related to the exposed concentration of Zn, ZnO NPs in filter method. The median effective concentrations (EC50) for *C. sativus* exposed to Zn, ZnO NPs were estimated about 598, 600 mg/L in filter method. Bioaccumulation increased with the exposed concentration of Zn, ZnO NPs in only filter method. The results showed that the filter paper method was much better protocol than phytigel method.

Key words : Phytotoxicity, Bioavailability, Nanoparticles, *Cucumis sativus*

요약 : Seedling 성장 실험은 나노입자에 대한 독성 평가로 사용되어 왔다. 본 연구에서는 오이에 대한 나노 아연과 나노 산화 아연의 독성을 filter paper방법과 phytigel방법을 통해 평가해 보았다. 비교 결과 phytigel방법이 불용성인 나노아연, 산화 아연의 침전을 방지했다. 오이 seedling 길이는 노출된 나노 아연, 나노 산화 아연의 농도에 따라 filter 방법에서 음의 관계를 나타냈다. 나노 아연과 나노 산화 아연에 대한 오이의 EC50값은 598, 600 mg/L로 나타났다. Filter paper방법에서만 아연의 오이 내 생체 축적량은 노출된 나노 아연, 나노 산화 아연의 농도에 따라 증가하였다. 관찰 결과 filter paper방법이 phytigel 방법보다 더 좋은 protocol로 나타났다.

주제어 : 식물독성, 생물이용성, 나노입자, 오이

1. 서론

나노기술의 발달로 나노물질이 광범위하게 사용되고 있다. 현재 미국시장에 475 종류 이상의 나노물질이 이용되고 있고 전자 공학, 바이오 의약, 화학, 생물학, 에너지 생산 공정, 환경 등 다양한 분야에 쓰이고 있으며 nano-technology 시장이 2015년에는 1조 달러가 될 것으로 전망되고 있다.¹⁾ 나노 크기란 $10^{-7} \sim 10^{-9}$ m로 빠른 확산 속도, 단위 부피 당 넓은 반응 표면적, 액체 혹은 기체 상에서의 탁월한 반응성, 생물 분자와의 비슷한 크기 등의 특징들을 가지고 있다. 나노물질은 크게 (1) carbon-based materials, (2) metal-based materials, (3) dendrimers, (4) composites으로 4가지로 나뉜다.²⁾ 최근에는 새롭게 많은 종류의 금속 혹은 금속 산화물들이 나노 크기 수준으로 제조 이용되고 있으며 좋은 항균력을 지니고 있는 것으로 밝혀지고 있다.³⁾ 나노 metal은 표면적

이 매우 넓으므로 bulk metal (reference metal)보다 환경에 미치는 영향이 더 클 수 있다. 또한 나노크기이므로 토양에 유입 시 흡착되기 전까지 큰 유동성을 가지며 토양에 흡착되면 bulk metal 보다 더 강하게 흡착되므로 문제가 더 크다.²⁾ 동일한 화학적 구성을 하고 있는 물질이더라도 나노크기이거나 극미세(ultrafine)형태일 때 더 독성이 큰 것으로 나타났다.^{4~6)} 크기가 작아지면 환경에 더 오래 머물 수 있으며 생물체에 보다 쉽게 침투하여 부정적인 영향을 유발할 가능성이 높아지게 된다. 나노아연은 electro-nics, sunscreens, 타이어 등에 널리 사용되고 있다.^{7, 8)} 현재 환경에 노출된 나노물질이 수중 생물에 미치는 생태 독성(ecotoxicity)에 관한 연구가 대부분인 반면 토양 생물에 미치는 영향, 특히 식물 독성에 관한 연구는 절대적으로 부족하다.²⁾ 식물에 미치는 나노물질의 영향에 관한 실험으로 Yang and Watts⁹⁾가 코팅한 alumina NPs(13 nm)이 토양에 유출되었을 때 옥수수,

† Corresponding author : E-mail : islee@ewha.ac.kr Tel : 02-3277-2375 Fax : 02-3277-2385

오이, 콩, 양배추, 당근의 뿌리 성장을 저해하는 것으로 관찰되었다. 입자가 큰 alumina에 관한 식물 독성은 나타나지 않아 alumina NPs의 표면 전하가 식물 성장 저해에 영향을 미친다고 가정하였고 이후 Lin and Xing¹⁰⁾는 Yang and Watts의 실험을 보완하여 engineered NPs가 종자의 발아와 뿌리 성장을 저해한다고 결론지었다. Lee 등¹¹⁾은 기존의 나노물질의 영김 현상을 보완하여 Phytigel 방법을 이용하여 나노구리의 식물 독성 실험 (phytotoxicity test)을 하였다. 반면 일부 연구에서는 나노물질이 식물의 성장을 촉진한다는 보고도 있다. Nano-SiO₂, nano-TiO₂ 이 콩에서 질산환원효소(nitrate reductase) 증가를 보였고 물, 비료 흡수 및 이용 능력 향상과 발아 및 성장을 촉진하기도 했다.¹²⁾ Nano-TiO₂는 Phytosynthesis와 질소 대사(nitrogen metabolism)를 향상시키고 적정 농도에서 시금치의 성장을 향상시킨다는 보고도 있었다.^{13 ~ 16)} 나노물질의 사용은 빠른 속도로 증가되고 있는 추세이나 환경에 유입되었을 때 생태계에 미치는 영향에 관한 연구는 미비하다. 아직 한국에서는 NPs가 법정 유해폐기물 항목으로 분류도 안되어 있으므로 기초적인 연구가 시급한 실정이다. 금속 혹은 금속 산화물로 구성된 나노물질의 독성에 대한 이해는 나노물질의 활용 확대를 위해 반드시 필요하므로 본 연구에서는 water-insoluble Zn, ZnO, NPs가 오이에 미치는 식물 독성과 생물이용성에 대해 filter paper 방법과 phytigel 방법으로 비교하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 실험재료

나노크기(size < 50 nm)의 아연, 산화아연 NP이 실험에 사용되었다. 이들 NP는 Sigma Aldrich Co.에서 구입하였다. 선행 연구에 의해 US EPA 권장 식물 중 평균 발아율이 90% 이상인 오이를 실험생물로 선정하였고 종자는 국내 종묘상가(아람 원예)에서 구입하였다.

2.2. Filter paper 방법

Filter paper 방법(US EPA 1996)¹⁷⁾은 nano-Zn과

Table 1. Characteristics of nanoparticles used for the phytotoxicity experiments

Particle	Size (nm)	Purity (%)	Surface area (m ² /g)
Zinc trace metals base NP	<50	99+	35-50
Zinc Oxide 6% Al doped NP	<50 (BET)	97	>10.8

*The data provided by producer

nano-ZnO를 400, 800, 1200, 1600, 2000 mg/L농도로 만들어 초음파분해기(100 W, 40kHz)로 잘 녹게 30분간 분산시킨다. 사용하기 전까지 전자막대기를 넣어 계속 저어 주면서 침전을 막고 NPs 용액을 whatman filter paper가 깔려 있는 Petri dish(87×15 mm)에 각 5 mL씩 넣는다.

2.3. Phytigel 방법

Nano-Zn과 nano-ZnO를 400, 800, 1200, 1600, 2000 mg/L농도로 만들어 초음파분해기(100 W, 40 kHz)으로 잘 녹게 30분간 분산시킨 후 2% phytigel이 되도록 만들어 Petri dish(100×40 mm)에 넣고 멸균시킨 후 clean bench에서 24시간 건조시킨다.

2.4. 발아 및 식물 독성 실험

사용 전 실온 상태에서 어두운 곳에 보관된 오이 종자를 12% sodium hypochlorite 용액으로 10분간 흔들면서 소독한 후 DI-water로 여러 번 행 구워 준다. 멸균된 filter paper를 Petri dish에 깔고 DI-water를 5 mL씩 넣고 소독된 종자를 적당한 간격으로 10개씩 둔다. 성장실에서 암조건 하에 30시간 동안 발아 시킨다. 그 후 NP solution과 NP phytigel에 갓 발아 된 오이씨를 옮기고 암조건 하의 25±1℃ 성장실에서 48시간 성장시킨 후 생체 길이를 측정하였다.

2.5. 아연이온 독성 실험

농도 2,000 mg/L의 Zn, ZnO NPs를 1시간 동안 초음파분해 시킨 후 상층액을 filter paper(0.45 μm pore size, Whatman, USA)로 거른다. ICP-OES로 분석하여 비슷한 농도 범위로 DI-water에 ZnCl₂를 녹여 만든 후 위와 같은 방법으로 생체 길이를 측정하였다.

2.6. 아연 분석

건조한 오이 생체량 0.1 g를 65% HNO₃ 5 mL를 첨가하여 microwave(MDS-2000; CEM)로 산 분해 시킨 후 ICP-OES로 분석하였다.

2.7. 통계분석

3반복 실험한 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계처리는 student T-test를 이용하였으며 99% 유의수준 (p < 0.01)으로 나타냈다.

3. 결과 및 고찰

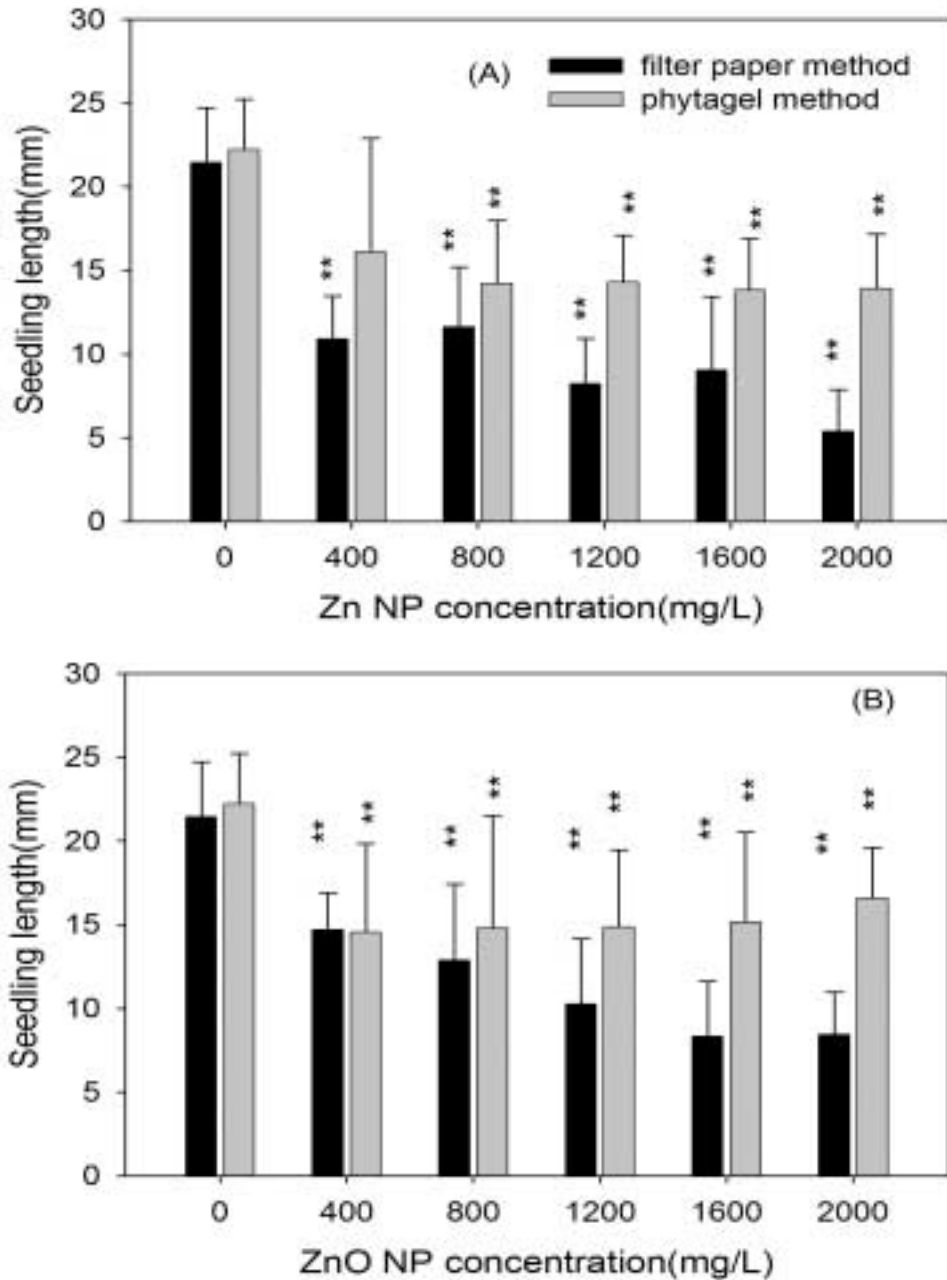


Fig. 1. Seedling growth of *Cucumis sativus* exposed to Zn NP (A), ZnO NP (B) for 48 h. Bars represent mean of replicates with standard deviation. **: significant at 1% level ($p < 0.01$)

3.1. 생체 성장에 대한 Zinc, Zinc Oxide NPs의 영향

오이의 생체 길이는 Zn, ZnO NPs의 모든 농도에서 비오염구와 유의적 차이를 보였다($p < 0.01$). 비오염구의 phytigel과 filter paper 상태에서 평균 오이 생체 길이는 각각 22.2 ± 3.0 , 21.4 ± 3.2 mm이었다. 2,000 mg/L에서 Zn NP의 phytigel과 filter paper 상태에서의 평균 생체 길이는 13.9 ± 3.3 , 5.4 ± 3.5 mm이고 2,000 mg/L에서 ZnO NP의 phytigel과 filter paper 상태에서의 평균 생체 길이는 16.6 ± 3.0 , 8.4 ± 2.5 mm로 나타났다

(Fig. 1). 실험 결과 Zn, ZnO NPs 각 농도 별로 처리한 실험구에서는 대조구에 비해서 오이의 생체 길이의 매우 유의적인 차이를 나타냈다 ($p < 0.01$). Phytigel에서 키운 오이 길이가 filter paper에서 키운 길이보다 약간 더 크게 자랐으며 Zn NP에서 보다 ZnO NP에서 오이 생체의 성장이 더 좋은 것으로 나타났다. 노출된 NPs 농도 증가에 따라 filter paper의 경우 Zn, ZnO 모두 NP농도에 따른 오이 생체의 성장 저해가 뚜렷하게 나타난 반면 phytigel의 경우 비오염구와 차이를 보였으나 농도에 따

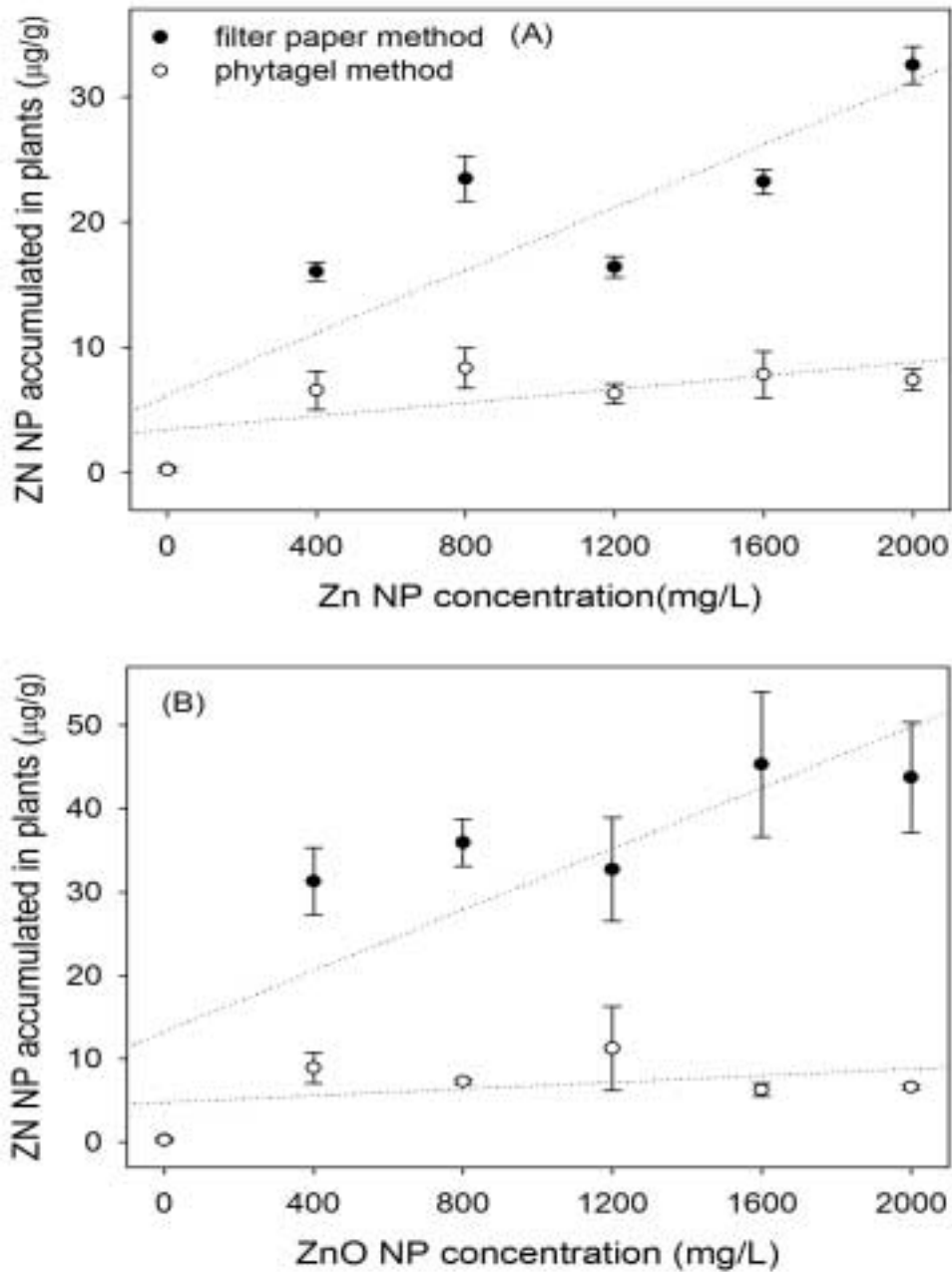


Fig. 2. Bioaccumulation of Zn NPs in seedling of *Cucumis sativus* after 48 h of incubation in phytigel and filter paper containing different concentration of Zn NPs(A), ZnO NPs(B).

른 상관관계는 나타나지 않았다. NP이 오이 생체의 뿌리를 통해 shoots로 물·양분 흡수 시 함께 운반되어 생장이 저해된 것으로 보인다.

Fig. 1를 보면 filter paper 상태에서 phytigel 상태보다 오이의 성장이 더 저해된 것으로 나타났다. Phytigel에서 주 뿌리 외 곁뿌리가 phytigel 표면 위로 잘 발달되어 표면 위의 수분과 영양분을 받아 성장하며 phytigel속 NP의 영향은 일부만 받아 생체 성장이 filter paper에 비해 좋은 것으로 보였다. 반면 filter paper 상태의 오이 뿌리는 뿌리털이 거의 발달되지 못했고 phytigel 상태에서의 오이는 주 뿌리에서 뿌리털이 거의 나타나지 않았으나 곁뿌리에서 뿌리털이 발달된 것이 보였다. NP가 오이 뿌리털 발달을 저해시키는 것으로 보였다.

Filter paper 상태에서 48시간 오이 성장 후 nano-Zn 용액은 Zn특유의 검정색이 모두 사라졌다. 비교실험으로 nano-Zn을 filter paper 상태로 두었을 때 3일째 검은색이 희미해지는데 Zn이 산소와 결합하면서 ZnO의 특유 색인 짙은 흰색으로 변한 것으로 보였다. 그러나 본 실험

에서는 Zn NP 농도 2,000 mg/L을 제외한 나머지 농도에서는 영김 현상이 거의 없는 상태이므로 NP를 오이가 대부분 흡수한 것으로 보였다. Nano-ZnO은 Petri dish에 영김 현상으로 보아 오이가 일부 흡수하고 남은 NP는 응집(agglome-ration)된 것으로 나타났다. Phytigel을 이용한 식물 독성 실험에서 오이의 근권 주변으로 특유 색(Zn : 검정, ZnO : 짙은 흰색)이 희미하게 열리는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 근권에서 나노물질이 흡수하여 주변이 투명해지는 것으로 보였다.

48시간 동안 Zn, ZnO NPs에 노출되었을 때 오이의 생체 성장의 median effective concentrations (EC50s)은 Zn, NP는 phytigel 방법과 filter paper 방법 각 598, 983 mg/L를 나타냈으며 ZnO NP는 phytigel 방법과 filter paper 방법 각 600, 1,201 mg/L로 나타났다.

NP의 독성을 확인하기 위해서 이온의 독성과 pH의 영향을 조사하였다. Zn, ZnO NP는 초음파분해 과정에서도 Zn이온이 발생할 수 있으므로 아연 이온의 양을 측정하였는데 아연이온은 5 ppm이 검출되었다. Lin and Xing¹⁰⁾의 논문에서는 아연이온이 1 ppm이 검출되었으며 이온의 독성은 나타나지 않았다. 본 연구에서도 아연이온 4~6 mg/L범위에서 생체 길이를 실험 하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. pH의 영향을 파악하기 위하여 용액의 pH를 측정한 결과 filter paper과 phytigel 모두 6.5~7.4로 나타나 pH에 따른 생체 길이 성장 저해는 없는 것으로 나타났다.

3.2. Zinc, Zinc Oxide NPs의 생체 축적량

오이 생체의 Zn NPs의 생체 축적량이 농도 증가와 양의 상관 관계를 보였다(Fig 2). 바이오연구의 phytigel과 filter paper 상태에서의 오이 생체의 평균 아연의 축적량은 0.24 ± 0.2, 0.32 ± 0.2 µg/g이었다. 2,000 mg/L에서의 Zn NP의 phytigel과 filter paper 상태에서의 오이 생체의 평균 아연 축적량은 7.4 ± 0.9, 32.5 ± 1 µg/g이고 2,000 mg/L에서의 ZnO NP의 phytigel과 filter paper 상태에서의 오이의 평균 아연 축적량은 6.6 ± 0.3, 43.8 ± 6.6 µg/g로 나타났다. Filter paper에서 키운 오이가 phytigel에서 키운 오이보다 농도증가에 따른 Zn NP 축적률이 뚜렷하게 증가했으며 생체 축적량도 더 많은 것으로 관찰됐다. 그러므로 filter paper에서 키운 오이의 성장이 더 저해된 것을 알 수 있었다.

갓 발아한 오이 생체를 phytigel에 성장시키는 과정에서 주 뿌리의 성장이 저해되는 것으로 보인다. 대조구를 제외한 NP가 분산된 phytigel에서 오이 생체의 주 뿌리는 끝이 희미하게 변색되었고 NP농도가 높을 수록 뿌리의 변색도 증가했다. Phytigel에서 주 뿌리 외 결뿌리가 phytigel 표면 위로 잘 발달되어 주 뿌리 역할을 하는 것

으로 보였다. 표면 위의 수분과 영양분을 받아 성장하며 phytigel속 NP의 영향은 감소되어 생체 성장이 filter paper상태에 비해 양호한 것으로 보인다. 결뿌리 발달로 NP 접촉면이 최소한 노출돼 식물 내 NP 축적량이 감소하고 filter paper상태의 오이는 NP 접촉면이 최대로 노출되어 식물 내 NP축적량이 높은 것으로 보였다. 향후 실험에서는 phytigel을 이용한 실험 시 갓 발아한 오이 종자를 phytigel에 박는 형태로 키워 뿌리의 NP 접촉을 높이는 실험이 필요하다고 사료된다.

4. 결론

본 연구에서 오이에 나노 아연과 나노 산화 아연을 노출한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 1) 식물 독성 실험으로 filter paper 방법이 good protocol로 나타났으며, phytigel 방법은 나노 입자의 영김 현상 문제를 감소시킬 수 있었다.
- 2) 생체 길이는 filter paper 방법에서 Zinc, Zinc Oxide NPs에 노출된 농도 증가에 따라 감소했다. Phytigel 방법에서는 농도증가와 무관하게 비슷한 감소를 보였다. Phytigel 방법으로 Zn, ZnO NPs에 노출 시 48 h EC50은 598, 600 mg/L로 나타났다.
- 3) Zn, ZnO NPs에서 방출된 이온의 양은 미량이므로, 식물 독성은 Zn, ZNO NPs의 영향으로 확인되었다.
- 4) 식물조직 내 Zn NPs의 생체 축적량은 노출된 Zn, ZNO NPs 농도에 따라 증가했다.
- 5) 향후 실험에서 phytigel 방법을 이용할 때 NP접촉을 높여 뿌리 성장이 phytigel 속에서 이루어 지도록 한다.

KSEE

참고문헌

1. Roco, M. C., "Environmentally responsible development of nanotechnology," *Environ Sci Technol.*, **39**(2), 106A~112A (2005).
2. U. S. Environmental Protection Agency Home page, www.epa.gov/OSA/nanotech.htm, February(2007).
3. Peter, K. S., Rosalyn, L. K., George, L. M., and Kenneth, K., "Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents", *Langmuir.*, **18**(17), 6679~6686(2002).
4. Oberdörster, G., Ferin, J. and Lehnert, B. E., "Correlation between Particle size, in vivo particle persistence, and lung injury," *Environ Health Perspect.*, **102**(5), 173~179(1994).
5. Xiao, Y. L., David, B., Steven, S., Willian, M., and Kenneth, D.,

- "Short term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats", *Inhal Toxicol.*, **11**(8), 709~731(1999).
6. Höhr, D., Steinfartz, Y., Schins, R. P. F., Knapen, A. M., Martra, G., Fubini, B. and Borm, P. J. A., "The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultra fine TiO₂ in the rat", *Int J Hyg Environ Health.*, **205**(3), 239~244(2002).
 7. Yang, J. G., Okamoto, T., Ichino, R., Bessho, T., Sarake, S. and Okido, M., "A simple way for preparing antioxidation nano-copper powders," *Chem Lett.*, **35**(6), 648~649(2006).
 8. Nasibulin, A. G., Petri, A. P., Richard, O., Kauppinen, E. and Igor, S. A. "Copper and copper oxide nanoparticle formation by chemical vapor nucleation from copper(II) acetylacetonate", *J. Nanoparticle Res.*, **3**(6), 383~398(2000).
 9. Yang, L. and Watts, D. J., "Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles," *Toxicol Lett.*, **158**(2), 122~132(2005).
 10. Lin, D. and Xing, B., "Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth", *Environ Pollut.*, **150**(2), 243~250(2007).
 11. Lee, W. M., An, Y. J., Yoon, H. and Kweon, H. K., "Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum Aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles", *Environ Toxicol. Chem.*, **27**(9), 1915~1921(2008).
 12. Lu, C. M., Zhang, C. Y., Wen, J. Q., Wu, G. R. and Tao, M. X., "Research of the effect of nanomaterials on germination and growth enhancement of Glycine max and its mechanism", *Soybean. Sci.*, **21**, 168~172(2002).
 13. Hong, F. S., Yang, F., Liu, C., Gao, Q., Wan, Z. G., Gu, F. G., Wu, C., Ma, Z. N., Zhou, J. and Yang, P., "Influences of Nano-TiO₂ on the chloroplast aging of spinach under light", *Biol. Trace Elem. Res.*, **104**(3), 249~260(2005a).
 14. Hong, F. S., Zhou, J., Liu, C., Yang, F., Wu, C., Zheng, L. and Yang, P., "Effect of nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach," *Biol. Trace Elem. Res.*, **105**(3), 269~279(2005b).
 15. Yang, F., Hong, F. S., You, W. J., Liu, C., Gao, F. Q., Wu, C. and Yang, P., "Influence of nano-anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach", *Biol. Trace Elem. Res.*, **110**(2), 179~190(2006).
 16. Zheng, L., Hong, F. S., Lu, S. P. and Liu, C., "Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach," *Biol. Trace Elem. Res.*, **104**(1), 83~91(2005).
 17. U. S. Environmental Protection Agency, Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.4200, Seed germination/root elongation toxicity test(1996).