

## 나노입자가 알테미아(*Artemia* sp.) Cyst 부화율에 미치는 영향

정연규<sup>1</sup> · 이병우<sup>2</sup> · 박찬일<sup>3</sup> · 최광수<sup>3</sup> · 김무찬<sup>4,†</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 해양환경공학과

<sup>2</sup>산업의과대학

<sup>3,4</sup>경상대학교 해양산업연구소

## Effect of Nano Particles on the Hatching rate of *Artemia* sp. Cyst Zooplankton

Yeon-Kyu Jeong<sup>1</sup>, Byeong-Woo Lee<sup>2</sup>, Chan-Il Park<sup>3</sup>, Kwang-Soo Choi<sup>3</sup> and Mu-Chan Kim<sup>4,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Marine Environmental Engineering, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

<sup>2</sup>Department of Environmental Health Engineering University of Occupational and Environmental Health 807-8555, Japan

<sup>3,4</sup>Institute of Marine Industry, The collage of Marine Science, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

### 요 약

이 연구에 사용된 9종류의 나노입자는 직경 100 nm 이하의 크기를 가진 입자로, 알테미아 cyst가 nauplius로 부화되는 과정에서 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 24시간 경과 후 나노입자를 첨가하지 않은 대조구에서는 82%가 nauplius로 부화하였다. 20 mg/L 농도에서는 AGZ020, Nano silver, P-25, Sb, 및 SnO 나노입자가 각각 18%, 20%, 13%, 50% 및 0%의 부화율을 보여 유해성이 큰 것으로 나타났으나, Ag-TiO<sub>2</sub>, In, Sn, 및 Zn 나노입자에서는 각각 75%, 60%, 73% 및 73%로 대조구에 비해 유해성을 가졌지만, AGZ020, Nano silver, P-25, Sb, 및 SnO 나노입자에 비해 상대적으로 미약한 것으로 나타났다. 이는 나노입자가 가지고 있는 성분에 따라서 차이가 났다. AGZ020, Nano silver 및 P-25 나노입자는 은(Ag)이 2% 함유되어 항균제로서 널리 사용되어지고 있으며, 산소를 결합시킨 SnO 나노입자는 광촉매제로 사용되고 있다. 이들 나노입자들은 현재 가전, 기능성 화장품, 항균제 및 광촉매제 등 사용이 일반화되어 수중환경으로 유입될 가능성이 높아지고 있다. 이에 따라 수중생태계에 점차 영향을 줄 가능성이 높기에, 나노입자가 가지는 잠재적 위험성을 지속적으로 연구해야 할 것이다.

**Abstract** – 9 kinds of nanoparticle used for this study was a particle with the size of less than 100 nm of diameter, and *Artemia* sp. cyst examined what kind of influence to have upon the process hatched out in nauplius. 82% hatched in nauplius at the opposition ward where a nanoparticle wasn't added after 24 time course. AGZ020, Nano silver, P-25, Sb and SnO nanoparticle showed hatching rate of 18%, 20%, 13%, 50% and 0% respectively by the 20mg/L density, and it became clear that a harmful effect is big, but I had a harmful effect compared with the opposition ward by 75%, 60%, 73% and 73% respectively by Ag-TiO<sub>2</sub>, In, Sn and Zn nanoparticle, but a feeble thing was known relatively compared with AGZ020, Nano silver, P-25, Sb and SnO nanoparticle. The difference has caused this with the ingredient a nanoparticle has. Ag is included 2 % and AGZ020, Nano silver and P-25 nanoparticle are used widely as anti-fungus agent, and the SnO nanoparticle which became combination is a light catalyst pill, and oxygen is used for a Sn particle. This and others, a possibility that use is generalized and flows into aquatic environment in sequence the home electronics, functionality cosmetics, anti-fungus agent and a light catalyst pill at present becomes high for nanoparticles and others. The anxiety which has an influence on the ecology world in the water with this can be generated, so I'd have to study the potential danger a nanoparticle has continuously.

**Keywords:** *Artemia* sp., Nanoparticle(나노입자), AGZ020, P-25, Nano silver, Sn, Ag(은 이온), nauplius

<sup>†</sup>Corresponding author: kmc81@gnu.ac.kr

## 1. 서 론

나노기술은 “물질을 나노크기의 수준에서 조작분석하고 이를 제어할 수 있는 과학과 기술”로 제2의 산업혁명을 이끌어 나갈 핵심 기술로 인식되고 있으며, 사회전반에 커다란 긍정적인 영향을 미칠 것으로 예상하고 있다. 소수의 과학자들에게만 언급되었던 ‘나노’의 개념은 세탁기나 냉장고 등 가전제품에서부터 치약이나 비누 등 생활용품, 의약품까지 우리 주변에서 볼 수 있는 여러 제품에 이용될 만큼 상용화되어 있다. 그러나 나노기술로 만들어진 물질들은 쉽게 파괴되지 않고, 다른 물질과 쉽게 반응하고, 다른 장소로 쉽게 이동할 수 있는 성질 등을 가지고 있는 특성 때문에 나노물질을 상용화 하는데 각별한 주의와 나노물질의 잠재적 위험성에 관한 적절한 규제가 요구되고 있다(최 등, 2007).

Barbara *et al.*(2006)은 다른 세포들과는 달리 표면에 입자를 수용하는 어떠한 수용체도 가지고 있지 않은 적혈구가 수용체를 통해 endocytosis가 일어나지 않음에도 불구하고, 적혈구세포 내부에 나노입자가 축적되는 것을 확인하였다. Thomas *et al.*(2006)은 쥐의 신경세포를 보호하는 면역세포에 산화 티타늄 나노 입자를 수용액 속에서 노출시켰을 때 세포변화를 관찰한 결과, 면역세포에서 나노입자를 확인하였고 산화티타늄의 자극에 의해 활성산소가 축적되어 신경세포가 손상 받은 것으로 보고하고 있다. 나노입자의 유해성에 대해서는 아직 논란의 여지가 있지만, 잠재적 위험성을 지니게 되는 이유는 나노라는 크기 때문이다. 작은 입자일수록 비표면적이 넓어지면서 생체조직에 대한 악영향을 증가시킬 수 있다. 따라서 순작용을 기대하고 나노입자를 사용하더라도 그에 대한 반응성을 지니게 되고, 또한 어떠한 물질보다 치명적일 수 있다는 것이다(김해 이, 2005). 현재 나노입자의 유해성에 관한 연구는 인체에 대한 연구가 대부분이고, 수산생물에 대한 연구는 미비한 실정이다. 나노기술의 사용이 일반화됨에 따라 나노입자들은 수중환경에 지속적으로 유입이 증가될 것이지만, 아직 어떠한 경로로 얼마나 유입이 되는지 파악되지 않고 있다. 이 연구는 수중 환경으로 유입되는 나노입자의 잠재적 위험성을 평가하기 위하여, 수산양식 분야의 어류 유생의 먹이생물로 널리 이용되고 있는, 동물플랑크톤의 일종인 *Artemia* sp.의 cyst를 나노입자에 노출시켜 부화율의 변화에 대해 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 나노입자

이 연구에 사용된 나노입자들은 Ag-TiO<sub>2</sub>, AGZ020, In, Nano silver, P-25, Sb, Sn, SnO 및 Zn 나노입자로 총 9종이며, 영남대학교 이과대학 화학과에서 제공받았다. 이들 나노입자들 중 은(Ag)이 2% 함유되어 있는 AGZ020과 Nano silver 나노입자는 평균 입자크기가 20 nm 정도이며, P-25 나노입자의 평균 입자 크기는 30-50 nm, 그리고 Ag-TiO<sub>2</sub>, In, Sb, Sn, SnO 및 Zn 나노입자들은 80 nm 정도 평균 입자크기를 가지고 있다.

### 2.2 부화실험

실험에 사용된 알테미아 cyst는 소형어류의 배양먹이로써 많이 사용되며 영명으로 Brine Shrimp 일반적으로 Brine worm, Sea monkey라고 명칭되어 있다. 주로 암수의 교미 행동에 의해 유성 생식이 이루어 지지만 수컷의 부재시 암컷만으로 무성생식이 이루어 지기도 한다. 본 연구에서는 최적온도인 28에서 배양하였다. 시판하고 있는 Golden Gulf Artemia(원산지: 중국 허베이성)(河北)를 사용하였다. 해수는 0.45 μm Membrane filters로 여과시킨 후, Autoclave에서 121 °C, 30분간 멸균한 것으로 사용하였다. 24well Felcon Multi™ plate에 각각 멸균해수와 나노입자의 농도를 맞추고, 알테미아 cyst 1ml씩을 첨가한 후, 부화가 잘 되도록 25 °C에서 12L/12D주기의 광조건을 주어 24시간 동안 배양기(Multi Thermo Incubator Dong won Scientific co.)내에서 부화시켰다.

### 2.3 계수측정

알테미아의 배(embryo)가 몸 뒤 부분에 껍데기를 달고 있는 umbrella와 nauplius 양쪽 모두, 부화된 계체수로 계수하였다. 실험은 3회 반복하였으며, 개체수 값은 평균값으로 하였다. 관찰은 NIKON ECLIPSE TS-100 도립 현미경 하에서 실시하였다.

### 2.4 나노입자의 농도

예비실험 결과를 바탕으로 대조구인 0 mg/L에서 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 그리고 20 mg/L으로 총 10단계 농도로 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

Cyst(A)를 여과 멸균해수에 넣고 24시간이 지난 후 살펴보았을 때, 바깥쪽의 두꺼운 난각과 얇은 막을 벗어 버리고, 얇은 막과 같

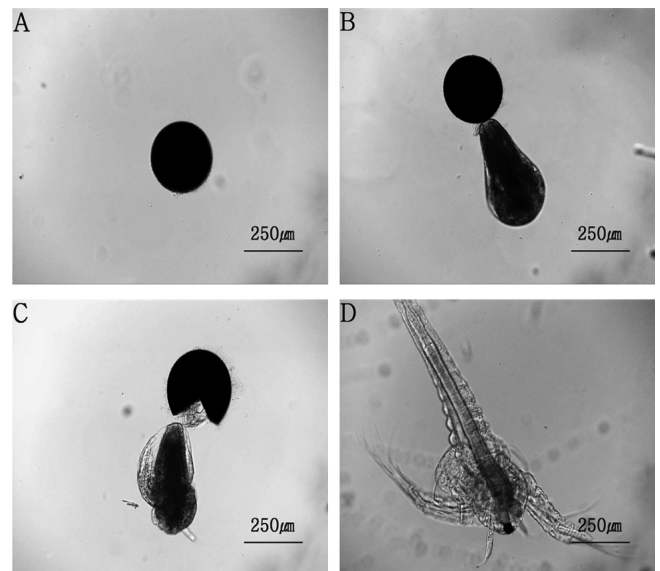


Fig. 1. Egg development stages of *Artemia* sp. (A: cyst, B: umbrella, C: nauplius, D: adult).

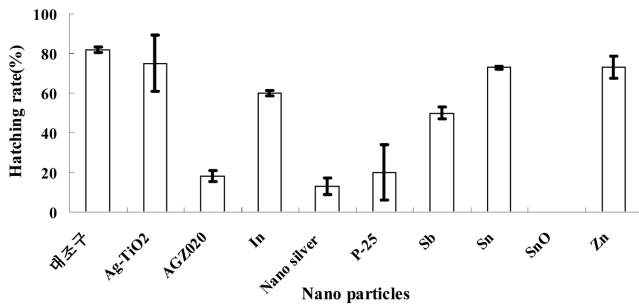


Fig. 2. Effect of nanoparticles on hatching rate of *Artemia* sp. cyst (20 mg/L).

이 있는 또 하나의 막에 쌓여져서 nauplius의 머리 부분을 밑으로 하여 매달리거나(B), 부화 효소 작용으로 내막을 뚫고 nauplius가 헤엄쳐서 나온다(C). 그리고 48시간이 지나면 nauplius는 완전한 성체의 모습(D)으로 변화된다. 부화 직후 유생의 크기는 약 450  $\mu\text{m}$  정도가 된다(Fig. 1).

알테미아 cyst에 20 mg/L 농도로 맞추어진 9종의 나노입자를 첨가시켜 24시간 경과 후 나노입자가 알테미아 cyst 부화에 미치는 유해성의 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 나노입자가 첨가되지 않는 대조구에서는 cyst의 82%가 nauplius로 부화하였다. AGZ020, P-25, Nano silver 및 Sb 나노입자에서는 각각 18%, 20%, 13% 및 50%로 cyst의 부화율이 상대적으로 낮았으며, SnO 나노입자의 경우 nauplius로 부화된 cyst는 전혀 관찰되지 않아 실험한 나노입자 중 가장 큰 유해성으로 보였다. 그러나 Ag-TiO<sub>2</sub>, In, Sn, Zn의 나노입자에서는 nauplius의 부화율이 각각 75%, 60%, 73% 및 73%로 대조구에 비해 유해성으로 보였지만, 상대적으로 미약한 것으로 나타났다.

이러한 결과는 나노입자가 nauplius로 부화되는 단계에 유해성을 미친 것으로 보이지만, 나노입자 성분에 따라서 차이가 크다는 것을 알 수 있었다. 먼저 73%의 부화율을 보인 Sn의 나노입자와 달리 nauplius로 전혀 부화되지 않은 SnO 나노입자가 실험한 나노입자 중에서 가장 큰 유해성을 보인 것은 산소가 결합되어 촉매작용에 의해 부분적으로 활성산소로 전환되고, 활성화 과정에서 생체막의 투과성이 증대하여, 세포의 구조를 손상시키는 기작으로 (Alessio, 1993), nauplius 부화에 영향을 미친 것으로 생각된다. AGZ020, P-25, 및 Nano silver 나노입자도 유해성이 크게 나타난 것은 이들 나노입자에 함유된 은(Ag)의 영향으로 생각되어진다. AGZ020 나노입자는 노바론(Novaron)의 한 종류로, 기존의 Zeolite 계와 비교시 항균효과의 지속성이 탁월하고, 수용액 및 유기용매에 녹지 않는 특성이 있으며, P-25 나노입자는 현재 광촉매로 가장 많이 사용되어지고 있는 물질이지만, 자외선으로 유기물을 분해하는 기능, 환경정화작용, 탈취작용, 항균작용의 기능을 가지고 있는 물질이기도 하다(서 등, 2006). Nano silver 나노입자는 병원균의 소화나 호흡, 신진대사를 도와주는 효소 작용을 저해하는 항생제로 650여종의 세균과 바이러스를 살균할 수 있는 것으로 알려져 있다(김, 2004). 이와 같이 AGZ020, P-25, 및 Nano silver

나노입자의 항균작용은 함유하고 있는 은 이온에 의해 나타난다. 은 이온은 확산에 의해 세포막에 도달하면, 세포를 이루는 단백질에 흡착되고 동시에 세포막에 존재하는 효소의 대사기능을 저해하며, 또한 호흡기능을 파괴시키고, 세포질을 누출시키게 만들 뿐만 아니라, 세포막 손상이나 단백질 및 핵산의 불활성화를 초래하여 세포발생을 증식, 억제하는 메카니즘을 가지고 있다(Robert and Charles, 1989; Russell and Hugo, 1994). 또한 세포막을 통과한 은 이온이 세포내 효소의 -SH기와 결합하여 효소의 활동저하로 인해 생육을 억제·사멸시키는 작용도 가지고 있다(Franklin and Snow, 1989). 이처럼 은(Ag) 이온이 가지는 항균 메카니즘에 의해 영향을 미친 것으로 생각된다. 마지막으로 Sb 나노입자는 체내에 흡수되어 세포의 원형질을 침해하고, 단백질 대사작용을 방해하는 물질로 알려져 있는 것으로 (Yamagishi *et al.*, 1991), AGZ020, Nano silver 및 P-25 나노입자에 비해 상대적으로 유해성이 낮았지만, nauplius 부화에 영향을 미친 것으로 생각된다.

상대적으로 알테미아 cyst에 유해성을 보인 AGZ020, P-25, Nano silver, Sb 및 SnO 나노입자의 농도별 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 알테미아 cyst에 AGZ020 나노입자를 농도별로 첨가시킨 결과, 0.05 mg/L 농도에서 43%의 부화율을 보였으며, 농도가 높아질수록 부화율은 점차 감소되어 20 mg/L 농도에 이르러 cyst의 18%만이 nauplius로 부화하였다. AGZ020 나노입자는 다른 나노입자와는 달리 비교적 저농도에서도 50%미만의 부화율을 보여, nauplius 부화단계에 미치는 유해성이 크다고 생각된다. Nano silver 나노입자에서는 0.05 mg/L에서 60%만이 nauplius로 부화되었다. 하지만 0.05 mg/L 이상 농도에서는 각각 47%(0.1 mg/L), 46%(0.2 mg/L), 44%(0.5 mg/L), 37%(1 mg/L), 36%(2 mg/L), 36%(5 mg/L), 28%(10 mg/L) 그리고 13%(20 mg/L)로 농도가 높아질수록 부화율을 감소하였다. P-25 나노입자의 경우 0.05 mg/L에서 79%, 0.1 mg/L에서 64%, 그리고 0.2 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L에서 각각 61%의 부화율을 보여, 비교적 낮은 농도에서 nauplius 부화에 미치는 유해성이 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. 하지만 2 mg/L 이상의 농도에서는 50%미만의 부화율을 보였고, 20 mg/L에서는 20%만이 nauplius로 부화되었다. Sb 나노입자 경우에서는 0.05 mg/L에서 74%, 0.1 mg/L에서 73%, 0.2 mg/L에서 73%, 0.5 mg/L에서 67%, 1 mg/L에서 61%, 2 mg/L에서 55%, 5 mg/L에서 51% 그리고 10 mg/L, 20 mg/L에서 각각 50%의 부화율로 보였다. 1 mg/L 이하의 농도에서는 상대적으로 유해성이 크지 않은 것으로 보였을 뿐, 다른 나노입자와 마찬가지로 농도가 점차 높아질수록 부화율은 감소한 것으로 나타났다. 마지막으로 SnO 나노입자에서는 농도별로 살펴본 결과, 0.2 mg/L이하의 농도에서 70%이상 nauplius로 부화가 되었으며 비교적 큰 유해성을 보이지 않았다. 그러나 0.5 mg/L이상 농도가 높아질수록 점차 감소하여, 20 mg/L에서는 nauplius로 부화된 것이 전혀 없었다.

알테미아 cyst에 Ag-TiO<sub>2</sub>, In, Sn 및 Zn 나노입자를 농도별로 첨가시킨 결과 Fig. 4와 같이 Ag-TiO<sub>2</sub>, In, Sn, 및 Zn 나노입자에서는 0.05 mg/L에서 20 mg/L까지 모든 농도에서 70%이상 cyst

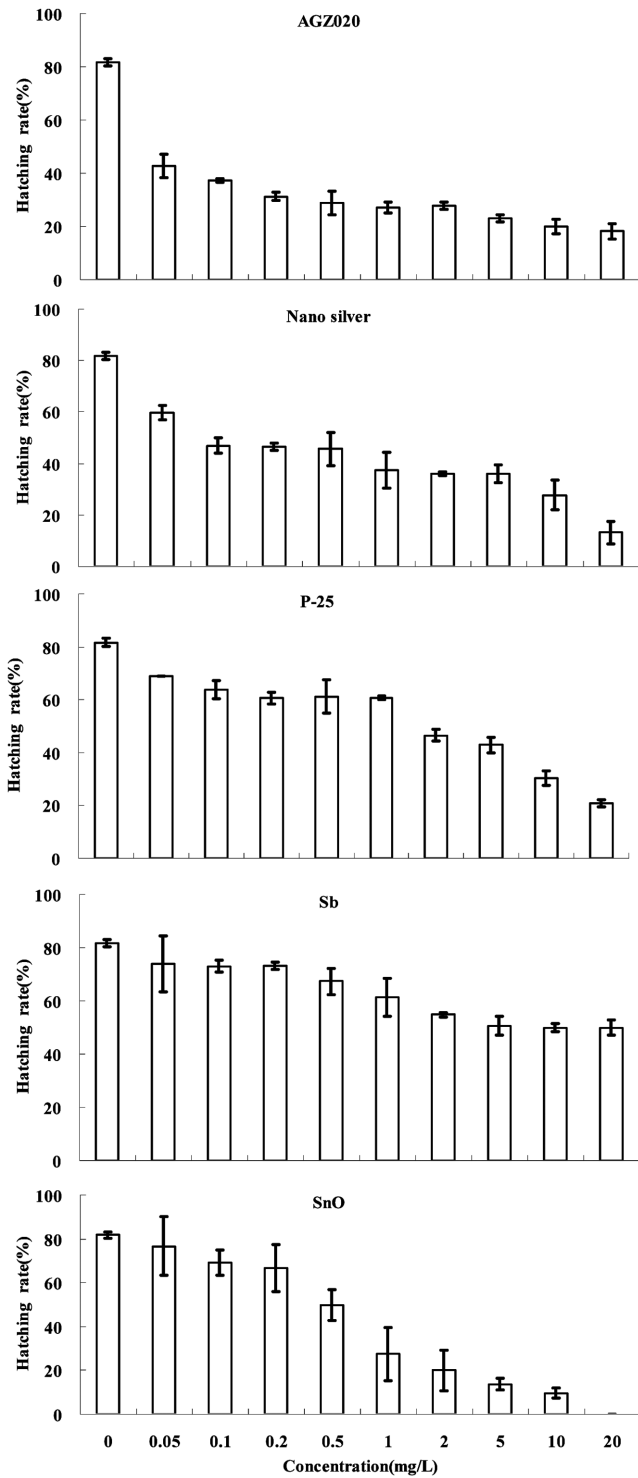


Fig. 3. Effect of nanoparticles (AGZ020, P-25, Nano silver, Sb, SnO) on hatching rate of *Artemia* sp. cyst, at various concentration.

에서 nauplius로 부화하였다. 대조구에 비해 각각의 유해성으로 보였지만, AGZ020, Nano silver, P-25, Sb 및 SnO 나노입자에 비해 상대적으로 미약한 것으로 나타났다.

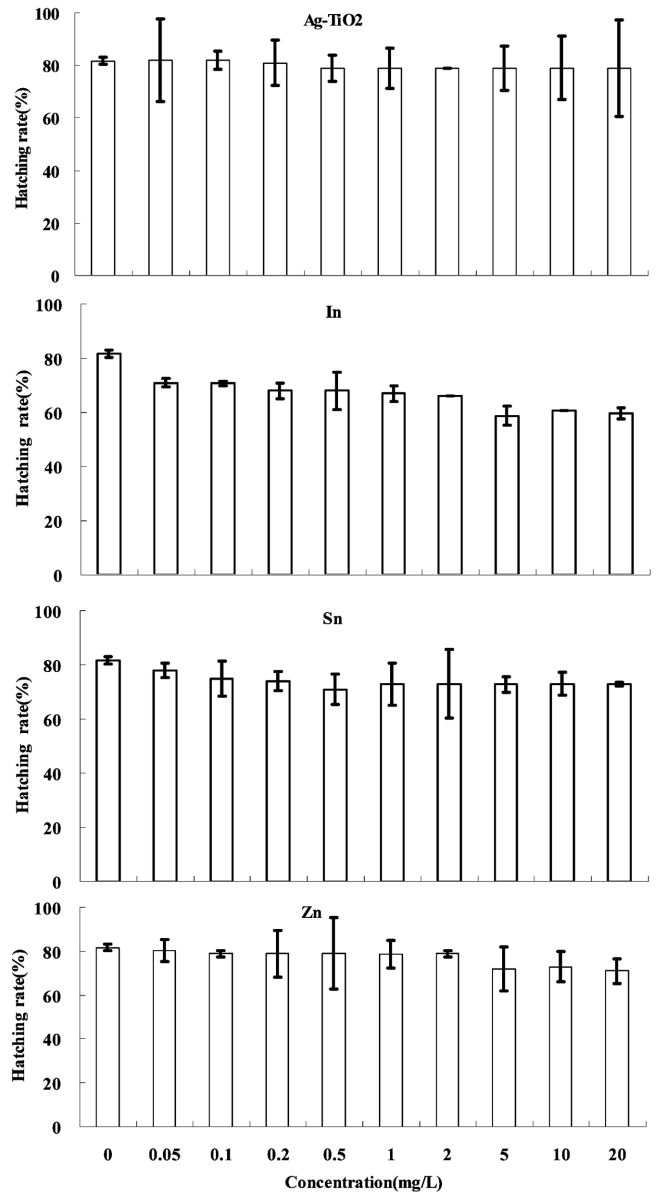


Fig. 4. Effect of nanoparticles (Ag-TiO<sub>2</sub>, In, Sn, Zn) on hatching rate of *Artemia* sp., cyst, at various concentration.

#### 4. 결 론

이 연구는 9종 나노입자가 알테미아 cyst에서 nauplius로 부화되는 과정에 어떠한 영향을 주는지 살펴보았다.

그 결과, 평균소재의 이온으로서 은(Ag)이 포함되어 있는AGZ020 과 Nano silver 나노입자, 항균제의 P-25 나노입자, 산소를 결합시킨 SnO 나노입자 그리고 Sb 나노입자는 cyst에서 nauplius로 부화되는 과정에 비교적 큰 유해성을 보인 것으로 나타났으며, Ag-TiO<sub>2</sub>, In, Sn 및 Zn 나노입자에서는 대조구에 비해 유해성이 있는 것으로 나타났지만, AGZ020, Nano silver, P-25, Sb 및 SnO 나노입자에 비해 상대적으로 미약한 것으로 나타났다. 이러한 이유는 나노입자에 첨가되어 있는 성분에 따라 상이한 영향이 나타난 것

을 알 수 있었으며, 이는 앞으로 나노입자의 개발 및 응용에 주의를 기울여야 할 필요가 있을 것이다. 이들 나노입자들은 현재 가전, 기능성 화장품, 항균제 및 광촉매제로 널리 사용되고 있어, 이들이 수중환경으로 유입될 경우 수중생태계에 영향을 줄 우려가 높기 때문에 나노입자가 가지는 잠재적 위험성을 지속적으로 연구해야 할 것이다.

### 참고문헌

- [1] 김영훈, 이종협, 2005, 나노기술의 유해성, 한국화학공학회, News & Information for Chemical Engineers, 제23권, 제3호, pp. 338-342.
- [2] 김장희, 2004, 나노 실버 항균 소재 및 응용, 한국화학공학회, News & Information for Chemical Engineers, 제22권, 제6호, pp. 656-660.
- [3] 서필원, 최상현, 문상진, 이상진, 장방진, 홍성창, 2006, Degussa TiO<sub>2</sub>를 이용한 시료 액상 반응활성의 비교평가를 위한 표준조건, 한국환경분석학회지, 제9권, 제2호, pp. 105-113.
- [4] 최봉기, 김경호, 소대섭, 유일재, 2007, 나노기술의 환경·보건·안전성 영향에 관한 연구동향, 한국공업화학지, 제10권, 제1호, pp. 48-71.
- [5] Aleesio, H.M., 1993, Exercise induced oxidative stresses Medicine Science & Sport and Exercise, Vol. 25, No. 2, pp. 218-224.
- [6] Barbara, M. Rothen-Rutishauser, Samuel Schrch, Beat Haenni, Nadine Kapp, and Peter Gehr 2006, Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques, Environmental Science and Technology, Vol. 40, No.14, pp. 4353-4359.
- [7] Franklin, T.J. and Snow, G.A., 1989, Biochemistry of antimicrobial action, Chapman and Hall, London, 4th ed, pp. 55-72.
- [8] Yamagishi, H., Saito, K., Furusaki, S., Sugo, T. and Ishigaki, I., 1991, Introduction of a high-density chelating group into a porous membrane without lowering the flux, Industrial & Engineering Chemistry reasearch, Vol. 30, pp. 2234-2237.
- [9] Robert, B.T. and Charles, P.G., 1989, The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses, CRC Critical Reviews Environmental Control, Vol. 18, No. 4, pp. 295-315.
- [10] Russell, A.D. and Hugo, W.B., 1994, Antimicrobial activity and action of silver, Progress in Medicinal Chemistry, Vol. 31, pp. 351-370.
- [11] Thomas, C. Long, Navid Saleh, Robert D. Tilton, Gregory V. Lowry, and Bellina Veronesi, 2006, Titanium Dioxide (P25) Produces Reative Oxygen species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. Environmental Science & Technology, Vol. 40, No. 14, pp. 4346-4352.

2009년 10월 21일 원고접수

2009년 11월 24일 심사완료

2009년 11월 24일 수정본 채택