

## 다양한 특성의 은나노물질이 수생생물에 미치는 독성영향평가

홍남희<sup>1</sup> · 정윤주<sup>1</sup> · 박준우<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>안전성평가연구소 경남환경독성본부, <sup>2</sup>과학기술연합대학원대학교 인체 및 환경독성학 전공

### Ecotoxicity Assessment of Silver Nanomaterials with Different Physicochemical Characteristics in Diverse Aquatic Organisms

Nam-Hui Hong<sup>1</sup>, Youn-Joo Jung<sup>1</sup> and June-Woo Park<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Gyeongnam Department of Environmental Toxicology Chemistry, Korea Institute of Toxicology, Jin-Ju, Gyeongnam, Republic of Korea

<sup>2</sup>Human and Environmental Toxicology Program, Korea University of Science and Technology (UST), Daejeon 34114, Republic of Korea

**Abstract** - Silver nanomaterials have been intensively applied in consumer products of diverse industrial sectors because of their strong biocidal properties and reported to be hazardous to aquatic organisms once released in the environment. Nanomaterials including silver, are known to be different in toxicity according to their physicochemical characteristics such as size, shape, length etc. However studies comparing toxicity among silver nanomaterials with different physicochemical characteristics are very limited. Here, toxicities of silver nanomaterials with different size (50, 100, 150 nm), length (10, 20  $\mu$ m), shape (wire, sphere), and coating material (polyvinylpyrrolidone, citrate) using OECD test guidelines were evaluated in aquatic species (zebrafish, daphnia, algae) and compared. On a size property, the smaller of silver nanomaterials, the more toxic to tested organisms. Sphered type of silver nanomaterials was less toxic to organisms than wired type, and shorter nanowires were less toxic than longer ones. Meanwhile the toxic effects of materials coated on silver nanomaterials were slightly different in each tested species, but not statistically significant. To the best of our knowledge, it is first investigation to evaluate and compare ecotoxicity of silver nanomaterials having different physicochemical characteristics using same test species and test guidelines. This study can provide valuable information for human and environmental risk assessment of silver nanomaterials and guide material manufacturers to synthesize silver nanomaterials more safely to human and environment.

**Key words** : silver nanomaterials, toxicity comparison, size, shape, coating materials

## 서 론

현재 다양한 나노물질이 의료, 화학 전기 등 다양한 분야에서 응용, 사용되고 있지만(Meng and jin 2011; Sund *et al.*

2011; Baetke *et al.* 2015) 그중에서 항균작용의 탁월성 때문에 사용되는 은나노물질은 가장 널리 소비되고 있는 나노물질 중 하나로 알려져 있다(Benn and Weterhoff 2008; Eckhardt *et al.* 2013). 이러한 은나노제품의 소비증가는 결국 환경으로 대량 유입되어 직간접적으로 인간과 생태계에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다(Klaine *et al.* 2008;

\* Corresponding author: June-Woo Park, Tel. 055-750-3833, Fax. 055-750-3799, E-mail. jwpark@kitox.re.kr

Vecitis *et al.* 2010; Rahaman *et al.* 2012). 나노물질은 사용 목적에 따라 입자의 크기, 길이, 코팅종류, 형태, 표면전하 등 물리화학적 특성을 조절하여 제조되고 있으며, 일반적인 화학물질과 달리 나노물질은 동일물질이라고 하더라도 특성에 따라 서로 다른 유해성을 나타낸다고 알려져 있다 (Wiench *et al.* 2009; Silva *et al.* 2014b). 은나노물질 역시 사용용도에 따라 다양한 물리화학적 특징을 갖도록 제조되고 있지만 지금까지의 은나노 독성연구는 특성 간 차이를 고려하지 않은 매우 제한적인 독성학적 정보생산에 그치고 있는 실정이다.

나노물질의 크기에 따른 독성평가는 비교적 많은 연구에서 보고되고 있다 (Kobayashi *et al.* 2009; Powers *et al.* 2011; Meredith *et al.* 2016). 세 가지 크기 (5, 23, 154 nm)의 산화티타늄 나노입자에 노출시킨 쥐들 중 가장 작은 입자에 노출된 쥐의 폐에서 염증이 더 심하게 유도되었으며 (Kobayashi *et al.* 2009), 은나노입자에 노출된 제브라피쉬의 경우, 10 nm 사이즈의 입자에서는 활동저하를 보였지만, 반대로 50 nm 사이즈의 입자에서는 과잉행동을 나타내기도 하였다 (Powers *et al.* 2011). 반면, Meredith *et al.* (2016)의 연구에서는 제브라피쉬 배아에 나노크기 (220 nm)와 마이크로 크기 (2200 nm)의 캡슐로 된 살충제의 영향을 비교하였을 경우 크기와 상관없이 치사가 발생하였음을 보여주었다. 은나노와이어 (선형)는 터치스크린과 유연 디스플레이의 재료가 되는 핵심 물질로 알려져 있으며 (Langley *et al.* 2013), 은나노입자에 비해 독성연구는 매우 제한적으로 수행되었다. 은나노와이어에 노출된 제브라피쉬 배아에서 급성독성이 보고된 바 있으며 (Artal *et al.* 2013), 은나노입자와 은나노와이어에 노출된 물벼룩, 조류, 어류의 독성의 비교에 대한 연구도 비교적 최근 수행되었다 (Sohn *et al.* 2015). 은나노와이어의 길이에 따른 독성연구 (Silva *et al.* 2014a; Chae and An 2016)도 수행된 바 있지만, 단일 생물에서의 독성평가 결과로써 다양한 생물 (예, 먹이사슬 구조를 이루고 있는 수생생물들)에서의 유해성연구는 아직 미흡한 실정이다. 나노물질은 수계 환경에 노출되면 높은 표면에너지를 보다 안정적인 낮은 에너지로 전환시키기 위해 응집하는 경향이 일반적이다. 즉 노출배지에서 초기의 물리화학적 특성을 유지하지 못해 응집, 침전 등 (Liu and Hurt 2010)으로 분산의 문제가 발생하는데 이러한 결과는 종종 나노물질의 독성을 정확하게 평가하지 못하게 하는 장애요소로 알려져 있다 (Tejamaya *et al.* 2012; Cupi *et al.* 2016). PVP (polyvinylpyrrolidone)와 citrate는 분산이 잘되는 특징 (El badawy *et al.* 2012)을 가지고 있는 대표적인 은나노물질의 코팅물질로써 분산성 문제를 해결하기 위해 독성연구에 자주 사용되고 있다. 최근 코팅물질이 은나노물질의 독성에 영향을 주는지 평가하는 연구가 수행되고 있지만 그 결과는 실험에 따라 상이하게 나타나고 있다. Zhang

*et al.* (2014)는 citrate가 포유류 세포의 독성을 저감시킨다고 발표했지만, Wang *et al.* (2014)는 오히려 독성을 증가시킨다고 발표한 바 있다. 코팅종류별로 연구한 Silva *et al.* (2014b)은 PVP와 citrate, BPEI (branched polyethyleneimine)를 코팅제로 사용하였을 때 *E. coli*와 물벼룩에서의 독성이 서로 다르게 나타남을 보고하였다.

기존 연구들이 은나노물질의 크기, 형태, 코팅물질에 따른 생태독성 등을 발표하였지만, 각기 서로 다른 생물체, 실험조건 등에서 수행되었기 때문에 체계적으로 비교하기에는 부족하였다. 본 연구는 수생태계를 대표하는 3종의 생물 (조류, 물벼룩, 어류)을 이용하여 동일한 실험조건에서 은나노물질의 크기, 형태, 코팅종류에 따른 생태독성을 비교평가하였다. 실험결과는 은나노물질의 생태독성자료로서 의의가 있을 뿐만 아니라 각 물리화학적 특징에 따른 은나노물질의 규제기준을 제시할 수 있어 안전한 나노물질의 사용을 위한 유해성평가의 기초자료로 제시할 수 있다.

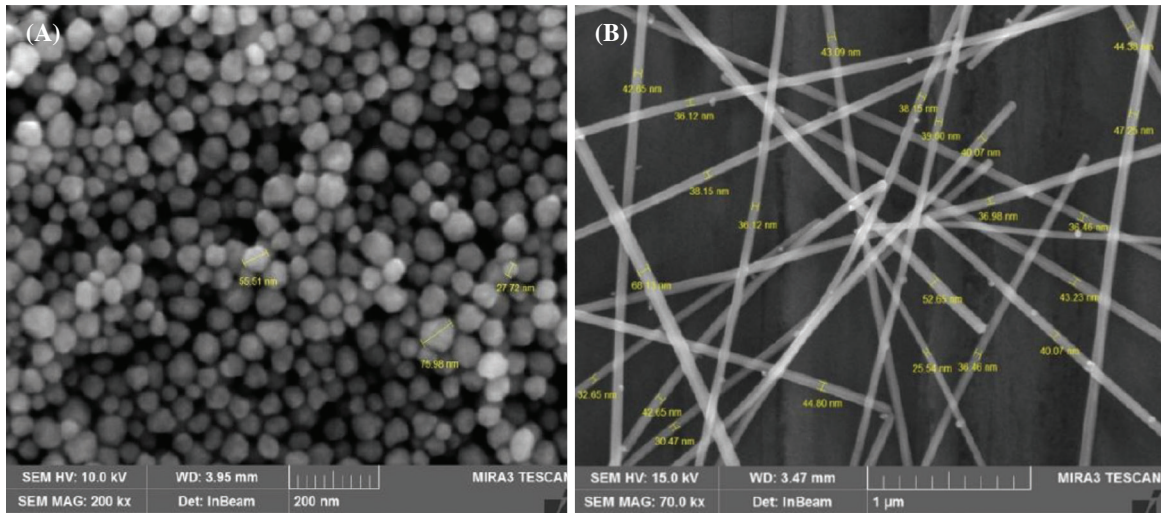
## 재료 및 방법

### 1. 시험생물

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소에서 사육하고 있는 제브라피쉬 (*Danio rerio*), 물벼룩 (*Daphnia magna*), 조류 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)를 시험생물로 사용하였다. 제브라피쉬의 경우 건강한 성체에서 산란하여 부화한 (< 72 hpf) 치어를 사용하였고 사육 및 시험기간 동안 온도 24 ± 1°C 광주기 16시간/8시간 (명/암)으로 유지하였다. 사육기간 동안 먹이는 Artemia와 Tetramin을 1회씩 오전, 오후로 2번 공급하였으며 시험개시 1일 전에 절식하였다. 물벼룩 독성시험을 위해 3회 이상 물벼룩을 생산하고 태어난 지 24시간 미만 된 어린개체 (neonate)를 시험에 사용하였으며 48시간의 시험기간 동안 먹이는 공급되지 않았다. 온도는 19 ± 1°C를 광주기는 16시간/8시간 (명/암)으로 유지하였다. 조류는 시험 시작 3일 전에 본시험과 같은 조건에서 전배양하여 지수성장기의 세포를 시험에 사용하였다. 빛은 계속 조명 (4,440 ~ 8,880 Lux)을 하였으며 온도는 21 ± 1°C를 유지하였다.

### 2. 시험물질 및 분산방법

은나노입자는 직경 약 57, 100, 151 nm의 물질 (50AgNPs, 100AgNPs, 150AgNPs)을 구매하였으며, 선형 은나노는 길이 약 10, 20 μm (직경 약 40 nm)의 물질 (10AgNWs, 20AgNWs)을 구매하였다 ((주)엔앤비, 대전, 대한민국 (Fig. 1)). 각 은나노물질은 PVP로 코팅되었으며 suspension 형태로 제공되었다. 서로 다른 코팅물질에 의한 독성영향 비교를 위해



**Fig. 1.** Scanning-electron micrograph images of polyvinylpyrrolidone (PVP) coated AgNPs and AgNWs<sup>a</sup>; (A) AgNPs with an average diameter of 56.6 nm, (B) AgNWs with an average diameter of 41.3 nm and length of 9.6 μm. <sup>a</sup>manufactural provided images

**Table 1.** Physiochemical properties of tested silver nanomaterials<sup>a</sup>

Type	Coating material	Diameter (nm)	Length (μm)	Polymer/Silver (wt/wt)
50AgNPs	PVP <sup>b</sup>	56.6	—	10.95/89.05
100AgNPs		100.1	—	10.70/89.30
150AgNPs		151.0	—	10.09/89.91
10AgNWs		41.3	9.6	4.04/95.96
20AgNWs		42.1	21.0	3.02/96.98
pAgNPs	PVP <sup>b</sup>	43.4	—	< 1/99
cAgNPs	Citrate		—	

<sup>a</sup>manufactural provided data

<sup>b</sup>polyvinylpyrrolidone

여 각각 PVP와 citrate로 코팅된 (pAgNPs, cAgNPs) 은나노 입자 (median size, 약 43.4 nm)를 사용하였다 (CNVISION CO., LTD., 서울, 대한민국). 구입한 물질의 종류 및 특성은 Table 1에 제시하였다. Suspension으로 제공된 은나노물질 (50AgNPs, 100AgNPs, 150AgNPs, 10AgNWs, 20AgNWs)의 경우, stock suspension을 각 시험 농도에 맞게 배지에 희석 (200 rpm, 10분 교반)하여 노출용액을 조제하였다. 파우더 형태로 제공된 물질 (cAgNPs, pAgNPs)은 각 농도에 맞게 칭량한 후 시험배지에 주입하여 10분간 교반하였고, Probe sonicator (Sonics, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA)를 이용하여 50 ± 5 W에서 30분 동안 초음파분산을 수행하였다.

### 3. 은나노물질의 응집성 평가

각 생물배지 내에서 은나노물질의 응집성을 확인하기 위하여 독성시험과 동일한 기간 (어류 및 조류 72시간, 물벼룩

48시간) 동안 수화학적 입자크기의 변화를 분석하였다. 시험용액은 10 mg L<sup>-1</sup> 농도로 조제하여 정치시킨 후, cuvette에 3 mL씩 분취하여 Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, UK)를 이용하여 수화학적 입자크기를 측정하였다. 측정은 24시간마다 수행하였으며, 각 시간마다 3회씩 반복 측정된 평균값을 응집성 변화 확인에 이용하였다.

### 4. 시험방법

#### 1) 어류

어류급성독성시험은 OECD 시험지침 203 (OECD 1992)를 바탕으로 진행하였다. 노출농도 구간 설정을 위한 예비시험을 통해 50AgNPs에서 6.2~200 mg L<sup>-1</sup>, 100AgNPs와 150AgNPs에서 100~1000 mg L<sup>-1</sup>, 10AgNWs와 20AgNWs에서 1.5~17.08 mg L<sup>-1</sup>, 그리고 pAgNPs와 cAgNPs에서 1~32 mg L<sup>-1</sup> 구간에서 최소 6개 이상의 농도를 공비 2 이하로 설정하였다. 각 농도별로 준비한 시험용액을 유리비커에

100 mL씩 첨가한 후 각 비커에 30마리의 제브라피쉬 치어 (<72 hpf)를 노출하였다. 시험물질을 교환하지 않는 지수식 방법을 사용하였으며, 72시간 동안 노출하였다. 시험기간 동안 먹이는 공급되지 않았고 온도는  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 빛은 명반응 16시간, 암반응 8시간을 유지했다. 노출 후 24시간마다 이상 개체 및 치사개체를 확인한 후 치사한 개체는 즉시 제거하였다.

## 2) 물벼룩

OECD 시험지침 202 (OECD 2004)를 바탕으로 물벼룩 급성독성시험을 진행하였다. 농도구간 설정을 위한 예비시험을 수행한 후 본시험을 50AgNPs, 100AgNPs, 150AgNPs에서  $0.01 \sim 1 \text{ mg L}^{-1}$ , 10AgNWs와 20AgNW에서  $0.005 \sim 1 \text{ mg L}^{-1}$ , 그리고 pAgNPs와 cAgNPs에서  $0.02 \sim 10 \text{ mg L}^{-1}$ 의 구간에서 공비 2로 최소 5개 이상의 시험농도를 설정하였다. 준비된 시험용액을 비커에 100 mL씩 넣은 후 생후 24시간 미만의 물벼룩을 5마리씩 넣어 4반복으로 수행하였으며, 시험은 지수식으로 진행하였다. 48시간의 노출기간 동안 먹이는 공급되지 않았고 온도는  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지했으며 빛은 명반응 16시간, 암반응 8시간을 유지하였다. 유영저해, 비정상적인 행동 및 외형은 24시간마다 관찰하였으며, 물질의 색으로 인해 관찰이 어려운 경우 시험시작과 종료 후, 페트리디쉬에 옮겨 관찰했다. 시험용액을 가볍게 저어준 다음 물벼룩이 15초 이내에 흐름을 벗어나기 위한 유영을 하지 못하는 경우, 유영저해로 판단하였다.

## 3) 조류

조류성장저해시험은 OECD 시험지침 201 (OECD 2006)을 바탕으로 진행하였다. 시험농도는 예비시험을 통해 설정하였으며, 50AgNPs, 100AgNPs, 150AgNPs에서  $0.11 \sim 27 \text{ mg L}^{-1}$ , 10AgNWs와 20AgNW에서  $0.03 \sim 1.25 \text{ mg L}^{-1}$ , 그리고 pAgNPs와 cAgNPs에서  $0.04 \sim 10 \text{ mg L}^{-1}$ 의 농도구간에서 공비 3 이하로 최소 5개 이상의 농도를 결정하였다. 전배양한 조류를 시험용액에  $5 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ 이 되도록 접종하고 조류세포의 부유와 가스교환이 충분히 일어나도록 약 100회 분<sup>-1</sup> 정도로 계속 교반하였다. 노출은 각 농도별로 3반복하여 72시간 동안 실시하였으며, 연속조명(4,440~8,880 Lux) 하에서 온도는  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 조류세포의 양은 시험 시작일과 시험 종료일에 각각 측정하였으며, Aruoja *et al.* (2004)의 엽록소 추출법을 이용하여 분석하였다. 순도 99% 이상의 에탄올을 시험용액의 4배 양으로 넣고 3시간 동안 200 rpm에서 교반하여 엽록소를 추출한 후 검정색 96 well microplate에 분주하여 multi-microplate reader (BioTek, Winooski, USA)를 이용하여 형광을 측정하였다(excitation 444 nm, emission 680 nm).

## 5. 통계처리

어류의 반수치사농도(LC<sub>50</sub>) 및 물벼룩과 조류의 반수영향농도(EC<sub>50</sub>) 산출을 위한 통계처리는 CETIS (Version: 1.8.0.9. Tidepool Scientific Software, USA)의 Linear Interpolation Method 또는 Sigmaplot (SPS Chicago, IL, USA)의 Probit, Method를 이용하였다.

## 결 과

### 1. AgNPs의 크기에 따른 영향

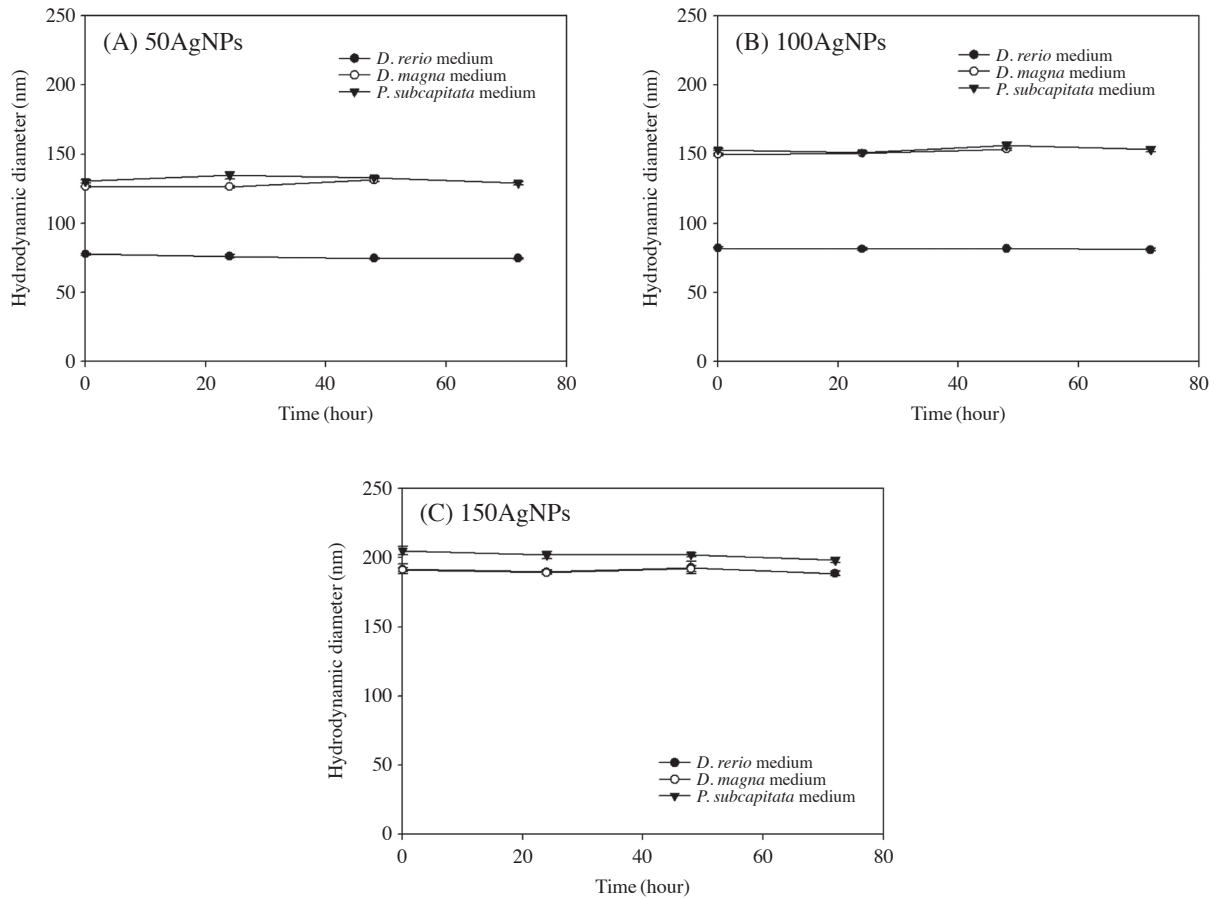
시험기간 동안 은나노물질의 수화학적 크기 변화를 분석한 결과, 50AgNPs, 100AgNPs, 150AgNPs 모두 시간에 따른 입자크기의 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 2). 입자크기가 다른 은나노물질의 LC<sub>50</sub> 값은 50AgNPs에서  $23.33 \text{ mg L}^{-1}$ , 100AgNPs에서  $326.60 \text{ mg L}^{-1}$ , 150AgNPs에서  $219.10 \text{ mg L}^{-1}$ 로 어류에 대한 독성은 50AgNPs > 150AgNPs > 100AgNPs의 순서로 나타났다(Table 2). 물벼룩의 유영저해에 영향을 주는 입자크기는 50 nm에서 가장 높은 독성(EC<sub>50</sub> =  $0.08 \text{ mg L}^{-1}$ )을 보였고, 150 nm (EC<sub>50</sub> =  $0.24 \text{ mg L}^{-1}$ ), 100 nm (EC<sub>50</sub> =  $0.35 \text{ mg L}^{-1}$ ) 순서로 나타났다. 앞서 진행한 결과와는 달리 조류성장저해 시험에서는 100 nm에서 독성(EC<sub>50</sub> =  $0.08 \text{ mg L}^{-1}$ )이 높았고, 그 다음은 50 nm (EC<sub>50</sub> =  $0.41 \text{ mg L}^{-1}$ ), 150 nm (EC<sub>50</sub> =  $0.59 \text{ mg L}^{-1}$ )의 순서였다.

### 2. AgNWs의 길이에 따른 영향

은나노와이어의 경우, 길이가 마이크로 사이즈 이상이므로 dynamic light scattering을 이용한 수화학적 크기의 측정이 불가능하였다. 어류 급성독성시험에서 은나노와이어의 LC<sub>50</sub> 값은 10AgNWs는  $5.59 \text{ mg L}^{-1}$ , 20AgNWs는  $3.59 \text{ mg L}^{-1}$ 로 길이가 긴 20AgNWs에서 더 높은 독성을 유발하는 것으로 확인되었으며, 물벼룩의 독성결과도 10AgNWs의 EC<sub>50</sub>이  $0.06 \text{ mg L}^{-1}$ 를 보인 것에 비해 20AgNWs의 경우  $0.03 \text{ mg L}^{-1}$ 로 약간 높은 독성을 나타내었다(Table 2). 조류 시험에서도 마찬가지로 10AgNWs와 20AgNWs에서 각각  $0.57, 0.07 \text{ mg L}^{-1}$ 를 나타내 길이가 긴 은나노와이어의 독성이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

### 3. AgNPs와 AgNWs의 비교

유사한 지름의 50AgNPs와 은나노와이어의 어류독성을 비교했을 때에 중횡비가 1인 50AgNPs 비해 중횡비가 약 230인 10AgNW가 4배, 중횡비가 약 500인 20AgNW가 6배



**Fig. 2.** Hydrodynamic diameter changes of silver nanoparticles with different size range in each exposure medium at  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Measurement were conducted during 48 hours (for *D. magna* medium) or 72 hours (for *D. rerio* and *P. subcapitata* medium); (A) 50 nm AgNPs, (B) 100 nm AgNPs, and (C) 150 nm AgNPs.

높은 독성을 보였고 물벼룩의 시험에서도 유사한 결과가 나타났다(20AgNW > 10AgNW > 50AgNP) (Table 2). 하지만 조류성장저해의 결과는 20AgNW > 50AgNP > 10AgNW 순으로 독성이 높게 나타났다.

**4. AgNPs의 코팅에 따른 영향**

어류와 조류 시험배지에서는 pAgNPs와 cAgNPs 모두 수화학적 크기의 유의한 변화를 나타내지 않아 비교적 수계에서 안정한 것으로 나타났으나, 물벼룩 시험배지에서는 24시간 경과 후 두 나노물질 모두 수화학적 크기 측정이 불가능 하였다(Polydispersity index = 1, Fig. 3). 72시간의 어류 급성시험에서 코팅물질이 서로 다른 은나노입자의 경우, pAgNPs가  $1.93 \text{ mg L}^{-1}$ , cAgNPs가  $2.91 \text{ mg L}^{-1}$ 의 LC<sub>50</sub> 값을 나타내어 PVP가 코팅물질로 사용된 은나노입자의 독성이 상대적으로 높은 것으로 나타났지만, 물벼룩의 유영저해 결과는 PVP와 citrate로 각각 코팅된 AgNPs의 독성값

이 각각  $0.86, 0.63 \text{ mg L}^{-1}$ 로 나타내었다(Table 2). 어류독성 결과와 마찬가지로 조류 급성독성결과를 비교하면 pAgNPs ( $EC_{50} = 0.26 \text{ mg L}^{-1}$ )가 cAgNPs ( $EC_{50} = 0.71 \text{ mg L}^{-1}$ )에 비해 독성이 높음을 확인할 수 있었다.

**5. 수생생물의 종별 비교**

은나노물질의 특성(크기, 형태, 코팅종류)에 따른 생물종간 민감성(독성)을 비교하였다(Fig. 4). 물벼룩과 조류는 은나노물질에 대해 비교적 유사한 민감성을 나타내었으나, 어류는 이에 비해 모든 형태의 은나노물질에서 비교적 낮은 민감성을 나타내는 것을 확인하였다.

**고찰**

본 연구는 크기, 길이, 모양, 코팅종류 등 다양한 물리화학

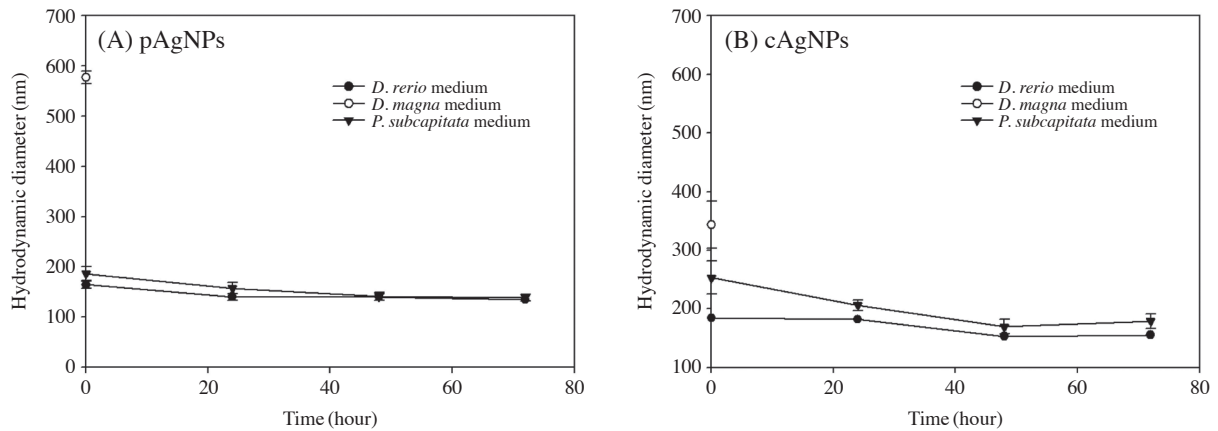
**Table 2.** Comparative toxicity values of different silver nanomaterials for *D. rerio*, *D. magna* and *P. subcapitata*

Species (Measurement)	Endpoint	Type	Toxicity value (mg L <sup>-1</sup> )	Confidence interval (95%)
<i>Danio rerio</i> (72 h-LC <sub>50</sub> )	Mortality	50AgNPs	23.33	18.50~29.08
		100AgNPs	326.60	286.50~371.70
		150AgNPs	219.10	196.70~243.80
		10AgNWs	5.59	4.68~6.71
		20AgNWs	3.59	3.11~4.11
		pAgNPs	1.93	1.67~2.08
		cAgNPs	2.91	2.84~3.07
<i>Daphnia magna</i> (48 h-EC <sub>50</sub> )	Immobilisation	50AgNPs	0.08	—
		100AgNPs	0.35	—
		150AgNPs	0.24	—
		10AgNWs	0.06	0.04~0.08
		20AgNWs	0.03	0.02~0.04
		pAgNPs	0.86	0.71~1.14
		cAgNPs	0.63	0.32~1.50
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (72 h-EC <sub>50</sub> )	Growth inhibition	50AgNPs	0.41	0.21~0.70
		100AgNPs	0.08	0.07~0.09
		150AgNPs	0.59	0.39~0.94
		10AgNWs	0.57	0.21~0.88
		20AgNWs	0.07	0.07~0.08
		pAgNPs	0.26	0.12~0.33
		cAgNPs	0.71	0.23~1.28

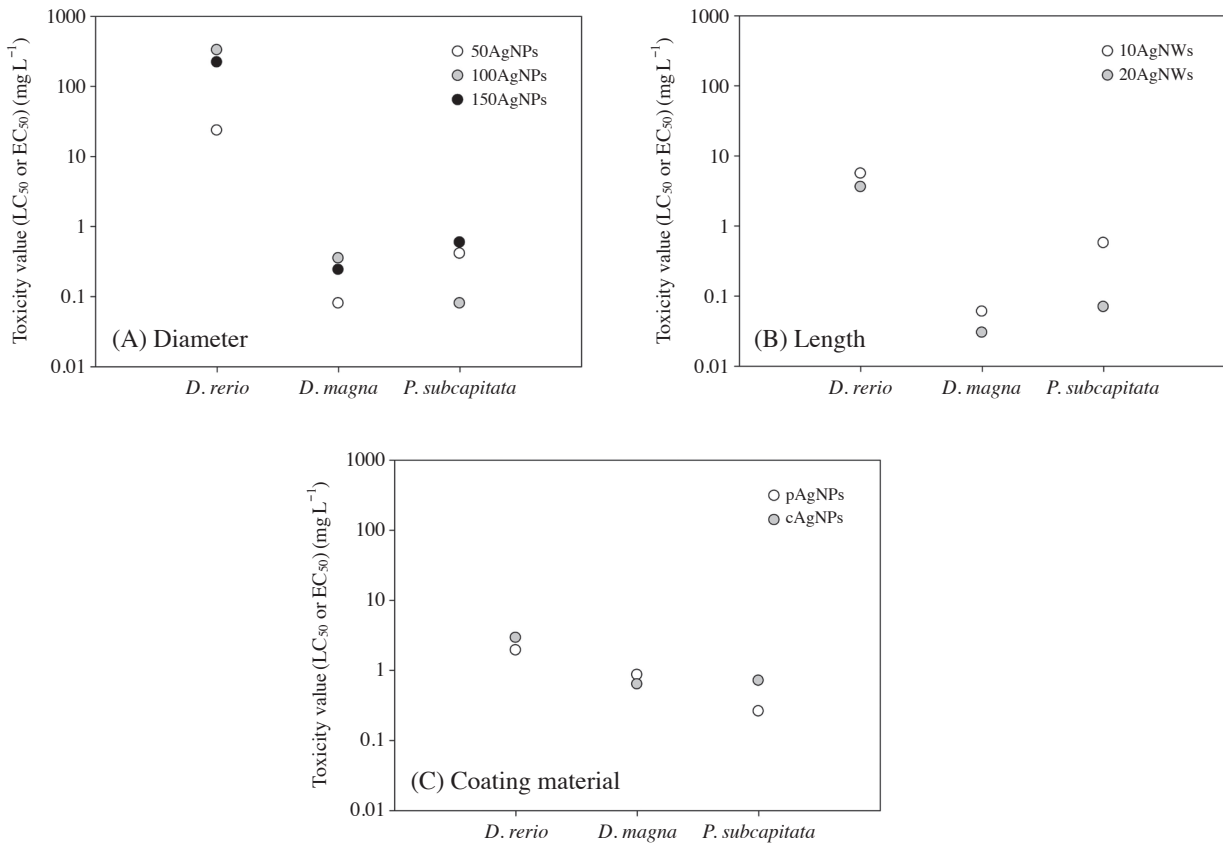
적 특징의 은나노물질이 수생태계를 구성하는 생물에 미치는 영향을 종합적으로 평가하는 것을 목적으로 하였다. 이전 연구들은 주로 단일 생물에 다양한 특징 또는 수 개의 생물에 동일한 특징을 평가한 경우가 많고, 특히 연구들 간 서로 다른 시험생물, 실험조건, 은나노물질 등에서 수행되었기 때문에 은나노물질의 특성에 따른 독성영향 결과들을 체계적으로 비교할 수 없는 단점을 보완하기 위해 진행하였다.

은나노물질을 포함한 나노물질의 독성을 평가하기 위해서는 먼저 나노물질이 시험계 안에서 노출기간 동안 안정적으로 유지되는지 확인하는 것이 필수적이다. 왜냐하면 시험생물의 배지의 성분과 입자의 특성에 따라 안정성이 달라질 수 있고 그 결과 독성영향이 달라질 수 있기 때문이다. 이미 나노물질 고유의 물리화학적 특성과 시험수의 구성성분에 따라 나노물질의 응집 및 침전현상이 결정된다는 보고가 있다 (Handy *et al.* 2008; Bian *et al.* 2011). 본 연구에서 어류 시험수 내 입자형 은나노물질의 수화학적 크기는 나노물질의 초기 입자크기와 크게 차이하지 않았다 (Fig. 2). 어류 시험수의 경우 수돗물을 마이크로 필터(사이즈 1 µm)와 활성탄 여과장치를 통과시킨 것으로서 나노물질의 응집에 영향을 줄 수 있는 성분(유기물질 등)이 거의 없어 은나노물질의 수화학적 크기에 영향을 주지 않은 것으로 생각된다. 하지만 조류와 물벼룩 시험수의 경우, 배지 특성상 다양한 2가 양이온(Ca<sup>2+</sup>)이 존재하고 있어 은나노물질의 응집을 예상할 수 있고 (Badawy *et al.* 2010) 본 실험결과도 이와 동일했다. 최근 배지의 염성분으로 인한 나노물질 응집, 침전

리고 이로 인한 독성평가의 어려움을 극복하기 위하여 많은 노력이 진행되고 있다. 특히 최근에는 시험 배지의 구성성분을 희석하여 나노물질의 독성평가를 수행하는 연구도 발표되고 있다 (Romer *et al.* 2011; Tejamaya *et al.* 2012; Park *et al.* 2014; Cupi *et al.* 2016). 흥미로운 결과는 150 nm 은나노 경우, 배지의 이온강도와 상관없이 모든 시험수에서 비슷한 수화학적 크기(약 200 nm)를 보였다는 점이다 (Fig. 2). 이 결과는 나노입자의 초기 크기 역시, 시험수 내 구성성분과 더불어 시험계 내 안정성에 영향을 주는 요인이 될 수 있음을 의미한다. 코팅종류가 다른 은나노물질의 경우, 이온강도가 높은 물벼룩 시험수에서 수화학적 크기분석이 불가능했지만, 다른 두 시험수에서는 분석이 가능했다. 같은 종류의 은나노물질이더라도 코팅 물질이 다를 경우 근소한 수계 안정성의 차이를 보였는데, 본 시험결과 citrate가 코팅된 경우 PVP보다 응집현상이 더 높게 나타난 것을 확인하였고 그 이유는 citrate의 carboxyl 그룹이 배지 내 염 성분들과의 착물화(complexation) 영향에 기인하는 것으로 판단된다 (Badawy *et al.* 2010). 특이한 점은 약 40 nm의 크기를 가진 cAgNPs와 pAgNPs 모두 두 시험수에서 비교적 큰(약 200 nm) 수화학적 크기를 보였다는 점이다 (Fig. 3). 예를 들면, pAgNPs는 비슷한 사이즈의 PVP가 코팅된 50AgNPs의 수화학적 크기보다 어류 시험수에서 약 2.4배 그리고 물벼룩 시험수에서 약 1.5배 더 응집된 결과를 나타냈다. 그 이유는 코팅물질의 함량의 차이에서 기인한 결과로 사료된다 (Table 1). 그 독성도 각각 1.93 mg L<sup>-1</sup> (pAgNPs) 그리고 23.33 mg



**Fig. 3.** Hydrodynamic diameter changes of silver nanoparticles with different coating materials, (A) PVP (B) and citrate, in each exposure medium at  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Measurement were conducted during 48 hours (for *D. magna* medium<sup>a</sup>) or 72 hours (for *D. rerio* and *P. subcapitata* medium). <sup>a</sup> 24 and 48 hour data were not applicable (Polydispersity index = 1)



**Fig. 4.** Interspecies comparison of silver nanomaterials toxicity; depending on materials (A) diameter, (B) length, and (C) coating materials.

L<sup>-1</sup> (50AgNPs)으로 서로 차이가 있었는데, 그 이유는 두 가지로 예측될 수 있을 것이다. 먼저 pAgNPs보다 분산이 상대적으로 잘된 50AgNPs가 어류와 물벼룩에 생물이용도 (bioavailability)가 더 높아 나타난 결과일 수 있다. 비슷

한 결과로 물벼룩배지에서 분산이 잘 안될 경우, 독성이 나타나지 않는다는 보고가 발표된 바 있다(Cupi *et al.* 2016). 또한 서로 다른 코팅 함량물질 사용으로 인한 은이온 용출량 차이를 이유로 들 수 있을 것이다. 본 실험에서는 측정되

지 않았지만, 은나노물질에서 용출되는 은이온이 수생생물에 영향을 줄 수 있다는 사실은 이미 많이 보고된 바 있다 (Powers *et al.* 2010; Asghari *et al.* 2012; Newton *et al.* 2013; Ribeiro *et al.* 2014). 특이한 점은 AgNWs의 경우, DLS 측정이 불가능할 정도로 수계에서 안전성이 낮았지만, 비교적 독성이 높게 나타나 안정성뿐만 아니라 길이와 모양에 의한 영향도 독성에 영향을 줄 수 있는 것으로 나타났으며, Chae and An (2016)의 연구 역시 본 실험의 결과와 유사하였다. Cupi *et al.* (2016)의 결과처럼 높은 분산성에 의한 생물체의 민감성 향상 그로 인한 높은 독성을 예측할 수 있지만, 실제 결과는 시험수와의 상호작용으로 인한 분산성뿐만 아니라 물질자체의 특징도 생물에 영향을 줌으로서 나노물질과 생물의 상호관계에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

서로 다른 사이즈의 은나노입자에 노출된 제브라피쉬와 물벼룩은 작은 크기의 은나노물질에서 독성이 높았는데 (Table 2) 이는 서로 다른 사이즈의 TiO<sub>2</sub> 나노물질을 물벼룩에 노출시켰을 때 작은 크기에서 독성이 높았던 것과 일치한다 (Wiench *et al.* 2009; Bang *et al.* 2011). 또한 은나노물질의 사이즈가 작을수록 세포에 섭취가 더욱 잘 이루어져 독성이 높아진다는 연구 (Carlson *et al.* 2008; Park *et al.* 2011)도 본 실험의 연구결과를 뒷받침할 수 있다. 조류의 경우, 은나노물질의 사이즈 특성에 따라 독성의 변화를 관찰할 수 없었다. 길이에 따른 독성평가 결과, 10AgNWs 보다 20AgNWs에서 높은 독성이 있다는 결과 (Table 2)가 3종의 시험생물 모두 일치되었는데 이는 동일한 길이의 은나노와이어로 물벼룩과 조류를 실험했던 Chae and An (2016)의 결과와 일치한다. 특이한 점은 조류에서 길이에 따른 독성차이 (8.1배)가 어류와 물벼룩의 독성차이 (각 1.6배, 2배)에 비해 크게 나타났는데, 이는 상대적으로 길이가 긴 은나노와이어가 짧은 은나노와이어에 비해 조류와의 영킴이 더 쉽게 나타났기 때문으로 추정된다. 실제로 은나노와이어와 유사한 형태를 가지는 탄소나노튜브의 경우, 조류가 탄소나노튜브와 응집을 형성함에 따라 조류의 광합성이 저해되는 등 성장 조건이 변화하게 됨으로써 조류의 성장을 저해하는 효과가 크다는 연구결과도 제시되었다 (Schwab *et al.* 2011). 한편, 서로 다른 물질로 코팅된 은나노입자에 노출한 결과, 어류와 조류에서는 pAgNP가 독성이 높은 반면 물벼룩은 cAgNP의 독성이 높은 것으로 나타났다 (Table 2). 이는 코팅물질에 따른 물벼룩 독성을 비교하였을 때 cAgNP가 pAgNP보다 독성이 높게 나타난 결과 (Silva *et al.* 2014b)와 일치하지만, 독성값의 confidence interval (95%) 범위가 서로 겹치는 것으로 보아 코팅물질에 따라 독성에 유의한 차이가 있다고 보기는 어려울 것으로 생각된다.

나노물질이 환경생물에 영향을 준다는 보고는 이미 많이

발표되었다. 물벼룩의 소화기관을 파괴하고 (Chae and An 2016), 어류의 뇌와 눈까지 침투하여 해로운 영향을 미칠 수 있는 (Kawk *et al.* 2012) 나노물질은 환경뿐만 아니라 인체에 게 위협적인 존재가 될 수 있다. 본 연구에서는 먹이사슬 관계를 이루고 있는 3종의 생물에 대해 각각 독성영향을 평가하였지만 단계에 따른 생물을 섭취하여 먹이사슬에 전이되는지 여부를 확인한다면 인체로 유입될 가능성을 알 수 있어 좋은 후속연구의 주제가 될 것으로 생각한다. 은나노입자는 물질의 특성에 관계없이 독성이 유사하다는 발표가 있었지만 (Lee *et al.* 2013), 본 실험결과 은나노물질의 크기, 형태, 코팅종류에 따라 수생물에 나타나는 독성이 상이하고 동일한 형태의 은나노물질을 노출하더라도 생물간 민감성(독성)이 다를 수 있음을 확인할 수 있었다. 이미 우리생활에서 많이 이용하는 소재로서 나노물질의 안전한 사용을 위해 본 연구의 결과는 보다 안전한 나노물질 합성에 가이드라인을 제시할 수 있을 것으로 생각한다. 무엇보다도 이미 개발되어 사용중인 다양한 물리화학적 특징을 보유한 나노물질의 독성영향에 대해 각기 다른 대응책을 마련할 필요성이 있음을 본 연구는 제안한다.

## 적 요

지금까지 개발된 나노물질 중 은나노물질은 일상 생활제품에 가장 많이 활용된 나노물질 중 하나로 알려져 있고 다양한 경로를 통해 환경에 유입되어 환경 및 인체에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다. 화학물질과 달리 나노물질은 물리화학적 특성에 따라 동일 나노물질이더라도 그 유해성이 다르다고 알려져 있지만 기존 연구들은 다양한 특성을 동일 시험조건에서 평가하기 보다는 하나의 특성에 대해 독성을 보고하는 수준에 그치고 있다. 따라서 기존 연구들의 서로 다른 시험생물, 시험조건, 나노물질 특성 등을 고려할 때 나노물질의 물리화학적 특성에 따른 독성의 체계적인 비교평가가 어려운 한계가 존재한다. 본 연구는 은나노물질의 다양한 물리화학적 특징에 따라 수생생물에 미치는 독성영향을 평가하고자 한다. 대표적인 3종(어류, 물벼룩, 조류)의 수생생물에 대한 은나노물질의 입자상 크기 (50, 100, 150 nm), 형태(입자형, 선형), 코팅물질 종류(PVP, citrate)에 따라 생태독성평가를 진행하였다. 연구결과, 나노물질의 크기가 작을수록 그리고 입자상 형태보다 선형에서 독성이 비교적 높게 나타났다. 특히 선형 은나노의 경우, 길이에 비례하여 그리고 입자에 비해 비교적 높은 독성을 나타냈다. 반면, 은나노의 코팅물질 종류는 대상 수생생물에 따라 독성의 영향이 다르게 평가되었다. 본 연구는 은나노물



질의 다양한 물리화학적 특성에 기인한 독성을 동일한 시험 조건, 시험생물에서 체계적으로 비교 평가하였다는 점에서 의의가 있으며 본 연구결과는 은나노물질의 환경 및 인체 위해성평가 자료로서 활용될 수 있을 뿐 아니라 보다 안전한 은나노물질 소재개발을 위한 과학적 자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 안전성평가연구소 기관고유사업 “제조나노물질 환경유해성 평가기술 구축사업, KK-1604-02”와 해양수산부 해양수산환경기술개발사업의 “해양미세플라스틱에 의한 환경위해성연구”의 지원으로 수행되었다.

## REFERENCES

- Artal MC, RD Holtz, F Kummrow, OL Alves and A Umbuzeiro Gde. 2013. The role of silver and vanadium release in the toxicity of silver vanadate nanowires toward *Daphnia similis*. Environ. Toxicol. Chem. 32:908-912.
- Aruoja V, I Kurvet, HC Dubourguier and A Kahru. 2004. Toxicity testing of heavy-metal-polluted soils with algae *Selemastrum capricornutum*: a soil suspension assay. Environ. Toxicol. 19:396-402.
- Asghari S, SA Johari, JH Lee, YS Kim, YB Jeon, HJ Choi, MC Moon and IJ Yu. 2012. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. J. Nanobiotechnology 10:14.
- Baetke SC, T Lammers and F Kiessling. 2015. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. Br. J. Radiol. 88:20150207.
- Bang SH, TH Le, SK Lee, P Kim, JS Kim and Min JH. 2011. Toxicity Assessment of Titanium(IV) Oxide Nanoparticle Using *Daphnia magna* (water Flea). Environ. Health Toxicol. 26: e2011002.
- Benn TM and P Westerhoff. 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. Environ. Sci. Technol. 42:4133-4139.
- Bian SW, IA Mundunkotuwa, T Rupasinghe and VH Grassian. 2011. Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments: Influence of pH, Ionic Strength, Size, and Adsorption of Humic Acid. Langmuir 27:6059-6068.
- Carlson C, SM Hussain, AM Schrand, LK Braydich-Stolle, KL Hess, RL Jones and JJ Schlager. 2008. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. J. Phys. Chem. B. 112:13608-13619.
- Chae Y and YJ An. 2016. Toxicity and transfer of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanowires in an aquatic food chain consisting of algae, water fleas, and zebrafish. Aquat. Toxicol. 173:94-104.
- Cupi D, NB Hartmann and A Baun. 2016. Influence of pH and media composition on suspension stability of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles and immobilization of *Daphnia magna* under guideline testing conditions. Ecotoxicol. Environ. Saf. 127:144-152.
- Eckhardt S, P Brunetto, J Cganon, M Priebe, B Ciese and K Fromm. 2013. Nanobiosilver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. Chem. Rev. 113:4708-4754.
- El Badawy AM, KG Scheckel, MT Suidan and TM Tolaymat. 2012. The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. Sci. Total Environ. 429:325-331.
- El Badawy AM, TP Luxton, RG Silva, KG Scheckel, MT Suidan and TM Tolaymat. 2010. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver of NPs suspensions. Environ. Sci. Technol. 44:1260-1266.
- Handy RD, F von der Kammer, JR Lead, M Hasselov, R Owen and M Crane. 2008. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. Ecotoxicology 17:287-314.
- Klaine SJ, PJ Alvarez, GE Batley, TF Fernandes, RD Handy, DY Lyon, S Mahendera, MJ Mclaughlin and JR Lead. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environ. Toxicol. Chem. 27: 1825-1851.
- Kobayashi N, M Naya, S Endoh, J Maru, K Yamamoto and J Nakanishi. 2009. Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO<sub>2</sub> particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long term post-instillation results. Toxicology 264:110-118.
- Kwok KW, M Auffan, AR Badireddy, CM Nelson, MR Wiesner, A Chilkoti, J Liu, SM Marinakos and DE Hinton. 2012. Uptake of silver nanoparticles and toxicity to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*): effects of coating materials. Aquat. Toxicol. 120:59-66.
- Langley DP, G Giustim, M Lagrange, R Collins, C Jimenez, Y Brechet and D Bellet. 2014. Silver nanowire networks: Physical properties and potential integration in solar cells. Sol. Energy Mat. Sol. C. 125:318-324.
- Lee JH, YS Kim, KS Song, HR Ryu, JH Sung, JD Park, HM Park, NW Song, BS Shin, D Marshak, K Ahn, JE Lee and

- IJ Yu. 2013. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. Part. Fibre Toxicol. 10:36.
- Liu J and RH Hurt. 2010. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. Environ. Sci. Technol. 44:2169-2175.
- Meng F and S Jin. 2011. The solution growth of copper nanowires and nanotubes is driven by screw dislocations. Nano Lett. 12:234-239.
- Meredith AN, B Harper and SL Harper. 2016. The influence of size on the toxicity of an encapsulated pesticide: a comparison of micron- and nano sized capsules. Environ. Int. 86:68-74.
- Newton KM, HL Puppala, CL Kitchens, VL Colvin and SJ Klaine. 2013. Silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna* is a function of dissolved silver concentration. Environ. Toxicol. Chem. 32:2356-2364.
- OECD. OECD Test Guidelines for testing of chemicals. Guideline 201: Freshwater Algae and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. adopted: March 2006.
- OECD. OECD Test Guidelines for testing of chemicals. Guideline 202: *Daphnia* sp., Acute immobilisation Test. adopted: April 2004.
- OECD. OECD Test Guidelines for testing of chemicals. Guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test. adopted: July 1992.
- Park JW, JH Oh, WK Kim and SK Lee. 2014. Toxicity of Citrate-Coated Silver Nanoparticles Differs According to Method of Suspension Preparation. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 93:53-59.
- Park MV, AM Neigh, JP Vermeulen, LJ de la Fonteyne, HW Verharen, JJ Briede, H van Loveren and WH de Jong. 2011. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. Biomaterials 32:9810-9817.
- Powers CM, TA Slotkin, FJ Seidler, AR Badireddy and S Padilla. 2011. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. Neurotoxicol. Teratol. 33:708-714.
- Rahaman Mds, CD Vecitis and M Elimelech. 2012. Electrochemical carbon nanotube filter performance towards virus removal and inactivation in the presence of natural organic matter. Environ. Sci. Technol. 46:1556-1564.
- Ribeiro F, JA Gallego-Urrea, K Jurkschat and A Crossley, Hasselov M, Taylor C, Soares AM, Loureiro S. 2014. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. Sci. Total Environ. 466-467:232-241.
- Romer I, TA White, M Baalousha, K Chipman, MR Viant and JR Lead. 2011. Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. J. Chromatogr A. 1218:4226-4233.
- Schwab F, TD Burcheli, LP Lukhele, A Magrez, B Nowack, L Sigg and K Knauer. 2011. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? Environ. Sci. Technol. 45:6136-6144.
- Silva RM, J Xu, C Saiki, DS Anderson, LM Franzi, CD Vulpe, B Gilbert, LS Van Winkle and KE Pinkerton. 2014. Short versus long silver nanowires: a comparison of in vivo pulmonary effects post instillation. Part. Fibre Toxicol. 11:52.
- Silva T, LR Pokhrel, B Dubey, TM Tolaymat, KJ Maier and X Liu. 2014. Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. Sci. Total Environ. 468-469:968-976.
- Sohn EK, SA Johari, JK Kim, E Kim, JH Lee, YS Chung and IJ Yu. 2015. Aquatic toxicity comparison of silver nanoparticles and silver nanowires. Biomed Res. Int. 2015: 893049.
- Sund J, H Alenius, M Vippola, K Savolainen and A Puustinen. 2011. Proteomic characterization of engineered nanomaterial-protein interactions in relation to surface reactivity. ACS Nano 5:4300-4309.
- Tejamaya M, I Roemer, RC Merrifield and JR Lead. 2012. Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. Environ. Sci. Technol. 46:7011-7017.
- Vecitis CD, KR Zodrow, S Kang and M Elimelech. 2010. Electronic structure-dependent Bacterial cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes. ACS Nano 4:5471-5479.
- Wang X, Z Ji, CH Chang, H Zhang, M Wang, YP Liao, S Lin, H Meng, R Li, B Sun, LV Winkle, KE Pinkerton, JI Zink, T Xia and AE Nel. 2014. Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. Small 10:385-398.
- Wiench K, W Wohlleben, V Hisgen, K Radke, E Salinas, S Zok and R Landsiedel. 2009. Acute and Chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO<sub>2</sub> and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. Chemosphere 76:1356-1365.
- Zhang T, L Wang, Q Chen and C Chen. 2014. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. Yonsei Med. J. 55:283-291.

Received: 16 August 2016

Revised: 7 September 2016

Revision accepted: 7 September 2016