

박테리아를 이용한 나노입자의 독성평가 및 탐지

¹황 이 택 · ²이 정 일 · ³상 병 인 · † ¹구 만 복

¹고려대학교 생명과학대학, ²한국과학기술연구원 나노소자연구센터, ³한국과학기술연구원 환경기술연구단
(접수 : 2007. 11. 13., 게재승인 : 2007. 12. 20.)

Toxicity Monitoring and Assessment of Nanoparticles Using Bacteria

Ee Taek Hwang¹, Jung Il Lee², Byoung-In Sang³, and Man Bock Gu^{1†}

¹College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

²Nano-Devices Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

³Center for Environmental Technology Research, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

(Received : 2007. 11. 13., Accepted : 2007. 12. 20.)

Nanomaterials have been applied to various fields due to their advantageous characteristics such as high surface area, rapid diffusion, high specific surface areas, reactivity in liquid or gas phase, and a size close to biomacromolecules. Up to date, increased manufacturing and frequently use of the materials, however, revoke people's concerns on their hazard impact including toxicity the materials. Many research groups have carried out different protocols to evaluate toxic effects of nanomaterials on different organisms, and consequently, nanomaterials are known to cytotoxicity. In this paper, we reviewed some of the most reports on toxic effects of several nanoparticles specifically on bacteria. There are numbers of reports focused on antibacterial effect of nanoparticles based on bacterial cell viability. Therefore, the application of each nanomaterial should be concerned with its toxicity and its toxic effect should be evaluated in terms of concentrations and sizes of the nanomaterials used, prior to use of a nanomaterial.

Key Words : Nanoparticles, nanoparticles toxicity, antibacterial effect, toxic mechanism

서 론

산업활동의 증가로 인한 에너지 확보를 화석연료를 통하여 조달하면서부터 나노 입자 (nano-sized particles, NSP; <100 nm)의 환경 중 노출은 급격히 증가되었다. 선진국과 다국적 기업을 중심으로 다양한 분야에 나노물질의 활용하는 기술을 접목시키려 시도하는 등 나노공학기술은 전 세계적으로 미래산업으로 각광받고 있다. 이러한 나노물질에 대한 관심의 증대는 다양한 형태의 나노입자 개발을 통하여 부가가치를 증대시키려 하기 때문에 인간과 생물은 더 다양한 형태의 나노입자에 노출이 되며 그 독성에 대하여 주목을 할 수밖에 없는 실정이다. 흥미롭게도 탄소 원자들이 구형을 이루고 있는 풀러린 (C₆₀)은 개발자들에게 1995년 노벨화학상을 안겨 주었지만, 현재 0.5 ng/L에서도 뇌에 손상을 일으키는 것으로 보고되어 나노 입자에 대한

또 다른 경각심을 불러일으켰다(1). 그러므로 나노입자의 독성에 대한 세밀한 논의가 이루어져야 하는 시점에 와 있음을 알 수 있다.

이처럼 나노과학이 발전하면서 여러 가지 종류의 나노물질들이 생산, 이용되며 점차 나노물질의 이용분야 또한 단순한 제품의 생산에서 벗어나 전자공학, 바이오 의약, 화학, 생물학, 에너지 생산 공정, 환경 등 매우 다양해지고 있다(2-13). 이러한 나노물질들은 빠른 확산속도, 단위 부피당 넓은 반응 표면적, 액체 혹은 기체 상에서의 탁월한 반응성, 생물 분자와의 비슷한 크기 등의 매우 흥미로운 특징들을 가지고 있다. 그러나 이러한 나노물질의 탁월한 특성으로 인해 다양한 활용분야에서 무분별하게 사용되고 있으며, 사용량 및 환경 누출에 대한 통제가 이루어지고 있지 않는 상황이다. 이러한 상황은 나노물질의 환경노출을 증가시키고 있으며 노출된 나노물질들이 물 혹은 공기를 통하여 인간의 몸 속으로 이동하는 과정을 통하여 환경이나 사람의 건강에 미칠 독성영향이 매우 클 것으로 생각된다(14, 15). 이러한 이유로 많은 종류의 나노 물질들에 대하여 다양한 생물체를 이용한 독성 및 유해성 평가 연구가 활발히 진행되고 있다.

† Corresponding Author : College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Tel : +82-2-3290-3417, Fax : +82-2-928-3555

E-mail : mbgu@korea.ac.kr

환경에 노출된 나노물질의 독성연구는 대부분 세포의 생장에 미치는 영향을 분석하는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 및 LDH (Lactate Dehydrogenase) assay를 이용한 것이다. 이것은 다양한 형태의 나노입자에 노출된 세포들의 성장여부를 수치로 측정하고 그 독성을 평가하는 것이다. 다시 말해서 금, 은, 셀레늄, C₆₀, PAMF (MF sample based on MNPs surface coated with polyaspartic acid) 그리고 탄소나노튜브 등의 금속 혹은 비금속을 이용하여 합성된 나노물질의 농도, 입자크기, 노출시간 등에 따른 쥐나 사람 세포 등의 동물세포의 성장저해 여부를 정량화하여 독성을 평가하는 것이다(14-23). 나노물질의 독성을 실험동물의 몸무게 감소를 통하여 평가하거나(24), 나노입자에 의한 산화적 손상으로 인해 발생하는 세포독성 평가를 위해 ROS (Reactive oxygen species) 를 측정하는 연구도 진행되었다(25, 26). 환경에 노출된 나노물질이 바다나 강으로 유입되고 이들 환경에서 사는 수생생물에 의한 직접적인 흡수가 가능하기 때문에 물벼룩, 검 물벼룩, 연춘모치, 송사리 등과 같은 수생생물을 이용하여 fullerene (C₆₀), carbon naotube과 같은 나노입자에 의한 독성영향을 평가하였고 독성원인 규명을 위해western blotting 을 이용하여 특정 단백질의 발현 여부를 분석하기도 하였다(27, 28).

최근에는 새롭게 많은 종류의 금속 혹은 금속산화물들이 나노 크기 수준으로 제조되고 이용되고 있으며, 이들 또한 매우 좋은 항균력을 지니고 있는 것으로 밝혀지고 있다(29). 산업적 활용이 가능한 나노물질에 의한 독성 영향 중 하나가 항균성능이며 항균성능이 검증된 나노물질은 지속적으로 활용분야가 확대될 것으로 예상된다(30, 31). 이러한 항균 나노물질들 중 가장 잘 알려진 것이 은으로 이미 은 이온, 은 화합물 등에 의한 항균성능은 많은 연구를 통해서 알려져 있다(32-34). 따라서 금속 혹은 금속 산화물로 구성된 나노물질의 독성에 대한 이해는 나노물질의 활용 확대를 위해 반드시 필요한 일이므로 본 논문에서는 박테리아를 이용한 금속과 금속산화물의 나노 크기 수준의 물질에 대한 독성평가에 대해서 알아보하고자 한다.

본 론

최근에 박테리아에 대한 나노물질의 독성평가는 많은 연구가 진행되고 있으나 동물세포를 대상으로 한 독성연구 결과와 비교하면 초기 연구수준에 머물고 있는 실정이다. 박테리아를 이용한 나노물질의 독성평가 방법의 대부분은 박테리아를 나노물질이 함유되어 있는 배양조건에서 배양하여 박테리아의 성장이 나노물질로 인해 저해 받는 정도를 측정하는 방식으로 진행되고 있다(Fig. 1). 한편 이들 나노물질은 불안정하고, 반응 표면적이 높아서 그들의 특성에 대한 연구가 반드시 선행되어야 한다. 이들 물질들은 Adsorption Isotherm, Infrared Spectra, Zeta potential, DLVO, Salt induced coagulation/TEM, Ionic concentration (hydrodynamic radius), TEM 등의 분석을 이용하여 그들이 물에서 뿐만 아니라 박테리아의 배양액으로 사용하는 LB 배지에서도 그 구성 성분인 염 성분과 다른 화합물 의해

전혀 영향을 받지 않는다는 것을 밝혀내야 한다. 또한 세포용액상에서 입자 서로간의 집적이 일어나지 않아서 나노물질 그 원래의 상태를 유지하는지 여부에 대해서도 증명해야 할 필요가 있다. 즉 표면이 코팅이 되거나 어떻게 변화하는 지에 대한 연구가 선행되어야, 이들 나노 물질들에 대한 독성을 제대로 평가할 수 있는 것이다. 다음은 박테리아를 이용하여 여러 가지 나노입자에 대해서 박테리아 독성을 평가한 논문들에 국한된 미니리뷰의 형태로 정리한 내용이다.

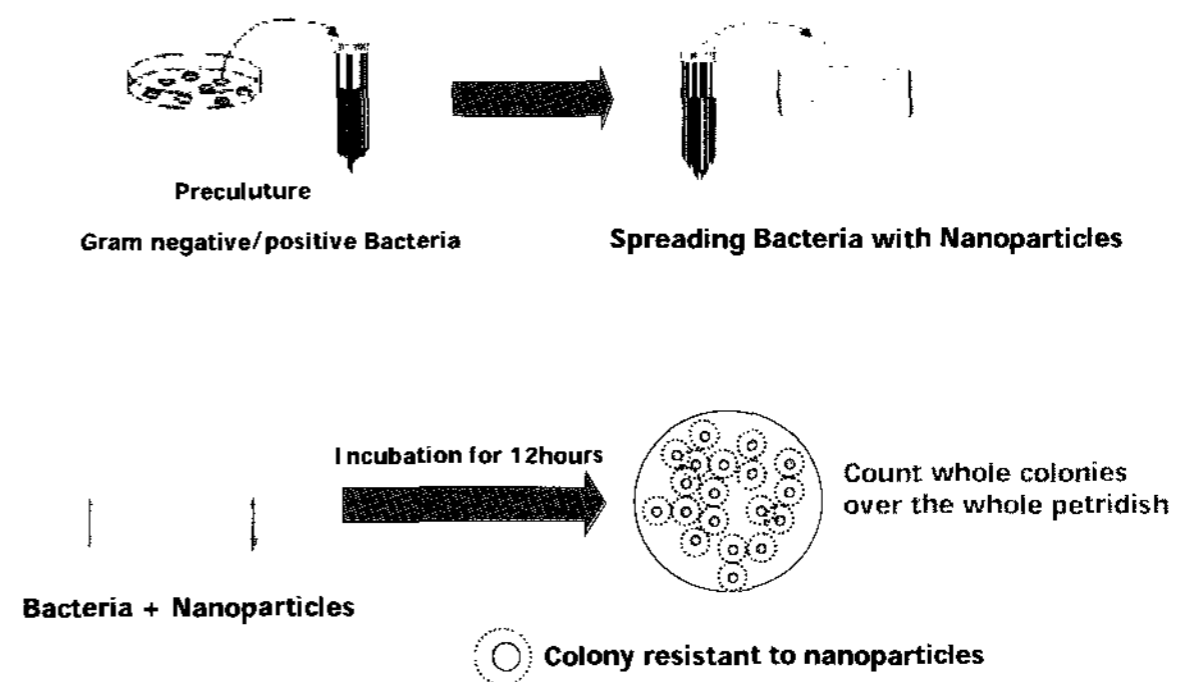


Figure 1. Schematic of general bacterial toxicity assay of nanoparticles.

Silver nanoparticles

Silver nanoparticles은 대표적인 항균 물질로 이미 산업 전반에 걸쳐서 이용되고 있다. 은 나노 세탁기, 은 나노 화장품, 심지어 은 나노 물까지 제품으로 생산되고 있으며, 박테리아에 대한 높은 항균성을 필요로 하는 곳이면 어디든지 사용된다. 또한 최근에는 시각적 이미징이 필요한 바이오 진단 분야에서도 많이 이용되고 있는 나노 물질중의 하나이다. Silver nanoparticles에 대한 박테리아 독성 연구는 다른 나노물질보다 좀 더 활발히 진행되었고, 많은 보고들이 나오고 있다. Cho와 그의 동료들은 10 나노미터 크기의 Silver nanoparticles을 이용하여 박테리아에 대한 독성을 연구를 하였다(35). 그들은 그람 음성균으로 *E. coli* (*Escherichia coli*)를 그람 양성균으로는 *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*)를 사용하였다. LB agar배지에 각각 안정제로 sodium dodecylsulfate (SDS)와 poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP)를 넣은 고체 배지에 Silver nanoparticles과 박테리아를 혼합 배양시켰다. 농도 변화에 따른 MIC (Minimum inhibitory concentration) assay를 통해서 독성 평가가 이루어졌다. SDS를 안정제로 이용한 배지에서는 전혀 변화가 없었다. 이것은 silver nanoparticles로부터 나오는 양이온인 은이온이 SDS의 음이온과 작용한 결과라고 생각할 수 있다. 반면에 PVP를 포함한 배지에서는 *E. coli*와 *S. aureus*에 대해서는 MIC값이 각각 5 mg/L, 10 mg/L였다. *S. aureus*에 대해서는 10 mg/L와 20 mg/L의 silver nanoparticles 농도에서 각각 3.3, 4시간 이내로 모든 박테리아의 생장이 저해되었다. *E. coli*의 경우 10 mg/L와 20 mg/L의 농도에서 모든 생장을 저해하는데 각각 2.5, 3.5시간이 걸렸다. 또 다른 silver nanoparticles의 독성연구가 Pal과 그의 동료들에 의해 진행되었다(36). 그들은 silver nanoparticles이 포함된 LB 배지상에서의 CFU의 측정함으로써 농도에 따라

독성여부를 판단하였다. 그람 음성균인 *E. coli*를 사용하였고, 12 나노미터의 silver nanoparticles의 독성을 평가하기 위해서, 대조군으로 AgNO₃을 사용함으로써, 같은 양의 은이온과 비교할 수 있었다. 예상했던 바와 같이 silver nanoparticles이 은이온보다 훨씬 강한 독성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 또 이들은 50 나노미터 크기의 silver nanoparticles를 10~100 mg/L의 농도범위 내에서 농도를 변화시켜 가면서 박테리아의 생장곡선을 그려보았다. 농도가 증가할수록, 박테리아의 생장은 늦어지는 양상이 나타났다. Sondi와 그의 그룹은 silver nanoparticles의 농도에 따른 고체배지 내에서의 CFU의 감소를 통하여 독성을 평가하였다(37). 그람음성균인 *E. coli*에 대해서 그들은 silver nanoparticles 10~60 mg/L의 농도범위에서 나노입자와 배양한 박테리아의 CFU의 감소를 측정하였다. 10 mg/L에서는 30%까지 그 수가 감소하였고, 20 mg/L 이상의 농도에서는 거의 생장을 하지 못했다. Morones와 그의 동료들은 high angle annular dark field-scanning transmission electron microscopy (HAADF-STEM)을 이용하여 silver nanoparticles의 박테리아에 대한 독성을 평가하였다(38). 그들은 다양한 크기의 silver nanoparticles을 이용하여, 크기에 따른 영향을 알아보았고, 또한 10 나노미터 이하 크기의 나노입자에 대해서도 박테리아에 대한 그 영향을 평가하였다. 이 수준의 크기는 박테리아의 멤브레인 표면에 붙어서, 기능을 못하도록 방해하는 역할을 하며, 매우 작은 크기의 나노입자는 심지어 셀 내부로 들어가서 DNA의 sulfur-, phosphorus- 그룹이 포함된 부분에 손상을 일으킴을 보였다. 그리고 이 silver nanoparticles에 의해서 은이온이 발생하는 것 또한 증명하였다. 또 다른 연구에서는 Lok과 그의 동료들이 silver nanoparticles의 독성에 대해서 proteomics 연구를 통해 접근하였다(39). 그들은 silver nanoparticles과 박테리아의 상호작용을 단백질의 발현을 통해서 알아 본 것이다. 단백질 막에 분포하는 OmpA, OmpC, OmpF, OppA, MetQ의 과량 발현과, heat shock 단백질인 IbpA, IbpB and 30S ribosomal subunit S6의 과량 발현을 2D gel을 통해서 관찰하였다. 특히 막에 분포하는 단백질은 외부로부터 셀 내부로의 물질의 침입에 대해 보호하는 역할을 하며, heat shock 단백질의 경우 단백질 비활성에 대한 샤페론의 기능을 하는 것들이다. 그들은 또한 10 나노미터 크기의 silver nanoparticles이 멤브레인 경계면 밖에 분포하는 lipopolysaccharide나 porins을 파괴한다는 사실도 증명하였다. 이러한 발견들은 silver nanoparticles이 단순히 박테리아의 생장을 저해하는 것을 보여주는 다른 연구를 넘어서는 결과물들이었다.

TiO₂ nanoparticles

PCP (Pentachlorophenol)는 chlorinated hydrocarbon으로써 농업과 특히 목제의 보존제로서 많이 이용되고, 다양한 분야에서 살균제로 이용된다. 그러나 그것은 토양이나 지하수로 쉽게 침투하여 사람에게 큰 해를 입힌다. TiO₂는 광촉매제로 제조되고, 위에서 언급한 PCP가 포함된 유기물이 함유된 오염물의 처리에 이용된다(40, 41). TiO₂는 UV에서 anatase form의 광촉매이다, 강한 산화력으로 그것은 물을 산화시켜 하이드록시 라디칼을 형성시키는 역할을 한다. 또한 산소나 유기물을 직접 산화시키기도 한다.

Warheit와 그의 동료들은 이러한 TiO₂를 미세하게 제조한 형태의 Uf-C TiO₂ particles로 50,000 mg/L의 농도에서 Ames Test를 통해 박테리아 돌연변이 유발성에 대해서 평가하였다(42). 그러나 전혀 영향이 없음을 알 수 있었다. TiO₂의 농도가 100~1,000 mg/L, 그 크기가 10~100 나노미터에서 항균성이 있다고 일반적으로 알려져 있다. Adams 그룹은 입자의 농도와 크기 영향을 살펴보기 위해서 그람 음성균인 *E. coli* (*Escherichia coli*)와 그람 양성균으로서 *B. subtilis* (*Bacillus subtilis*)을 사용하여, TiO₂의 독성을 측정하였다(43). 66 나노미터의 TiO₂을 이용하여, MD 배지가 포함된 페트리 플레이트에 각각 TiO₂을 0~5,000 mg/L의 농도 변화를 주고, 박테리아와 혼합 배양시켰다. 독성의 평가는 빛이 비치는 곳에서 먼저 입자를 침전시킨 상태에서 이루어졌다. TiO₂가 빛에 노출된 상태를 유지하면서 배양이 시작되었고, 12시간 이상 박테리아와 배양시켰다. 다음날 자란 콜로니의 숫자를 세면서, 대조군과 비교하여, TiO₂에 의한 박테리아의 성장 저해 정도를 측정하였다. TiO₂는 *E. coli*의 경우 5,000 mg/L의 농도에서 72% 성장 감소를 보였고, *B. subtilis*는 더욱 민감하여 2,000 mg/L에서 99%의 감소를 보였다. 이때 빛은 하나의 조절되어야 할 환경 조건이다. 왜냐하면 빛의 노출 여부에 따라서 그 독성 정도가 달라지기 때문이다. TiO₂에 대한 박테리아의 독성은 빛에 노출되었을 때, 그람 양성균에서 그 민감도가 커진다. *E. coli*가 2.5배의 저해를 더 받는다면 *B. subtilis*는 3.7배의 성장 저해를 더 받게 되는 것이다. 그러나 빛을 통제하였을 경우 그 성장 저해는 2.5배 정도 크게 받는다. 빛은 TiO₂의 독성에 매우 큰 영향을 미치는 인자이다. 심지어 빛이 있는 조건에서는 0.001 mg/L의 농도에서도 독성효과가 나타난다는 보고도 있다(44). 비록 사용한 입자의 크기는 다르겠지만 빛은 TiO₂의 독성능력을 조절하는 매우 영향력 있는 조건임에는 틀림없다. 빛은 ROS의 생성과 깊이 관련이 있다. 많은 연구에서 밝힌 바가 있듯이 300과 400 나노미터의 빛은 더 많은 ROS의 생성을 유발한다(45). 따라서 TiO₂의 독성능력은 빛에 노출되는 환경조건, 그 크기에 따라 결정되는 것이다.

ZnO nanoparticles

ZnO는 무기재료 분야에 있어서 유리, 유약, 법랑 및 기타 특수 무기재료의 제조원료로 쓰인다. ZnO는 또한 유리의 광택을 향상시키고, 응력에 의한 변형에 대해서 안전성을 높이는 역할을 한다. ZnO는 특히 바륨 함량이 많은 광학유리에 쓰이는데, 이것은 유리가 냉각할 때 결정화되는 것을 막는 역할을 하기 때문이다. ZnO는 반도체성, 압전성, 형광성, 광도전성 등 여러 가지 기능을 겸비하고 있어서 신규 세라믹 소재 (new ceramics)에서의 활용도 또한 매우 넓다. 그러나 이러한 ZnO는 그람 양성균, 음성균 뿐만 아니라 인간의 면역세포에도 독성이 있는 것으로 알려져 있다. 박테리아의 독성 평가를 위해서 Reddy 그룹은 0~ 10 mM 농도의 범위에서 13 나노미터 크기의 ZnO nanoparticles을 사용하였다(46). 그람 양성균으로는 *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*)를 이용하였고, 음성균으로는 *E. coli* (*Escherichia coli*)를 사용하였다. 나노입자가 포함된 LB 배지에 박테리아를 접종하

여, 배양시키고, 이것을 LB배지에 스프레딩시켜서 12시간 이상 배양한 다음, 다음날 생성되는 콜로니 숫자로서 그 독성 여부를 평가한 것이다. 5 mM의 ZnO nanoparticles 농도에서 *E. coli*의 성장을 방해하였다. 반면에 *S. aureus*에서는 1 mM의 농도가 성장을 방해는 것으로 나타났다. 그리고 이러한 박테리아 성장 저해는 ZnO nanoparticles에 노출된 후 6, 12, 24, 48시간의 시간 간격을 두고, CFU의 측정을 통해서 얻어낸 결과이다. 이 결과로부터 나노입자가 세포사멸을 유도하여, 박테리아의 성장을 저해한다, 하지만 그 정도는 박테리아의 종류에 따라서 다르게 나타났다. 가령 *E. coli*의 경우 90% 이상의 CFU 감소를 보이는 시간은 12시간 이후였지만, *S. aureus*의 경우에는 24시간 이후에 90% 이상의 감소를 보였다. 매우 낮은 아연농도에서는 오히려 아연이온에 의해 박테리아의 성장을 촉진시킨다는 보고도 있다(47). 그러나 그 농도는 마이크로 몰 정도의 수준이다. 실제로 *S. aureus*는 밀리몰의 농도 수준에서 아연 이온은 이온 이플렉스 시스템에 의한 메커니즘이 나타나고 이것이 예기치 못한 강한 잠재적인 독성이 발생시킨다는 것이다. 박테리아의 종류에 따른 독성 차이는 그것의 대사 시스템의 차이에 근거한다. 이러한 독성의 차이를 확인하기 위해서 flow cytometry를 이용하여 분석을 하였다. *E. coli*에 5 mM ZnO nanoparticles에 대해서 30%의 상당한 감소를 보였지만 *S. aureus*는 2 mM에서 59%의 손실을 보여줬다. 이러한 결과는 ZnO nanoparticles이 박테리아 세포를 사멸시키는데 있어서 멤브레인의 모양에 따라 그 정도가 다르다는 것을 암시해주는 것이다. Adams 그룹은 ZnO nanoparticles의 농도와 크기가 독성의 강도에 어떻게 영향을 미치는 평가하기 위해서 그람 음성균인 *E. coli* (*Escherichia coli*)을 그람 양성균으로서 *B. subtilis* (*Bacillus subtilis*)을 사용하였다(43). 67 나노미터의 ZnO nanoparticles을 이용하여, MD 배지가 포함된 페트리 플레이트에 각각 10~5,000 mg/L의 농도로 12시간 이상 배양하고, 빛이 비치는 곳에서 입자를 침전시킨 상태에서 이루어졌다. 나노입자가 빛에 노출된 상태를 유지하면서 배양이 시작되었고, 박테리아를 혼합 배양하여, 대략 12시간 이상 배양시켰다. 다음 날 생성된 콜로니의 숫자를 통해서 ZnO nanoparticles에 의한 박테리아의 성장 저해 정도를 측정하였다. ZnO nanoparticles은 *E. coli*의 경우 10 mg/L의 농도에서 48% 성장을 저해시켰다. 한편 *B. subtilis*는 매우 민감하여, 10 mg/L에서 90%의 박테리아 성장 저해가 일어났다. 빛은 *B. subtilis*와 *E. coli*에 ZnO nanoparticles의 독성을 더욱 강화시켰으며, 빛이 존재할 때는 ZnO nanoparticles의 농도를 높여줌에 따라 *E. coli*의 성장 역시 점차 저해를 받았지만, 빛이 없는 조건에서는 4~10%의 수준의 저해가 나타났으며, 농도 의존적이지 못했다. *E. coli*에 대한 ZnO nanoparticles의 독성 메커니즘을 밝히기 위해 Brayner과 그의 동료들은 다른 방법을 모색하였다(47). 그것 역시 ZnO nanoparticles에 대해서 살아있는 CFU의 숫자를 측정하는 것이었지만, *E. coli*를 배양시킬 때 액체 LB배지에 DEG라는 배지를 포함시킨 것이다. TEM 마이크로 그래프 분석이 ZnO nanoparticles의 독성 모드를 연구하기 위해서 추가적으로 이용되었다. *E. coli*를 1.3 mM 이상의 ZnO nanoparticles에 노출시키면 DEG 배지에 있는 작고 큰 분자들이 손상을

받고, 이것이 세포 내부에 존재하는 lipopolysaccharides와 같은 구성물들의 방출을 일으키는 역할을 하는 것이다. 따라서 세포 벽의 분열을 일으키며 이때 ZnO nanoparticles이 세포 내부로 들어가게 되는 것이다. 이러한 과정을 TEM 마이크로 그래프를 이용하여 관찰을 한 것이다. 단순히 ZnO nanoparticles에 의한 박테리아 성장의 저해만 본 것이 아니라 어떤 경로로 손상을 일으키는 지에 대해 밝힌 메커니즘 연구라는 측면에서 매우 진보한 연구였다.

SiO₂ nanoparticles

SiO₂는 우수한 전기 절연체로서, 높은 화학적 안정성을 지님에 따라 실리콘을 보호하거나, 전압을 저장하고, 전류를 차단하는 등의 역할을 한다. 심지어 작은 전류의 흐름을 허용하는 역할까지 하는 장치이다. 그러나 SiO₂ 역시 나노 크기의 수준에 이르면 항균성을 지니게 된다. SiO₂의 농도가 100~1,000 mg/L, 그 크기가 10~100 나노미터에서 독성이 있다고 일반적으로 알려져 있다. Adams 그룹은 SiO₂ nanoparticles의 농도와 크기가 독성에 어떤 영향을 미치는지 밝혀내기 위해서 그람 음성균인 *E. coli* (*Escherichia coli*)을 그람 양성균으로서 *B. subtilis* (*Bacillus subtilis*)을 사용하여 평가하였다(43). 14 나노미터의 SiO₂ nanoparticles을 이용하여, MD 배지가 포함된 페트리 플레이트에 10~5,000 mg/L의 SiO₂ nanoparticles을 12시간 이상 빛이 비치는 곳에서 노출시켜서 침전되기 위한 조건을 만들어줬다. SiO₂ nanoparticles은 박테리아와 빛에 노출된 상태를 유지하면서 배양이 시작되었고, 배양한 SiO₂ nanoparticles이 포함된 박테리아를 LB배지에 스프레딩하여 12시간 이상 배양시켰다. 다음날 생성된 콜로니의 숫자로, SiO₂ nanoparticles에 의한 박테리아의 성장 저해 정도를 측정하였다. SiO₂ nanoparticles은 *E. coli*의 경우 5,000 mg/L의 농도에서 48% 성장 저해를 유도했고, *B. subtilis*에는 매우 강한 독성을 일으키면서, 5,000 mg/L에서 99%의 박테리아 성장 저해를 유도하였다. 이것은 SiO₂ nanoparticles는 *E. coli*보다 *B. subtilis*에 훨씬 강한 독성을 일으키는 의미를 의미한다. 두 균주 모두 빛의 유무에 따라서 성장의 저해는 받았지만 빛이 있는 조건에서 좀 더 성장의 방해를 받았다. 그러나 빛의 효과는 그다지 크지 않아서 *E. coli*의 경우 빛이 없는 조건과 비교하여 1.9배, *B. subtilis*는 1.6배 더 크게 성장의 저해를 받는다. 반면에 어두운 조건에서는 ROS의 생성에 초점을 맞췄다. SiO₂ nanoparticles에 의해서 생성된 ROS는 산화적 손상을 일으키며, 이것이 바로 박테리아에 대한 독성 경로로 작용하지 않을까 예측하고 있는 상황이다. 또 Williams와 그의 동료들은 2.2 mg/mL의 SiO₂ nanoparticles이 박테리아의 성장곡선에 어떤 영향을 미치는지 연구하였다(48). 박테리아 성장 곡선은 SiO₂ nanoparticles이 성장과 무관한 것으로 밝혀졌다. SiO₂ nanoparticles과 박테리아의 상호작용에 대해 초점을 맞추고, 박테리아의 움직임을 살펴보았다. 나노입자와 상호작용한 박테리아는 자석을 향하여 움직이는 반면에 나노입자와 작용하지 못하는 박테리아는 전혀 움직임이 없었다. 이를 통해 모든 박테리아가 나노입자와 작용하는 것은 아니라는 결론을 내릴 수 있었다.

CeO₂ nanoparticles

CeO₂는 강한 산화, 환원 반응 때문에 좋은 산화 촉매제로서 이용되고 있다. 또한 산소저장 능력이라는 잠재성 때문에 새롭게 평가받고 있는 물질이다. 당연히 그것이 나노 크기로 작아지면 더욱 더 반응이 빠르고, 커서 산소 저장과 관련된 많은 부분에 이용될 수 있을 거라고 생각된다(49). Thill과 그의 동료들은 CeO₂ nanoparticles의 독성평가를 위해서 몇 가지 농도의 CeO₂가 포함된 상태에서 LB 배지에 배양시켜 자란 CFU를 측정하면서 그 독성을 평가하였다(50). CeO₂ nanoparticles의 농도가 0.46~500 mg/L의 범위에서 진행되었고, 37°C에서 3시간 동안 배양시킨 후 살아있는 CFU의 숫자를 통해서 이루어졌다. 시간의 영향을 평가하기 위해서 1시간부터 5시간까지 CeO₂ nanoparticles에 노출된 *E. coli*의 CFU를 세었고, pH의 영향을 알기 위하여 6.5 (0 mg/L CeO₂)에서 5 (500 mg/L CeO₂)까지 변화를 주었다. pH 감소는 약간의 생장의 저해를 유발하였다. 하지만 박테리아의 생장은 CeO₂ nanoparticles의 농도에 강하게 영향을 받았다. 박테리아는 실제로 0.9 mg/L의 CeO₂ nanoparticles보다 낮은 조건에서는 잘 자랐다. 그러다가 농도가 5 mg/L가 되면 50%의 CFU의 감소를 보이고, 230 mg/L와 같은 고농도에서는 전혀 자라지 못했다. TEM 사진을 이용하여 박테리아의 CeO₂ nanoparticles에 의한 모양 변화를 관찰하였다. 모양에는 전혀 변화가 없었지만, 박테리아 세포 외부 경계 면에는 매우 높은 전자밀도를 보인다는 사실을 발견했다. 이 결과를 통해서 CeO₂ nanoparticles은 세포 표면에 흡착된다고 말할 수 있다. XANES spectra를 이용해서 흡착 후 CeO₂ nanoparticles 모양 변화가 일어남을 확인할 수 있었고, 이것은 CeO₂ nanoparticles이 박테리아에 의해서 환원됨을 말해주는 것이다. 그런데 한 가지 특이한 점은 이러한 CeO₂ nanoparticles의 독성은 배지가 존재하는 조건에서 그 독성 정도가 감소하는 패턴이 나타났다는 것이다. 이러한 결과들을 통해서 CeO₂ nanoparticles은 박테리아 세포에 흡착하게 되고, 이는 강한 전자기적 작용을 유발하여, 박테리아 표면에 강한 방해작용을 일으키는 것으로 보인다. 한편 CeO₂ nanoparticles의 환원은 박테리아의 표면 가까이에서 cerium의 원자와의 관계에 의해서 일어난 것이며, 이러한 환원이 박테리아에 독성을 일으키는 원인으로 작용하게 되는 것이다. 그리고 CeO₂ nanoparticles과 배지상에 존재하는 다양한 염성분, 미네랄 등에 의해서 박테리아에 산화적 손상을 일으킬 것이라고 예측된다.

HAP (hydroxyapatite) nanoparticles

뼈와 이의 에나말의 성분으로 이용되는 Synthetic HAP nanoparticle은 실제 뼈와 그 결정이 비슷하고, 좋은 바이오활성과 생체적 합성 능력 때문에 널리 이용되고 있다. 그러나 그것은 약한 항균성과 낮은 분해성을 가지고 있다. 물리적 화학적 생물학적 특징은 그것의 결정 정도에 따라 달라지고 이것이 임플란트나 치아보호품의 사용에 영향을 미친다. 그리고 이러한 HAP의 생물학적 특성은 그것의 결정구조와 그것과 결합하고 있는 Ce³⁺ 이온의 영향을 받게 된다. 따라서 Yingguang 그룹은 HAP nanoparticles의 독성을 평가하기 위해서 HAP nanoparticles의 제조와 더불어

CeHAP nanoparticles을 준비하였고(51), 박테리아의 CFU 측정을 이용하였다. 37°C에서 18시간을 배지 내에서 배양시켰다. 대조군으로 성장 저해제를 사용했으며, 그 저해구간은 중심으로부터 7 밀리미터 정도의 영역까지였다. 즉 저해구간이 7 밀리미터 이상이라는 것은 독성이 있다는 것을 의미한 것이다. HAP nanoparticles의 크기에 따라서 독성을 평가하였는데, 길이가 80~100 나노미터, 폭이 20~40 나노미터 수준의 CeHAP nanoparticles와 30 나노미터의 길이와 20 나노미터의 폭을 가진 HAP nanoparticles을 사용하였다. 특정농도까지는 그 저해구간이 7 밀리미터로 독성이 전혀 나타나지 않았지만, 그 이상의 농도에서 저해구간이 7 mm보다 더 커졌다. 그리고 이들 나노입자를 이용하여 *Escherichia coli* 뿐만 아니라 *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus*에 대해서도 독성을 평가하였다. 결과는 저해되는 구간의 길이가 조금 차이가 있을 뿐 같은 농도에서부터 독성이 나타나기 시작했다. HAP nanoparticles보다 CeHAP nanoparticles의 독성이 더 크다는 결과 또한 세균주 모두에서 나타났다. 이것은 HAP nanoparticles의 용해도와 관련이 있는 것이다. 즉 Ce이 치환되면서 CeHAP nanoparticles은 더욱 좋은 용해도를 지니게 되고, 이것이 박테리아가 배양된 배지 상에서 더 많은 농도의 입자를 존재하게 하는 이유가 되는 것이다.

요 약

지금까지 우리는 몇 가지 나노입자에 대한 박테리아를 이용한 독성평가 및 탐지 연구 사례를 보았다. 이들은 주로 세포의 성장과 관련하여, 그 평가가 이루어졌고, silver nanoparticles과 같이 그 메커니즘을 밝히기 위해 좀 더 진행이 된 것 또한 있었다. 그러나 아직 그 연구 수준은 매우 미비한 상태이다. 위에서 살펴 본 대부분의 나노입자의 경우 산화적 손상과 밀접한 관련이 있어 보인다. 이것은 나노입자로부터 발생할 이온들에 의해 혹은 나노입자가 박테리아와 작용하여 세포막표면에 직접 달라붙는 현상들에 의해, 일어나는 것이 아닌가 하는 생각을 하게 한다. 그리고 이러한 결과들을 통하여, 나노입자의 독성 경로를 어느 정도 예측할 수 있을 것이다 확실히 밝혀내지 못한 이러한 독성 경로에 대한 연구가 더 활발히 진행되어야 할 것이다.

나노물질의 많은 장점으로 인하여, 이미 많은 항균성 나노물질이 생산되어 이용되었지만 앞으로 새롭게 합성될 숫자는 우리가 예상할 수 없을 만큼 늘어날 것이라고 생각한다. 그리고 우리는 이들의 무분별한 사용으로 인한 부작용에 다시 한번 놀라게 될 것이고, 그들의 독성에 대해서 걱정할 것이다. 우리는 이들 나노물질에 대해서 단순한 세포 성장 연구를 벗어나, 그 독성 메커니즘을 밝히는 연구 또한 동시에 진행해야 할 것이다. 그것은 동물이나 사람세포의 독성경로 파악에도 유용한 정보를 제공할 수 있고, 나노물질의 이용으로 인한 폐해를 막을 수 있는 중요한 방법이 될 수 있는 것이다.

감 사

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia 21 project)”으로 지원받은 과제입니다.

REFERENCES

- Oberdörster, E. (2004), Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass, *Environmental Health Perspectives* **112**.
- Huang, S. H. (2006), Gold nanoparticle based immunochromatographic test for identification of Staphylococcus aureus from clinical specimens, *Clinica Chimica Acta* **373**, 139-143.
- Salman, H. H., C. Gamazo, M. A. Campanero, C. Campanero, and J. M. Irache (2005), Salmonella like bioadhesive nanoparticles, *Journal of Controlled Release* **106**, 1-13.
- Li, X., T. Liu, and Y. Chen (2004), The effects of the nanotopography of biomaterial surfaces on pseudomonas fluorescens cell adhesion, *Biochemical Engineering Journal* **22**, 11-17.
- Singh, P., D. Prasuhn, R. M. Yeh, G. Destito, C. S. Rae, K. Osborn, M. G. Finn, and M. Manchester (2007), Bio distribution, toxicity and pathology of cowpea mosaic virus nanoparticles in vivo, *Journal of Controlled Release* **120**, 41-50.
- Lin, W., Y. W. Huang, X. D. Zhou, and Y. Ma (2006), In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells, *Toxicology and Applied Pharmacology* **217**, 252-259.
- Gelperina, S. E., A. S. Khalansky, I. N. Skidan, Z. S. Smirnova, A. I. Bobruskin, S. E. Severin, B. Turowski, F. E. Zanella, and D. J. Kreuter (2002), Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80 coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma, *Toxicology Letters* **126**, 131-141.
- Jaakohuhta, S., H. Härmä, M. Tuomola, and T. Lövgren (2007), Sensitive Listeria spp. immunoassay based on europium(III) nanoparticulate labels using time resolved fluorescence, *International Journal of Food Microbiology* **114**, 288-294.
- Matsunaga, T., T. Suzuki, M. Tanaka, and A. Arakaki (2007), Molecular analysis of magnetotactic bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nano biotechnology, *Trends in Biotechnology* **25**, 182-188.
- Brigger, I., C. Dubernet, and P. Couvreur (2002), Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Delivery Rev.* **54**, 631-651.
- Hermanson, K. D., S. O. Lumsdon, J. P. Williams, E. W. Kaler, and O. D. Velev (2001), Dielectrophoretic assembly of electrically functional microwires from nanoparticle suspensions, *Science* **294**, 1082-1086.
- Tessier, P. M., O. D. Velev, A. T. Kalambur, J. F. Rabolt, A. M. Lenhoff, and E. W. Kaler (2000), Assembly of gold nanostructured films templated by colloidal crystals and use in surface enhanced Raman spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9554-9555.
- Wu, X., H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, E. Ge, F. Peale, and M. P. Bruchez (2003), Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nat. Biotechnol.* **21**, 41-46.
- Biswas, P. and C. J. Wu (2005), Nanoparticles and the Environment, *J. Air Waste Manage.* **55**, 708-746.
- Colvin, V. L. (2003), The potential environmental impact of engineered nanomaterials, *Nat. Biotechnol.* **21**, 1166-1170.
- Yu, D. G. (2007), Formation of colloidal silver nanoparticles stabilized by Na⁺ - poly(glutamic acid) - silver nitrate complex via chemical reduction process, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **59**, 171-178.
- Foucaud, L., M. R. Wilson, D. M. Brown, and V. Stone (2007), Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media, *Toxicology Letters* **174**, 1-9.
- Wick, P., P. Manser, L. K. Limbach, U. Dettlaff-Weglikowskab, F. Krumeich, S. Roth, W. J. Stark, and A. Bruinink (2007), The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity, *Toxicology Letters* **168**, 121-131.
- Sayesa, C. M., A. M. Gobinb, K. D. Ausmanc, J. Mendeza, J. L. Westb, and V. L. Colvin (2005), Nano C₆₀ cytotoxicity is due to lipid peroxidation, *Biomaterials* **26**, 7587-7595.
- Basarkar, A., D. Devineni, R. Palaniappan, and J. Singh (2007), Preparation, characterization, cytotoxicity and transfection efficiency of poly(DL lactide co glycolide) and poly(DL lactic acid) cationic nanoparticles for controlled delivery of plasmid DNA, *International Journal of Pharmaceutics* **343**, 247-254.
- Peng, D., J. Zhang, Q. Liu, and E. W. Taylor (2007), Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S transferase activity, *Journal of Inorganic Biochemistry* **101**, 1457-1463.
- Mao, Z., B. Wang, L. Ma, C. Gao, and J. Shen (2007), The influence of polycaprolactone coating on the internalization and cytotoxicity of gold nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **3**, 215-223.
- Sadeghiani, N., L. S. Barbosa, L. P. Silva, R. B. Azevedo, P. C. Moraisb, and Z. G. M. Lacava (2005), Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **289**, 466-468.
- Pereverzeva, E., I. Treschalin, D. Bodyagin, O. Maksimenko, K. Langer, S. Dreis, B. Asmussend, J. Kreuter, and S. Gelperina (2007), Influence of the formulation on the tolerance profile of nanoparticle bound doxorubicin in healthy rats: Focus on cardio and testicular toxicity, *International Journal of Pharmaceutics* **337**, 346-356.
- Pulskamp, K., S. Diabat', and H. F. Krug (2007), Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants, *Toxicology Letters* **168**, 58-74.
- Schubert, D., R. Dargusch, J. Raitano, and S. W. Chan (2006), Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **342**, 86-91.
- Oberdorster, E., S. Zhu, T. M. Blickey, G. P. McClellan, and M. L. Haasch (2006), Ecotoxicology of carbon based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms, *Carbon* **44**, 1112-1120.
- Zhu, S., E. Oberdorster, and M. L. Haasch (2006), Toxicity of an engineered nanoparticle fullerene, C₆₀ in two aquatic species, and fathead minnow, *Marine Environmental Research* **62**, S5-S9.
- Stoimenov, P. K., R. L. Klínger, G. L. Marchin, and K. J. Klabunde (2002), Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents, *Langmuir* **18**, 6679-6686.
- Stoimenov, P. K., R. L. Klínger, G. L. Marchin, and K. J. Klabunde (2002), Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents, *Langmuir* **18**, 6679-6686.
- Fresta, M., G. Puglisi, G. Giammona, G. Cavallaro, N. Micali, and P. M. Furneri (1995), Pefloxacin mesilate loaded and ofloxacin loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles-characterization of the colloidal drug carrier formulation, *J. Pharm. Sci.* **84**, 895-902.
- Sun, Y. G., B. Mayers, T. Herricks, and Y. N. Xia (2003), Polyol synthesis of uniform silver nanowires: a plausible growth mechanism and the supporting evidence, *Nano Lett.* **3**, 955-960.
- Tokumaru, T., Y. Shimizu, and C. L. Fox (1984), Antiviral activities of silver sulfadiazine and ocular infection, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **8**, 151-158.

34. Yamanaka, M., K. Hara, and J. Kudo (2005), Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7589-7593.
35. Cho, K. H., J. E. Park, T. Osaka, and S. G. Park (2005), The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient, *Electrochimica Acta* **51**, 956-960.
36. Pal, S., Y. K. Tak, and J. M. Song (2007), Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram Negative Bacterium *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **3**, 1712-1720.
37. SonDI, I. and B. Salopek-SonDI (2004), Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram negative bacteria, *J. Colloid and Interface Science* **275**, 177-182.
38. Morones, J. R., J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez, and M. J. Yacaman (2005), The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles, *Nanotechnology* **16**(10), 2346-2353.
39. Lok, C., C. Ho, R. Chen, Q. He, W. Yu, H. Sun, P. K. Tam, J. Chiu, and C. J. Che (2006), Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles, *Proteome Res.* **5**(4), 916-924.
40. Otwinowski, Z. and W. Minor (1997), Macromolecular crystallography, Part A, vol. 276. Academic Press Inc., San Diego, 307-326.
41. Organisation for Economic Co operation and Development (OECD) (2004), Guideline for the Testing of Chemicals: (Part 202).
42. Warheit, D. B., R. A. Hoke, C. Finlay, E. M. Donner, K. L. Reed, and C. M. Sayes (2007), Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management, *Toxicology Letters* **171**, 99-110.
43. Adams, L. K., D. Y. Lyon, A. McIntosh, and P. J. J. Alvarez (2006), Comparative toxicity of nano scale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions, *Water Science & Technology* **54**, 327-334.
44. Matsunaga, T. and M. Okochi (1995), TiO₂ mediated photochemical disinfection of *Escherichia coli* using optical fibres, *Environmental Science and Technology* **29**, 501-505.
45. Maness, P. C., S. Smolinski, D. M. Blake, Z. Huang, E. J. Wolfrum, and W. A. Jacoby (1999), Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: Toward an understanding of its killing mechanism, *Applied an Environmental Microbiology* **65**, 4094-4098.
46. Reddy, K. M., K. Feris, J. Bell, D. G. Wingett, C. Hanley, and A. Punnoosea (2007), Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems, *Appl. Physics Letters* **90**, 213902.
47. Brayner, R., N. Ferrari-Iliou, S. D. Brivois, M. F. Benedetti, and F. Fievet (2006), Toxicological Impact Studies Based on *Escherichia coli* Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium, *Nano Lett.* **6**, 866.
48. Williams, D. N., S. H. Ehrman, and T. R. P. Holoman (2006), Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles, *Journal of Nanobiotechnology* **4**, 1-13.
49. Chen, C. L. and H. S. Weng (2005), Nanosized CeO₂ supported metal oxide catalysts for catalytic reduction of SO₂ with CO as a reducing agent, *Applied Catalysis B: Environmental* **55**, 115-122.
50. Thill, A., O. Zeyons, O. Spalla, F. Chauvat, J. Rose, M. Auffan, and A. M. Flank (2006), Cytotoxicity of CeO₂ Nanoparticles for *Escherichia coli* Physico Chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism, *Environ. Sci. Technol.* **40**, 6151-6156.
51. Yingguang, L., Y. Zhuoru, and C. Jiang (2007), Preparation, Characterization and Antibacterial Property of Cerium Substituted Hydroxylapatite Nanoparticles, *J. Rare Earths* **25**, 452-456.