

산화 금속 입자 크기가 옥수수의 성장과 토양 미생물 군집에 미치는 독성

Size-dependent Toxicity of Metal Oxide Particles on the Soil Microbial Community and Growth of *Zea Mays*

김성현 · 정미애* · 이인숙 †
 Sunghyun Kim · Miae Jung* · In-sook Lee †

이화여자대학교 에코과학부 · *서강대학교 생명과학과
 Division of EcoScience, Ewha Womans University, *Department of LifeScience, Sogang University

(2009년 10월 8일 접수, 2009년 11월 12일 채택)

ABSTRACT : This study investigated soil microbial community and growth of *Zea mays* to compare the toxicity of nano and micro-sized Cu and Zn oxide particles in microcosm system. In the presence of nanoparticles, biomass of *Zea mays* reduced by 30% compared with micro-sized particles and inhibited growth. Dehydrogenase activity was inhibited by CuO nano although it was increased by ZnO nano particles. According to the Biolog test, the microbial diversity was decreased after exposed to CuO nanoparticles and ZnO microparticles. Therefore, though it is widely recognized that nanoparticles are more harmful than microparticles, we can conclude that the diversity of microbial community does not always influenced by the size of particles of nano and micro.

Key words : Nanoparticle toxicity, Metal oxide particles, Growth of *Zea mays*, Soil microbial community

요약 : 본 연구에서는 CuO와 ZnO의 입자 크기가 옥수수의 성장과 토양 미생물 군집에 미치는 독성을 microcosm 실험을 통하여 살펴보았다. 나노 입자는 micro 입자에 비해 옥수수의 biomass를 약 30% 감소시켜 나노 입자가 옥수수의 성장을 저해하는 것으로 나타났다. 토양 미생물 활성 지표인 Dehydrogenase activity는 CuO 나노 입자에서는 낮게 나타났으나 ZnO 나노 입자에서는 높게 나타났다. Biolog test 결과, CuO 나노 입자와 ZnO micro 입자에서 토양 미생물 다양성이 감소하는 것으로 나타났다. 그러므로, metal oxide의 나노 입자가 micro 입자보다 항상 토양 미생물의 활성 및 다양성에 더 유해한 영향을 나타내는 것은 아니라고 판단된다.

주제어 : 나노 입자 독성, 산화금속입자, 옥수수 성장, 토양 미생물 군집

1. 서론

Metal oxide 나노 입자는 산업체와 가정에서 널리 사용되고 있다. ZnO 나노 입자는 UV 흡수와 가시광선의 투과 때문에 자외선 차단제, 페인트 코팅제로 많이 사용되고 있다.¹⁾ CuO 나노 입자는 여러가지 기계 장치에서 열 이동의 효율을 높여 열전도장치로 사용되고 있다.²⁾

나노크기란 $10^{-7} \sim 10^{-9}$ m로 빠른 확산속도, 단위 부피당 반응 표면적이 넓은 것과 액체, 기체 상에서의 탁월한 반응성이 특징이다. 토양과 같은 환경에서 나노 입자가 노출되면 공기, 수중, 폐기물에 흡착, 반응하여 실생활 공간으로 이동하기 쉬워진다.³⁾

나노 입자는 동일한 화학적 구성을 하고 있는 물질이더

라도 넓은 표면적으로 이용성이 더욱 높아지지만 동시에 독성도 높아진다.⁴⁾ Lee 등⁵⁾은 Cu 나노 입자가 *T. aestivum*, *P. radiatus*의 종자발아와 뿌리 성장을 저해시킨다고 보고하였다. 또한 Lin 등⁶⁾도 Al 나노 입자가 종자의 발아와 뿌리 성장을 저해한다고 보고하였다. 이처럼 나노 입자에 관한 독성 연구가 이루어지고 있으나 micro 입자와 나노 입자간의 크기에 따라 식물 성장에 미치는 연구는 부족한 실정이다. 최근 연구결과에 따르면, 입자 크기에 따른 식물독성 연구로는 Al 나노 입자(13 nm)가 토양에 유출되었을 때 입자가 큰 Al보다 옥수수, 오이, 콩, 양배추, 당근의 뿌리 성장을 더 저해한다는 보고가 있다.⁷⁾

또한 입자크기에 따른 연구결과 이외에 나노 입자가 박테리아에 미치는 연구도 활발히 이루어지고 있다. ZnO 나

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

노 입자가 *E.coli*와 *Bacillus* 등 박테리아의 성장과 활성을 저해한다는 보고도 있다.⁸⁾ 이는 나노 입자가 세포사멸을 유도하여 박테리아의 성장을 저해하기 때문인 것으로 보고되었다. Iron, Cu나노 입자도 peroxide와 반응해 radical을 생성함으로써 미생물에 강한 독성을 나타낸다.⁹⁾ 그러나 이러한 연구 결과는 단순히 미생물의 독성평가만 했을 뿐 토양 환경에서 미생물의 독성평가 연구는 이루어지지 않고 있다.

나노 입자의 생태독성학적 영향 연구를 수행하기 위해서는 실험조건이 자연환경과 흡사해야 한다는 점이 중요하다. 자연환경을 모사한 microcosm 실험은 생태계 연구에 오랫동안 사용되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 CuO와 ZnO의 입자 크기에 따른 옥수수의 성장과 토양 미생물 군집에 미치는 영향을 microcosm 실험을 통하여 살펴보았다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험재료

나노 크기와 micro 크기의 CuO, ZnO Sigma Aldrich Co.에서 구입하였다. CuO micro 입자는 2-3 μm 로 표면면적이 1.5 m^2/g 이며, CuO 나노 입자는 50 nm 미만, 표면적은 29 m^2/g 이다. 또한 ZnO micro 입자는 200 nm이며 ZnO 나노 입자는 50 nm 미만, 표면적은 10.8 m^2/g 보다 크게 나타났다 (Table 1). CuSO_4 , ZnSO_4 도 reference로 Sigma Aldrich Co.에서 구입하였다. 각 입자의 형태는 Transmission Electron Microscopy (TEM, JEOL 100 CX, Japan)으로 관찰하였다 (Fig. 1). 토양 시료는 이화여자대학교 내 OO지점에서 채취하여 사용하였으며, 영양토는 Sunshine mix 5 (USA)를 구입하

Table 1. Characteristics of CuO micro, CuO nano particles and ZnO micro, ZnO nano particles used for the experiments

particles	description	size	purity (%)	surfacearea (m^2/g)
CuO micro	copper II oxide	2-3 μm	97.5 ⁺	1.5
CuO nano	copper II oxide, nanopowder, <50 nm	<50 nm	-	29
ZnO micro	zinc oxide	200 nm	99.0 ⁺	-
ZnO nano	zinc oxide, 6% Al doped, nanopowder,	<50 nm (BET)	97	>10.8

* The data are provided by producer

여 사용하였다. 옥수수 종자도 구입하였다.

2.2. Microcosm setup and sampling

토양은 이화여대 캠퍼스 토양을 채취하여 2 mm 체로 친 후에 영양토를 섞어 경작지 토양과 비슷하게 준비한다. CuO micro, CuO 나노와 ZnO micro, ZnO 나노 입자를 1,000 mg/L의 농도로 3차 증류수에 조제하여 초음파 분해기 (100 W, 40 kHz)로 30분간 분산시켜 사용하였다. 토양은 spatula로 10분간 잘 혼합하였다.

CuO micro, CuO 나노 입자와 ZnO micro, ZnO 나노 입자를 1,000 mg/kg의 농도로 오염시킨 토양 75 g을 500 mL stericup filter system Jars (Millipore, USA)내에서 15일간 25 $^{\circ}\text{C}$, 습도 70%가 유지되는 growth room에서 배양시킨다. CuO, ZnO 입자가 포함되지 않은 대조구 실험도 동시에 준비한다. 습도는 증류수 첨가로 일정하게 유지하였다. 15일간 배양이 끝난 후 토양 분석을 수행하였다. 실험은 duplicate로 수행하였다.

2.3. 옥수수의 성장

15일 동안 microcosm내에서 배양한 각 토양 40 g에 옥수수를 심는다. 10일간 재배한 후 각 토양의 옥수수 묘목을 수거한다. Deionized water로 충분히 씻은 후 키친타올로 수분을 제거한 후 biomass (fresh weight)를 측정했다.

2.4. Dehydrogenase activity 분석

CaCO_3 0.03 g을 넣은 멸균된 15 mL test tube에 fresh 토양 3 g, 0.1% idonitrotetrazolium (INT) - chloride 용액 0.5 mL, 멸균수 1.5 mL을 넣고 24 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 진탕 배양한 후 50 mL 100% ethanol로 추출하여 495 nm 파장에서 INT-formazan을 비색 정량한다.¹⁰⁾

2.5. 기질이용 형태

기질이용형태는 Biolog Ecoplate(Biolog, Hayward, CA)를 사용해 측정하였다. Biolog ecoplate는 96개의 well로 구성되어 각각의 31개의 다른 기질과 control well이 3개씩 반복되어 있다. 토양 1 g을 Biolog inoculating buffer 10 mL에 섞어 vortexing한 후, 증류수로 50배 희석하여 준비한다. 각 ecoplate의 96개 well에 100 μL 토양 현탁액을 넣어 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 72시간 동안 배양을 수행하였다. 배양이 끝난 ecoplate는 Microplate reader

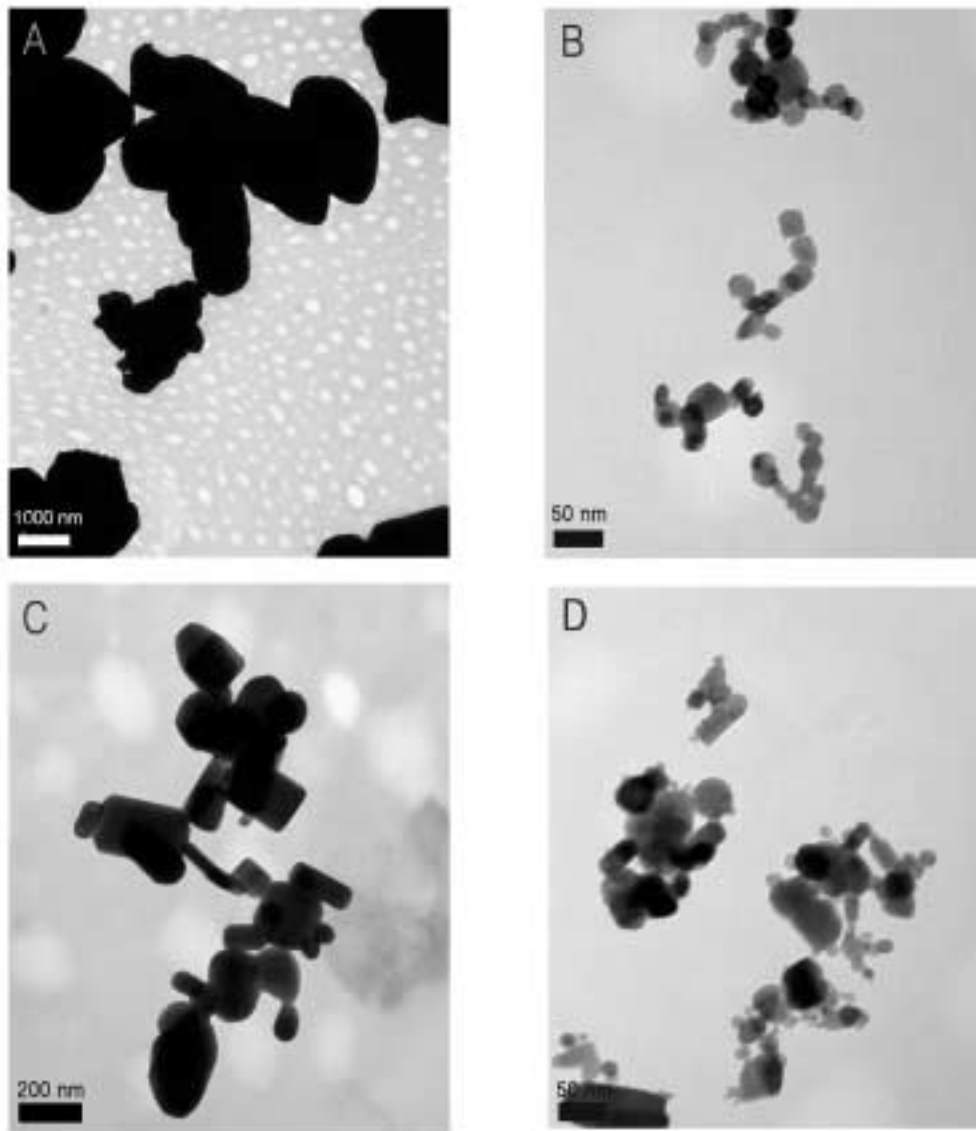


Fig. 1. TEM analysis of the nano- and micro-sized particles for primary size determination. The bars show the scale in nanometers. (A : CuO micro, B : CuO nano, C : ZnO micro, D : ZnO nano)

(Multiskan Ascent, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 색 변화 패턴은 duplicate plate 결과로부터 분석하였다. 두개의 ecoplate에서 색 변화가 동시에 나타나면 1점을 부여하고, 한 ecoplate에서만 색 변화가 나타나면 0.5점을 부여하고 두 ecoplate에서 색 변화가 나타나지 않으면 점수를 부여하지 않았다. Biolog ecoplate는 control과 31개의 다른 기질을 포함하고, ecoplate는 최대 32점까지 가능하다.

2.6. 통계분석

모든 측정치는 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였

다. 모든 통계분석은 Statistical Package for Social Science Statistical Software(SPSS 14.0, USA)를 이

Table 2. Seedling biomass of *Zea mays* exposed to CuO and ZnO particles

Treatment	Biomass (fresh weight, g)
Control	1.2±0.2 ^a
CuO micro	1.1±0.03 ^a
CuO nano	0.8±0.1 ^b
ZnO micro	1.1±0.03 ^a
ZnO nano	0.87±0.15 ^b

The different small letters stand for statistical significance at the 0.05 level with the Tukey's test

Table 3. Soil dehydrogenase activity (DHA) under treatments of CuO and ZnO nano and microparticles

Treatment	DHA ($\mu\text{g/g}$)
Control	46.24 \pm 2.49 ^a
CuO micro	30.99 \pm 5.81 ^a
CuO nano	8.10 \pm 0.01 ^b
ZnO micro	78.52 \pm 3.32 ^c
ZnO nano	151.88 \pm 2.49 ^d

The different small letters stand for statistical significance at the 0.05 level with the Tukey's test

용하였다. 처리구별 효과분석은 ANOVA test로 비교 분석 후 Tukey's test로 사후 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Metal oxide 입자의 특징

수용액에 있는 ZnO, CuO 나노와 micro 입자의 형태를 확인하기 위해 TEM 영상을 촬영하였다(Fig. 1). TEM 사진 결과 CuO micro 입자는 1,000 nm 이상, ZnO micro 입자는 200 nm 이상 인것으로 나타났다. CuO, ZnO 나노 입자는 구형으로 나타났으며 모두 응집하였으나 micro 입자의 평균크기보다 작았다. 응집은 나노 입자의 용해도에 영향을 미치며 독성과 관련된다. 용해도는 나노 입자의 표면적에 비례하므로 micro 입자보다 높다. ¹¹⁾ Yang과 Xie ¹¹⁾ 의 연구에 따르면 Zn, ZnO 나노 입자의 Zn²⁺ 이온 방출률은 실험초기 (<8 days)에는 micro 입자보다 빠르다고 보고했다.

3.2. 옥수수의 성장

옥수수의 biomass는 나노 크기 처리구에서 대조구에 비해 유의하게 저해되는 것으로 나타났다 (Table 2). 그러나 metal oxide 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. CuO 나노 입자에 노출된 옥수수의 biomass는 0.8 \pm 0.1 g, ZnO 나노 입자에 노출된 옥수수의 biomass는 0.87 \pm 0.15 g으로 나타났다(Table 2). 그러나 CuO, ZnO micro에 노출된 옥수수의 biomass는 control에 비해 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 나노 입자가 옥수수의 성장을 저해한 본 연구 결과는 Ling and Xing ⁶⁾ 의 연구에서 Zn 나노 입자, ZnO 나노 입자가 옥수수의 발아와 성장을 저해한 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

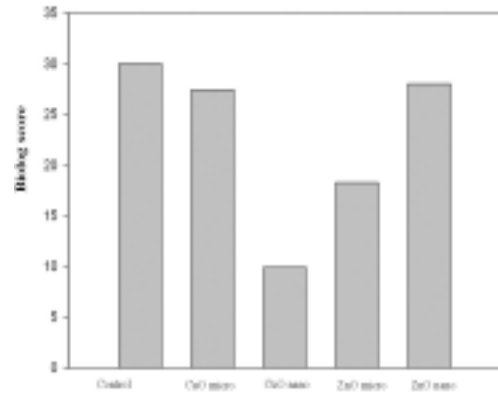


Fig. 2. Biolog score of the soil incubated with and without nanoparticles as measured using Biolog Ecoplates.

3.3. Dehydrogenase activity

토양 미생물에 대한 일반적인 효소활성도를 나타내는 탈수소활성도(Dehydrogenase activity, DHA)를 측정 한 결과는 Table 3과 같다. CuO 나노 입자에서 탈수소효소활성도가 가장 낮은 것으로 나타나 CuO 나노 입자가 시험 입자 중 가장 크게 미생물 활성을 저해시키는 것으로 나타났다. 반면 ZnO 나노, micro 입자에서는 탈수소효소활성도가 증가하는 것으로 나타났다. 문헌에 따르면 Zn을 토양에 저 농도로 인위적으로 첨가할 경우 토양 탈수소효소 활성도가 증가하기도 한다. Kizilkaya¹²⁾ 는 Zn을 0, 50, 100, 250, 500 mg/kg으로 첨가하고 탈수소효소활성도를 측정 한 결과, 250 mg/kg을 첨가했을 때 control에 비해 탈수소효소활성도가 2.5배 증가하는 것으로 보고 하였다.

3.4. 기질이용 패턴

CuO, ZnO 입자 크기별로 Biolog를 이용해 기질이용 패턴을 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 그림에 나타난 바와 같이 CuO 나노 입자 처리 토양에서 가장 낮게 나타났으며 이용하는 기질의 종류가 감소하는 것으로 나타났다. 반면 CuO micro, ZnO 나노 입자 처리된 토양에서는 거의 모든 기질을 이용하는 것으로 나타났다.

본 연구 결과, 토양 미생물 활성 및 미생물 다양성은 metal oxide종류에 따라 다른 것으로 나타났다. Heinlaan 등¹³⁾ 의 연구 결과에서도 박테리아와 곰팡이를 입자크기 나노, micro로 구분하여 독성 test를 수행한 결과, 나노 크기의 입자가 항상 독성을 나타내지는 않았다. 또한 CuO, TiO₂의 입자 크기에 따른 cytotoxicity와 DNA damage를 살펴본 결과 CuO 나노 입자는 독성을

보였으나 TiO₂ 나노 입자 크기에 따른 독성을 나타내지 않았다. 14) Shah와 Belozeroval³⁾의 연구에서도 Au와 Cu의 혼합 나노 입자 처리시 토양의 미생물 군집이 control과 비교해 6가지 기질 이용도가 감소하였으나 Pd 나노 입자를 첨가한 경우 3가지 기질 이용도가 증가하는 것으로 나타났다.

따라서 모든 나노 입자가 micro 입자 보다 높은 독성을 나타내는 것은 아닌 것으로 나타났다. 나노 입자가 토양 미생물의 다양성에 영향을 미치게 되면 토양 생태계의 기능도 변화하게 된다. 응집하는 성질을 지닌 나노 입자는 micro 입자들 보다 토양에 강하게 흡착해 토양의 매트릭스에 갇혀 움직이지 못하게 된다. 본 연구에서는 불용성의 나노 입자가 토양 미생물에는 직접적인 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다. 토양 환경은 매우 복잡하며 토양 내에서 나노 입자의 이동성이 독성에 영향을 미치므로 지속적인 연구가 필요하다.

4. 결론

본 토양 microcosm 실험 결과는 다음과 같다.

- 1) 옥수수의 biomass는 CuO 나노, ZnO 나노 입자 처리구에서 대조구에 비해 약 30% 저해되는 것으로 나타났다.
- 2) 토양 dehydrogenase activity는 CuO 나노 입자에서는 control에 비해 낮았으나 ZnO 입자에서는 높게 나타났다.
- 3) Biolog test 결과 CuO 나노 입자에서는 3가지 기질만 이용하는 것으로 나타나 토양 미생물 다양성이 가장 감소하였다.
- 4) CuO 나노 입자에서 토양 미생물 활성이 감소하지만 ZnO 입자에서는 증가하므로 metal oxide의 나노 입자가 항상 토양 미생물 활성 및 다양성을 저해하는 것은 아닌 것으로 나타났다.

KSEE

사 사

본 연구는 한국과학연구재단의 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (2009-0073454)

참고문헌

1. Cai, R., Van, G. M., Aw, P. K., and Itoh, K., "Solar-driven self-cleaning coating for a painted surface," *Chem.*, **9**, 829-835(2006).
2. Chang, H., Jwo, C. S., Lo, C. H., and Lin, H. M., "Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by ASNSS," *Rev. Adv. Mater. Sci.*, **10**, 128-132(2005).
3. Shah, V., and Belozeroval, I., "Influence of Metal Nanoparticles on the Soil Microbial Community and Germination of Lettuce Seeds," *Water. Air. Soil Pollut.*, **197**, 143-148(2009).
4. Nel, A., Xia, T., Mädler, L., and Li, N., "Toxic Potential of materials at nanolevel," *Science.*, **311**, 622-627(2006).
5. 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).
6. Lin, D., and Xing, B., "Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth," *Environ. Pollut.*, **150**(2), 243-250(2007).
7. Yang, J.C., 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. Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, Y., and York, D., "Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids)," *J. Nanoparticles Research*, **9**, 479-489(2007).
9. Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G., Gadd, G. E., and Casey, P. S., "Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility," *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 8484-8490(2007).
10. Trevor, J. T., Mayfield, J., and Inniss, W. E., "Measurement of electron transport system (ETS) activity in soil," *Microbiol. Ecol.*, **8**, 163-168(1982).
11. Yang, Z., and Xie, C., "Zn²⁺ release from zinc and zinc oxide particles in stimulated uterine solution," *Colloids Surf. B.*, **47**, 140-145(2006).
12. Kizilkaya, R., "Dehydrogenase activity in *Lumbricus*

- terrestris casts and surrounding soil affected by addition of different organic wastes and Zn," *Bioresour. Technol.*, **99**, 946~953(2008).
13. Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H., and Kahru, A., "Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*," *Chemosphere*, **71**, 1308~1316(2008).
14. Aruoja, V., Dubourguier, H., Kasemets, K., and Kahru, A., "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *pseudokirchneriella subcapitata*," *Science of the Total Environment*, **407**, 1461~1468(2009)