

# 아연 나노 입자와 산화아연 나노 입자의 특성과 식물독성 Characterization and Phytotoxicity of Zn, Zn Oxide Nanoparticles

김성현 · 백주형 · 송이레 · 신민주\* · 이인숙 †  
Sunghyun Kim · Juhyung Baek · Yireh Song · Minjoo Sin\* · In sook Lee †

이화여자대학교 에코과학부 · \*이화여자대학교 생명과학부  
Division of EcoScience, Ewha Womans University  
\*Department of LifeScience, Ewha Womans University

(2009년 10월 8일 접수, 2009년 11월 17일 채택)

**ABSTRACT** : Increasing application of nanotechnology highlights the need to clarify nanotoxicity and nanoparticles characterization. However, few researches have focused on phytotoxicity of nanoparticles. This study was to examine phytotoxicity on *Cumumis sativus* seedling and the dissolution of Zn, ZnO nanoparticles in hydroponic culture system. Results of this study; characteristics of Zn, ZnO nanoparticles are more aggregated in nutrient solution than deionized water. *C. sativus* biomass significantly reduced in the nutrient solution were higher than 100 mg/L, and Zn toxicity showed  $Zn^{2+} > Zn\ NPs > ZnO\ NPs$ . Results of transmission electron microscopy images, Zn and ZnO nanoparticles greatly adhered onto the root cell wall and nanoparticles were observed in the root cell.

**Key words** : Plant toxicity, Zn nano particles, ZnO nano particles, Characteristics of nano particles

**요약** : 나노기술이 발전하면서 나노 입자의 특성과 나노 독성에 대한 관심도 증가하고 있다. 그러나 나노 입자의 식물독성에 대한 연구는 부족하다. 본 연구에서는 Zn, ZnO 나노 입자의 각 농도 별로 오이 묘목을 수경 재배하여 식물독성을 조사하였다. 실험 결과, Zn, ZnO 나노 입자의 특성은 deionized water에서 보다 영양용액에서 응집이 더 일어났다. 오이 묘목의 생체량은 100 mg/L 이상에서 유의적으로 감소하였으며 독성은  $Zn^{2+} > Zn > ZnO$  나노 입자 순으로 나타났다. TEM 사진 결과, Zn, ZnO 나노 입자는 뿌리 세포벽에 붙어 있었으며 뿌리 세포 내에서도 응집해 있는 것이 관찰되었다.

**주제어** : 식물독성, 아연 나노 입자, 산화 아연 나노 입자, 나노 입자 특성

## 1. 서론

최근에는 새롭게 많은 종류의 금속 혹은 금속 산화물들이 나노 크기 수준으로 제조되고 이용되고 있으며, 향후 지속적으로 활용분야가 확대 될 것으로 예상된다. 나노 물질들은 수계에서 빠른 확산속도, 단위부피당 넓은 반응 표면적, 액체 혹은 기체상에서의 탁월한 반응성, 생물분자와의 비슷한 크기 등 매우 흥미로운 특징들을 가지고 있다.<sup>1)</sup> 본 연구에 사용된 아연 나노 입자는 전자산업 분야에서 varistor 등의 phosphor, 광촉매 UV 반도체 레이저의 gain medium, 태양 전지, 도로, 플라스틱, 화장품 등의 자외선 차단 및 흡수제, 고무 산업에서의 가교 촉진제 역할을 하는 필터로도 사용되고 있다.<sup>2,3)</sup> 산화아연 나노입자는 UV흡수와 가시광선의 투과 때문에 개인의 관리용품, coating, 페인트로 사용되어 왔

고, 이에 따라 나노 입자가 인체에 미치는 잠재적 위험에 대한 관심도 지속되고 있다.<sup>4)</sup>

이러한 나노 입자의 무분별한 사용과 독성에도 불구하고 환경에 노출된 나노 입자가 수생생물에 미치는 ecotoxicity에 관한 연구가 대부분이고, phytotoxicity에 관한 연구는 절대적으로 부족하다.<sup>5)</sup>

식물에 미치는 나노 입자의 영향에 관한 연구로는 Yang and Watts<sup>6)</sup>이 유기물질로 코팅된 Al 나노 입자(13 nm)가 토양에 유출되었을 때 옥수수, 오이, 콩, 양배추, 당근의 뿌리 성장을 저해한다는 보고가 있다. 또한 Lin and Xing<sup>7)</sup>의 Al 나노 입자가 ryegrass 종자의 발아와 뿌리 성장을 저해한다는 연구 등이 있다.

이전 연구에서 Zn 나노 입자의 식물독성에 대해 연구한바 있다<sup>8)</sup>. 그러나 petri dish에서 Zn와 ZnO 나노 입자가 오이

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

에 미치는 성장 저해만을 살펴보았다. 본 연구에서는 hydroponic culture system에서 water-insoluble Zn, ZnO 나노 입자의 특성과 이들이 오이 묘목에 미치는 phytotoxicity에 대해 조사하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

나노크기(<50 nm)의 아연, 산화아연 나노 입자가 실험에 사용되었다. 이들 나노 입자는 Sigma Aldrich Co.에서 구입하였다. 아연 나노 입자의 크기는 50 nm 미만, 표면적은 35-50 m<sup>2</sup>/g이며 산화아연 나노 입자의 크기는 50 nm 미만, 표면적은 10.8 m<sup>2</sup>/g 이상이었다. 나노 입자의 작은 크기에 의한 독성 비교를 위해 기준 물질로 사용된 ZnSO<sub>4</sub>는 Sigma Aldrich Co.에서 구입하였다. 선행 연구<sup>8)</sup>에 의해 US EPA 권장 식물 중 평균 발아율이 90% 이상인 오이(*Cucumis sativus*)를 모델 식물로 이용하였다.

### 2.2. 수경재배

4주간 키운 오이 seedling을 1/2 strength Hoagland 용액에 5일간 적응시킨 후 Zn, ZnO 나노 입자가 포함된 수용액에서 5일간 수경재배 하였다. 수용액의 농도는 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 mg/L 로 각 농도에 따른 오이 seedling의 biomass를 조사하였다. 수용액은 나노 입자의 영김 현상을 막기 위해 deionized water (DI-water)에 넣고 초음파분해기(100 W, 40 kHz)로 30분간 분산시켜 주었다. pH는 6.5에서 7.0으로 고정하였다.

### 2.3. 영양 용액의 Zn, Zn oxide 나노 입자 특징

Zn, Zn oxide 나노 입자에 노출시킨 오이 근권의 영양용액을 TEM (LIBRA 120, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. 또한 일반 수용액 상태에서의 나노 입자의 형태와 비교하기 위해 deionized water의 Zn, ZnO 나노 입자도 TEM으로 관찰하였다.

### 2.4. 생체량 분석

Zn, ZnO 나노 입자가 포함된 수용액에 오이 seedling을 5일간 노출시킨 후 수거했다. 수거한 오이는 deionized water로 충분히 씻고 키친 타올로 수분을 제거한 후 농도 별로 biomass (fresh weight)를 측정했다.

### 2.5. 전자 현미경 관찰

1,000 mg/L 농도의 Zn, ZnO 나노 입자, Zn<sup>2+</sup>에 노출한 오이 묘목의 뿌리 끝을 SEM(supra, 55vp: Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)과 TEM (LIBRA 120, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하여 나노 입자의 부착 및 집적된 형태를 관찰하였다. 오이 묘목의 뿌리 끝 표면 촬영은 노출된 뿌리 끝을 수거, 햇볕이 닿지 않는 곳에서 자연 건조하였다. 뿌리 표면의 입자가 탈리되는 현상을 막고 sputter (Eiko EB-5)로 시료 표면에 백금으로 증착시켜 Zn, ZnO 나노 입자의 부착 형태를 SEM으로 관찰하였다. 뿌리 끝 세포 내의 나노 입자 집적형태는 TEM을 이용하여 촬영 하였다. 전자 현미경 관찰을 위한 처리과정은 다음과 같다. 뿌리 끝 부위를 두께 500 μm정도 횡단으로 자른 다음, 2% glutaraldehyde에서 2시간 고정 후 0.1 M 인산 완충액 (pH 7.2)으로 세척하였다. 이어서 1% Osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) 가 함유된 고정액에 2시간 동안 고정 후 30분간 0.5% uranyl acetate 4°C에 처리하였다. 실온에서 30, 50, 70, 80, 90, 100%의 ethanol에 각각

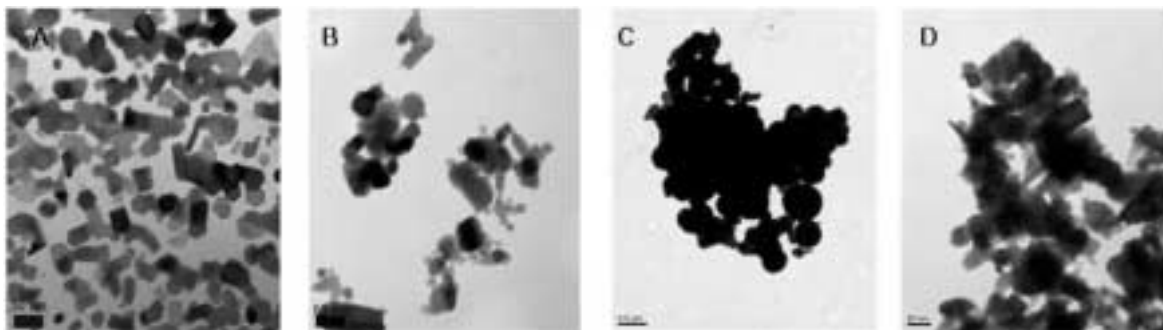


Fig. 1. TEM images of Zn, ZnO Nanoparticles from deionized water (A, B) and the nutrient solution collected from the rhizosphere (C, D).

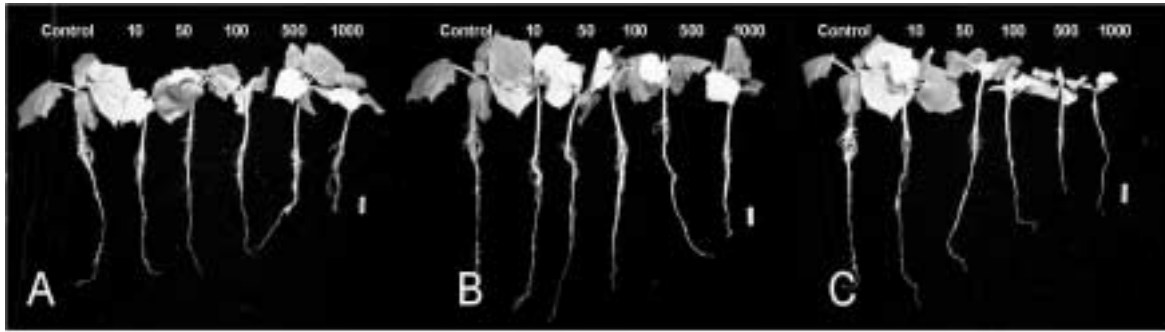


Fig. 2. Images of *C. sativus* seedling under the treatments Zn NPs (A), ZnO NPs (B), Zn<sup>2+</sup> (C).

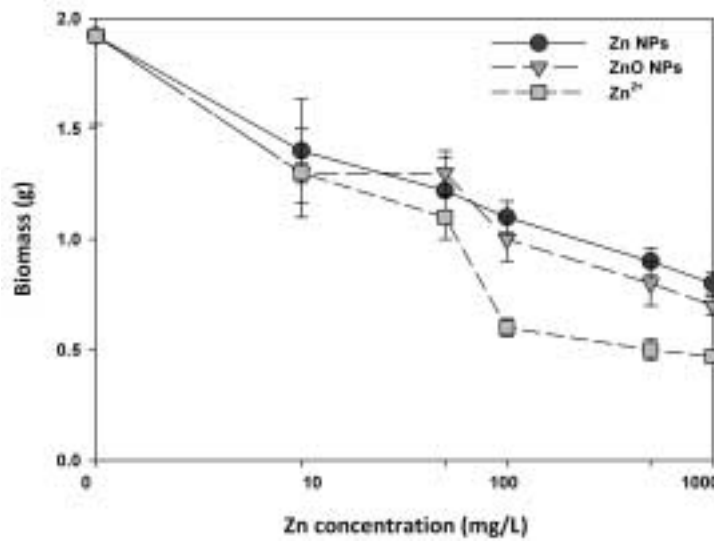


Fig. 3. *C. sativus* biomass reduction under the treatment of Zn NPs, ZnO NPs or Zn<sup>2+</sup>.

10분간 탈수한 후에 100% prophyllene oxide에 15분간 처리하였다. 처리된 root tip을 prophyllene oxide와 Spurr's resin에 각각 1:1로 2시간, 0:1로 4시간, 0:1로 2시간씩 처리하여 polymerization 시킨 후 70℃에서 24시간 굳힌 후 자른다 (Ultramicrotome: MT-X, RMC, Tucson, AZ, USA). Section한 뿌리 끝을 TEM으로 관찰한다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. Zn, ZnO 나노 입자의 특성

나노 입자의 TEM 사진(Fig. 1) 결과 입자가 응집되어 있고 각각은 구형이거나 오면체 모양이다. 영양용액에서는 나노 입자가 deionized water에서 보다 더 응집하는 것으로 나타났다. 특히 Zn 나노 입자의 응집된 크기는 영양용액에

서 약 500 nm 이상인 것으로 나타났다. 응집은 나노 입자의 용해도에 영향을 미치며 독성과 관련된다. 특히 수중생물은 용해된 나노 입자에 매우 민감하므로 용해도가 매우 중요하다. Flanklin등<sup>9)</sup>의 연구에서도 ZnO가 수중 생물에 독성을 미치는 주요 요인은 입자 크기보다 용해도인 것으로 나타났다.

#### 3.2. 오이 묘목에 미치는 Zn, ZnO 나노 입자와 Zn<sup>2+</sup>의 독성

Zn, ZnO 나노 입자, Zn<sup>2+</sup>의 농도가 높아질수록 잎과 뿌리의 성장이 저해되었고 Zn<sup>2+</sup>에서 가장 저해되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 모든 아연 처리구 100 mg/L 이상에서는 잎에 황변 현상이 나타나고 시들었으며 검은 반점이 나타났다. 뿌리 또한 길이 생장이 저해되고 뿌리털과 측근의 발달이 감소하였다. 뿌리의 성장저해는 50 mg/L의 수용액에서부터 나타났다.

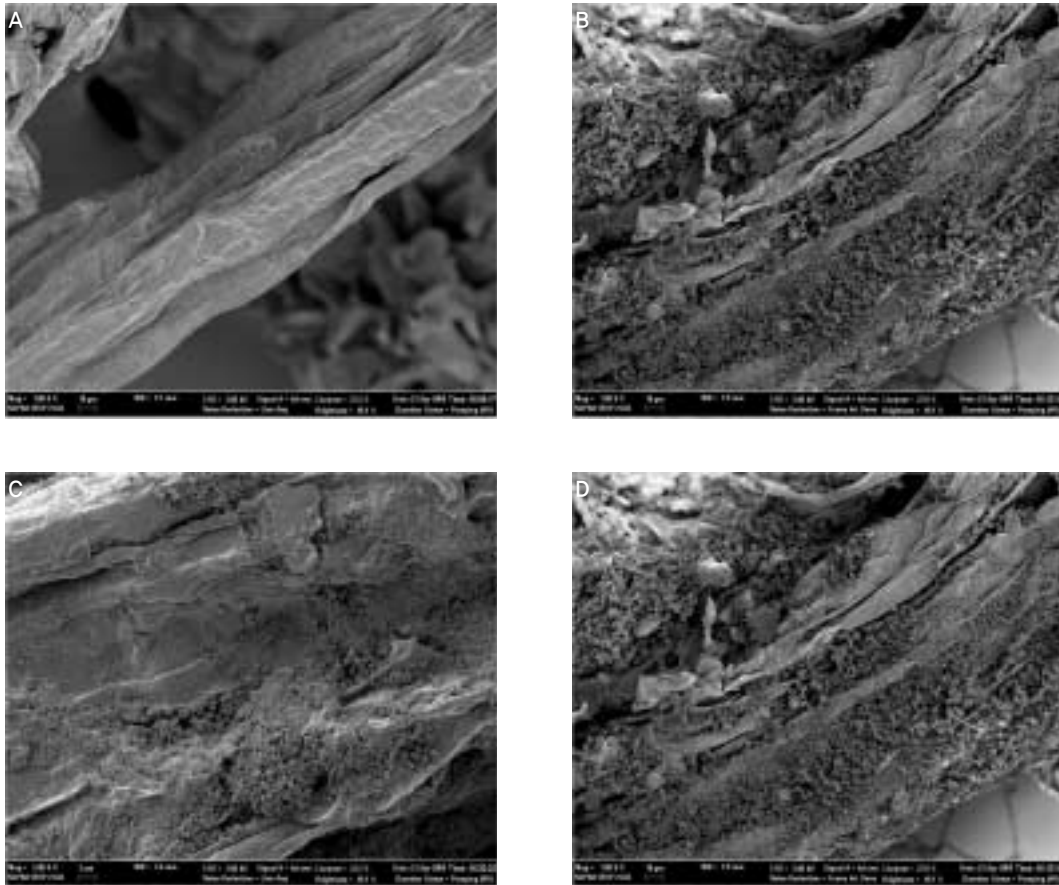


Fig. 4. SEM images of *C. sativus* root surface under treatments of 0 mg/L(A), 1,000 mg/L Zn NPs (B), 1,000 mg/L ZnO NPs (C) and 1000 mg/L Zn<sup>2+</sup> (D).

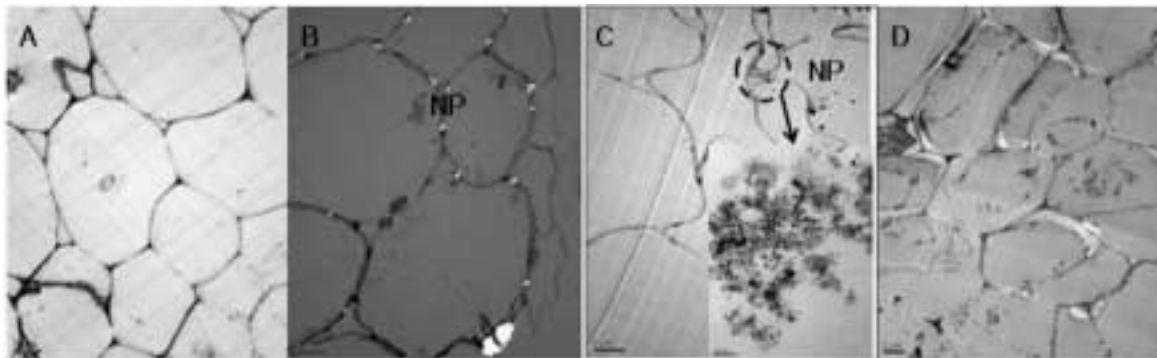


Fig. 5. TEM images of the *C. sativus* under the treatment of 0 mg/L (A), 1,000 mg/L Zn NPs (B), 1,000 mg/L ZnO NPs (C); magnified TEM images of agglomerates are included as inserts, and 1,000 mg/L Zn<sup>2+</sup> (D).

오이 묘목에 미치는 Zn, ZnO 나노입자, Zn<sup>2+</sup>의 dose-response곡선은 Fig. 3과 같다. 오이 묘목의 biomass 감소는 Zn<sup>2+</sup> > ZnO > Zn 순으로 나타났다. Biomass의 IC<sub>50</sub>(50% Biomass inhibitory concentration)은 Zn<sup>2+</sup>와 ZnO, Zn 나노 입자에서 72, 215, 255 mg/L로 Zn<sup>2+</sup>가 가장 큰 독성을 나타냈다. Zn<sup>2+</sup>의 IC<sub>50</sub>은 43-996 mg

Zn/L로 다양한 식물에서 다양하게 보고되었다.<sup>7,10)</sup> 이는 식물 종과 growth stage에 따른 차이로 나타났다. 독성 effect가 Zn 나노 입자 때문인지 확인하기 위해 Zn 나노 입자 1,000 mg/L에서 용해되는 Zn 이온 양을 측정하였다. 우리의 이전연구<sup>8)</sup>와 같이 threshold보다 낮은 5 μg/g으로 나타나 직접적인 용해에 의한 것이 아닌 것으로

나타났다.

### 3.3. 오이 묘목 뿌리 끝의 SEM, TEM 사진

오이 묘목 뿌리 끝의 표면을 관찰하기 위해 SEM촬영을 한 결과 Control 또는 대조구에서는 나노입자를 노출 시킨 것과 비교하여 입자상 물질들이 형성되거나 관찰되지 않았다. Zn NPs과 ZnO NPs처리한 뿌리 끝 표면에서는 나노 입자의 흡착과 응집이 관찰 되었는데 이러한 입자들이 오이 묘목의 뿌리표면에 집적함으로 영양물질의 이동을 막고 뿌리생장을 저해 한 것으로 보였다(Fig. 4). 따라서 아연이온은 흡수에 의한 독성으로 뿌리의 성장을 저해하지만, Zn, ZnO 나노 입자에서는 뿌리 표면의 나노 입자 집적에 의한 대사작용의 물리적 차단에 의한 독성으로 나타났다.

TEM으로 뿌리 세포 내의 나노 입자를 관찰한 결과는 Fig. 5 와 같다. Control과 Zn<sup>2+</sup>에서는 나노 입자가 관찰되지 않았다. 반면, Zn, ZnO 나노 입자에 노출시킨 오이 뿌리는 나노 입자가 대부분 세포벽에 집적되어 있었으며, 일부만이 세포벽을 통과하여 세포 내부에 응집되어있는 것으로 관찰되었다. 이는 Fig. 1의 결과에서 나타난 바와 같이 Zn 나노 입자가 영양용액에서 응집이 잘 일어남에 따라 입자의 크기가 커져 세포 내로 이동이 어려웠을 것으로 사료된다. 응집되지 않은 작은 나노 입자만이 세포벽을 통과하여 세포 내부로 들어갈 수 있다. <sup>11)</sup>

## 4. 결론

본 수경재배 실험에서 아연, 산화 아연 나노 입자, 아연이온에 오이 seedling을 노출한 결과는 다음과 같다.

- 1) Zn, ZnO 나노 입자는 모두 deionized water에서 보다 영양용액에서 응집이 더 잘 일어났다.
- 2) 오이seedling biomass의 IC<sub>50</sub> (50% Biomass inhibitory concentration)은 Zn<sup>2+</sup>, ZnO, Zn 나노 입자 각각에서 72, 215, 255 mg/L로 독성은 Zn<sup>2+</sup> > ZnO > Zn 나노 입자 순으로 나타났다.
- 3) Zn, ZnO 나노 입자 에서 방출된 Zn이온의 양은 threshold보다 낮으므로 식물독성은 Zn, ZnO 나노 입자의 영향으로 나타났다.
- 4) Zn, ZnO 나노 입자 처리 시, 뿌리 끝의 세포벽에 부착된 나노 입자가 SEM으로 관찰되었다.
- 5) Zn, ZnO 나노 입자 처리시 뿌리 끝 단면에서 세포벽을

둘러싼 다량의 나노 입자가 TEM으로 관찰되었다. 나노 입자 일부는 세포 내부에서도 응집된 상태로 관찰되었다.

**KSEE**

## 사 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 2008년 우수여성과학자사업비(KRF-2008-D00012)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

## 참고문헌

1. Shah, V., and Belozerova, I., "Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of Lettuce seeds," *Water, Air, Soil pollut.*, **197**, 143~148(2009).
2. Meulenkamp, E. A., "Synthesis and growth of ZnO nanoparticles," *J. Phys. Chem. B.*, **102**, 5566~5572(1998).
3. Serpone, N., Dondi, D., Albini, A., "Inorganic and organic UV filters: their role and efficacy in sunscreens and sun care products," *Inorg. Chim. Acta.*, **360**, 794~802(2007).
4. Stephen, J., Klaine., "Nanomaterials in the environment," *Environ. Toxicol. Chem.*, **9**, 1825~1851(2008).
5. U. S. Environmental Protection Agency Home page, <http://www.epa.gov/OSA/nanotech.htm>, February (2007).
6. 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).
7. Lin, D., and Xing, B., "Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth," *Environ. Pollut.*, **150**(2), 243~250(2007).
8. 송이레, 남윤선, 이인숙, "아연, 산화 아연 나노 입자가 오이에 미치는 독성 및 생물이용성," 대한환경공학회지, **31**(7), 467~472(2009).
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 ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility," *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 8484~8490 (2007).
10. 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 (*TritiZnm Aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles,” *Environ. Toxicol. Chem.*, **27**(9), 1915~1921(2008).

11. Fleischer, A., O'eill, M. A., and Ehwald, R., “The pore size of

nongraminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II,” *Plant Physiol.*, **121**, 829~838(1999).