

수생태계에서 ZnO, TiO₂나노입자 응집체가 물벼룩(*Daphnia magna*)에 미치는 영향

이하늘* · 이병우** · 박찬일*** · 김무찬****†

* 경상대학교 해양환경공학과, ** 산업의과대학 산업생태과학 연구소, *** 경상대학교 해양산업연구소

Effect of *Daphnia magna* on Nanoparticle(ZnO, TiO₂) Aggregates in Aqueous System

Ha-Neul Lee* · Byeong-Woo Lee** · Chan-Il Park*** · Mu-Chan Kim****†

* Marine Environmental Engineering, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

** Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan

*** Institute of Marine Industry, College of Marine Science, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

요 약 : 본 연구에서는 정제되지 않은 ZnO 및 TiO₂나노입자를 M4배지에 노출시켜 두 나노입자가 어느 정도 크기의 응집체로 변화되는지를 살펴보고 또한 두 나노입자가 수생태계 생물종인 *Daphnia magna*에 어떠한 영향을 초래하는지 유영저해 및 폐사율을 통해 살펴보았다. ZnO 및 TiO₂나노입자의 분말상태 크기는 각각 20 nm와 40 nm였지만, M4배지에서는 1333 nm와 1628 nm로 약 40~70배의 크기로 응집되었다. 유영저해의 경우 ZnO와 TiO₂나노입자 모두 시간 및 농도가 높아질수록 *D.magna*가 유영하는데 영향을 미친 것으로 나타났으며, 특히 ZnO나노입자가 TiO₂나노입자에 비해 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 폐사율의 경우 ZnO나노입자에서는 시간 및 농도가 높아질수록 폐사되는 비율이 높았으며, TiO₂나노입자에서는 72시간이 경과된 시점의 10 ppm 이상의 농도에서 폐사하는 것으로 관찰되었다. 이는 나노입자가 해양에 유입됨으로 인해 원래의 크기에 비해 응집되어 증가되어진다는 것을 알 수 있으며, 또한 그 응집체로 인해 수생태계 생물에 영향을 주는 것으로 나타났다.

핵심용어 : 나노입자, 물벼룩, 산화아연, 이산화티타늄, 나노입자 응집체, 유영저해, 폐사율

Abstract : This study is unrefined ZnO, TiO₂ nanoparticles is expose M4 medium to search nanoparticle aggregation and *Daphnia magna* was any effect by immobilization and mortality. ZnO and TiO₂ nanoparticle powder-size is respectively 20 nm and 40 nm. but, M4 medium has about respectively as 1333 nm and 1628 nm, 40 to 70 times were agglomerated. Immobilization of ZnO and TiO₂ nanoparticles was influenced both time and concentration the higher to swimming of *D.magna*. Especially, The immobilization of *D.magna* in nano-ZnO is greater than that influence in nano-TiO₂. Mortality of ZnO nanoparticle is higher rate at long time and high concentration. TiO₂ nanoparticle observed mortality at 10ppm concentration after 72h. Consequently, when Nanoparticles is introduced into ocean. Particle size become grow. Additionally, aggregation be caused affect aquatic ecosystems.

Key Words : Nanoparticle, *Daphnia magna*, ZnO, TiO₂, Nanoparticle aggregates, Immobilisation, Mortality rate

1. 서 론

나노기술(nanotechnology)은 21세기 차세대 기술로써 주목을 받고 있다. 나노기술에 의해 만들어진 나노물질은 빠른

확산속도와 단위 부피당 넓은 표면적, 액체 혹은 기체상에서의 탁월한 반응성, 생물 분자와의 비슷한 크기 등의 매우 흥미로운 특징들을 가지고 있다(Hwang et al., 2007). 이에 따라 고기능성 혹은 신기능성을 가진 초미립자에 대한 관심이 높아지면서 현재 전자제품, 기능성화장품, 반도체 등으로 개발되어 상용화되어 있다(Lee and Suh, 2008). 특히 무기계 자

* First Author : lhn109@naver.com, 055-772-9135

† Corresponding Author : kmc81@gnu.ac.kr, 055-772-9135

외선 차단제로 알려진 ZnO과 TiO₂나노입자는 형태제어, 투명성 향상, 내수성 향상 등에 관해 많은 연구가 진행되어왔다(Yang et al., 2003; Nasu and Otsubo, 2008; Iijima et al., 2007). Warheit et al.(2005)에 의하면 나노물질에 관한 최근 연구들은 포유류 또는 세포류에 관한 잠재적 영향에 집중되어 있다고 보고 하였다. Wie et al.(2012)에서는 나노물질의 생성 과정이나 사용과정 그리고 사용 후에 오염물질 또는 폐기물의 형태로 최종적으로 해양에 유입되어, 해양생태계에 잠재적인 위험을 끼칠 수 있다고 보고하였다. 나노기술의 발달과 생산으로 수중환경에 나노입자가 지속적으로 유입이 증가될 것이지만 어떠한 형태로 생태계에 영향을 미칠지는 앞으로 많은 연구가 필요 할 것이다.

Hund-Rinke and Simon(2006)는 TiO₂나노입자를 녹조류(*Desmodesmus subspicatus*)에 노출시켜 실험한 결과 EC₅₀이 44 mgL⁻¹로 용량-의존적 독성이 있다고 보고하였다. 하지만 다른 실험 결과에서는 *Daphnia magna*에 bulk TiO₂과 nano TiO₂에 노출시켰을 때 그 영향이 서로 큰 차이를 보이지 않았다고 하였다. 또한 Franklin et al.(2007)에서는 식물플랑크톤인 *Pseudokirchneriella subcapitata*에 ZnCl₂과 bulk ZnO, nano-ZnO를 노출시킨 결과 72시간 반수개체군성장률저해농도인 IC₅₀의 값이 각각 61 µg/L과 63 µg/L, 49 µg/L로 입자 크기별 영향이 거의 없는 것으로 보고하였다. 그 이유로는 실험 과정 중 나노입자의 분산성이 안정하지 못하여 응집체로서 노출되었기 때문이라고 보았으며 입자의 용해거동이 어떻게 응집체에 영향을 미치는지는 정확히 알 수 없다고 보고하였다. 이와 같이 나노입자를 가지고 노출실험 한 결과에서 어떠한 영향으로 인해 유해성을 가지는지 생물에게 어떠한 영향을 미치는지에 대해 명확하게 밝혀지고 있지 않다.

이 연구에서 나노입자의 영향을 알아보기 위하여 표면 개질과 계면활성제 투입, 초음파분쇄 등의 분산성을 높이려는 시도를 계속하였지만 실험하고자 하는 조건에서의 입자크기를 유지하기가 어려운 상황이다. 따라서 나노입자 크기로 자연생태계에 노출되는 것보다 나노입자가 응집한 응집체로서의 영향을 알아 볼 필요가 있다. 그리하여 이 연구에서는 해양의 기초생산자인 식물플랑크톤을 먹이원으로 하며 해양생태계 1차소비자로 먹이연쇄를 통해 그 입자의 축적과 차후 해양환경에 노출될 확률이 높아 이에 따른 연구가 요구되므로 국제적인 시험가이드라인을 가지고 있고 해양 생태계의 동물플랑크톤 역할을 대체할 수 있는 물벼룩(*Daphnia magna*)을 이용하여 ZnO과 TiO₂나노입자의 수계(M4배지)내 응집크기를 알아보고 그 응집체가 물벼룩(*Daphnia magna*)에 어떠한 영향을 미치는지 유영저해(Immobilization)와 폐사율(Death Rate)을 통해 알아보기로 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 생물 및 배양

본 연구에 사용한 *D.magna*는 생후 8시간 이내의 신생개체를 제공(네오엔비즈)받아 사용하였다. *D.magna*의 생태환경 연구용으로 주로 쓰이는 M4배지 50 ml에 5마리의 *D.magna*를 노출시켰으며, 4반복 실험을 행하였다. OECD 202 *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test 방법(OECD, 2004)에 준하여 한 농도당 20개체의 성체를 사용하였으며, 실험 중에는 먹이를 공급하지 않았다. 배지의 배양은 Incubator(NDI-100, Neo Environmental Business, Korea)에서 20±2℃의 온도로 16L:8D 간격의 광암주기를 설정하였다.

2.2 시약 및 기구

Zinc oxide(ZnO, 20 nm, purity: 99.9%), Titanium oxide(TiO₂, 40 nm, purity: 99.8%)나노입자는 OECD의 WPMN(Working Party of Manufactured Nanomaterials)에서 선정된 안정성연구 물질로(OECD, 2010), hanalintech에서 제조한 분말을 사용하였다. 두 나노입자는 Transmission electron microscope(JEM2010, Jeol, Japan)을 이용하여 분말 상태의 나노입자 크기를 측정하였다. 그 후 Ultrasonics Processor(VCX130, sonics&materials, U.S.A)으로 두 나노입자를 30분간 기계적 분산시키고, M4배지(Table 1)에 첨가하였다. 이 때 M4배지 내의 나노입자가 어느 정도의 크기로 응집이 되었는지 알아보기 위해 Zetasizer Nano(S90, Malvern, U.K)를 이용하여 입자 크기를 측정 하였다.

2.3 측정 및 농도

먹이 공급을 하지 않아도 *D.magna*가 폐사하지 않는 최대 시간인 72시간까지 24시간 간격으로 유영저해율(Immobility)및 폐사율(Death Rate)을 측정하였다. 노출농도는 대조구(0 mg/L)와 0.1, 10, 50, 100 mg/L로 저자가 속해있는 연구실에서 이전에 ‘나노입자가 알테미아(*Artemia sp.*) cyst부화율에 미치는 영향’(Jeong, 2009)에 관하여 9가지의 나노입자로 실험한 결과, Zn과 Ag-TiO₂나노입자에 노출된 *Artemia cyst*는 실험 최대 농도인 20 mg/L에서 각각 73%, 75%의 부화율을 보였는데 이를 예비실험으로 하여 생태독성 실험에서 동물플랑크톤의 경우 실제 해양환경에서 생물농축의 영향으로 고농도의 나노입자에 노출될 위험성을 간과할 수 없고 더불어 TiO₂와 Zn의 독성차이를 고려하여 농도범위를 설정하였다. 측정방법은 15s 동안 유영이 없는 정지된 상태를 유영저해로 보았으며, 심장박동이 없을 때에는 폐사한 것으로 간주하여 계수하였다.

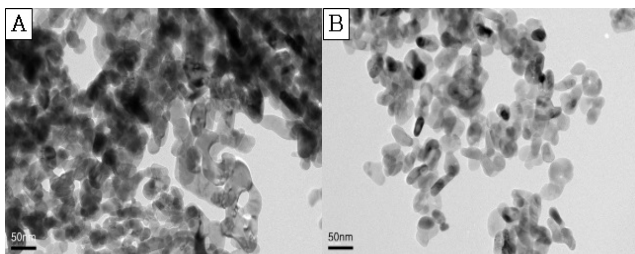
Table 1. Construct of M4 medium.

No.	Composition	Concentration (mg/l)
1	H ₃ BO ₃	2.86
2	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.361
3	LiCl	0.306
4	RbCl	0.071
5	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.152
6	NaBr	0.016
7	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.063
8	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.017
9	ZnCl ₂	0.013
10	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01
11	KI	0.0033
12	Na ₂ SeO ₃	0.0022
13	NH ₄ VO ₃	0.00058
14	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	2.5
15	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1
16	CaCl ₂ ·2H ₂ O	293.8
17	MgSO ₄ ·7H ₂ O	123.3
18	KCl	5.8
19	NaHCO ₃	64.8
20	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	10
21	NaNO ₃	0.274
22	KH ₂ PO ₄	0.143
23	K ₂ HPO ₄	0.184
24	Thiamine hydrochloride	0.075
25	Cyanocobalamin	0.001
26	Biotine	0.00075

3. 결과 및 고찰

3.1 입자 크기

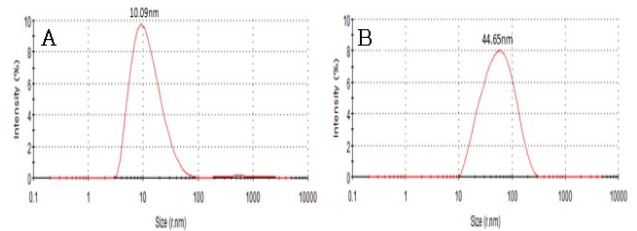
나노입자를 M4배지에 노출시키기 전, 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 분말 상태의 나노입자 구조와 크기를 살펴보았다(Fig. 1). ZnO나노입자의 크기는 20 nm 정도의 구형 입자들로 관찰 되었으며(Fig. 1A), TiO₂나노입자에서는 40 nm의 정사원형 입자들로 관찰되었다(Fig. 1B).



(A) ZnO nanoparticle (B) TiO₂ nanoparticle

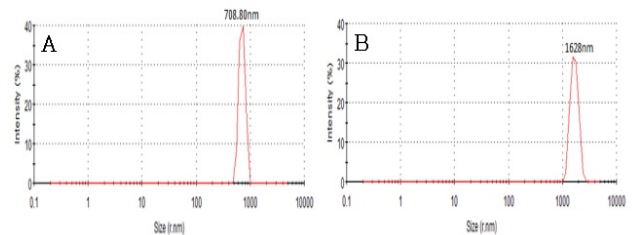
Fig. 1. Nanoparticle powder size by TEM.

DW와 M4배지에서의 나노입자 크기를 비교하기 위해 입도분석기를 사용했다. 측정 결과는 Fig 2, 3에 나타내었다. DW에 분산시킨 ZnO나노입자크기는 평균 10.09 nm였으며(Fig. 2A), TiO₂나노입자 크기는 44.65 nm로 분말상태 일 때와 비슷한 크기를 보였다(Fig. 2B). M4배지의 경우, ZnO나노입자는 DW와 달리 708.80 nm의 크기를 보였으며 분말일 때보다 약 70배 증가한 것으로 나타났다(Fig. 3A). 또한 TiO₂나노입자에서도 1628 nm 크기로 DW에서보다 약 40배 증가하였다(Fig. 2B). Sillanpää et al.(2011)은 기수와 담수에서 TiO₂나노입자의 응집크기 변화를 알아보았는데 담수보다 기수에서 그 응집크기가 2~5배 더 커졌다고 보고하였으며 그 원인으로서는 전기전도도가 클수록 입자 표면전위와 용액안의 이온이 반응하여 응집한 것으로 보고하였다. 이는 우리 연구에서 DW에서는 0.5μs/cm의 전기전도도를 가지지만 M4배지내의 성분(Table 1)에 있어서 이온의 증가로 실제 전기전도도가 높아져 응집의 차이를 보인 것으로 생각된다.



(A) ZnO nanoparticle (B) TiO₂ nanoparticle

Fig. 2. Nanoparticle powder size at DW.



(A) ZnO nanoparticle (B) TiO₂ nanoparticle

Fig. 3. Nanoparticle powder size at M4 medium.

3.2 유영저해 (Immobilisation)

DW에 비해 M4배지에서 입자크기가 증가하는 것으로 나타났는데, 이러한 변화가 해양동물에 어떠한 영향을 주는지 *D.magna*의 유영상태를 통해 살펴보았다. Fig. 4는 두 나노입자를 각각의 농도별로 설정한 후 *D.magna*에 노출시켜 그에 따른 유영저해 실험 결과를 나타낸 것이다.

먼저 나노입자가 들어있지 않은 대조구(0mg/L)에서는 48

시간까지 아무런 영향을 보이지 않았지만, 72시간이 지나면 시점에서 약 10% 정도의 유영저해가 있는 것으로 관찰되었다. ZnO나노입자를 노출 시킨 *D.magna*는 24시간 후 10 ppm에서 5%, 50 ppm과 100 ppm에서는 전 개체 중의 약 30% 정도가 유영저해를 보인 것으로 나타났다. 48시간 경과 후에는 0.1 ppm에서 50%의 유영저해가 나타났으며 10 ppm 이상의 농도에서는 전 개체가 유영하지 않은 것으로 나타났다. 72시간 후에는 모든 농도에서 *D.magna*가 유영하고 있는 모습을 관찰 할 수가 없었다(Fig. 4A).

TiO₂나노입자의 경우 ZnO나노입자와 달리 24시간이 지나더라도 *D.magna*의 유영에 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다. 하지만 48시간 경과 후에는 0.1 ppm에서부터 영향을 보여 10 ppm에서 10%, 50 ppm에서 5%, 100 ppm에서는 20%의 유영저해를 보인 것으로 관찰되었다. 그리고 72시간 경과 후에는 0.1 ppm에서는 15%, 10 ppm에서는 35%의 유영저해를 보였고 50 ppm에서부터는 50%가 넘는 유영저해를 보였다(Fig. 4B).

이와 같은 결과는 환경스트레스 또는 세포내 항산화스트레스가 일어나면 항산화작용에 관여하는 효소인 GST효소가 활성화 되는데 Kim(2006)은 TiO₂나노입자의 응집현상이 SOD(항산화효소)의 증가에는 관여하지 않지만 GPx, GST 항산화효소가 TiO₂ 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였다고 보고하였다. 이는 TiO₂가 물벼룩에 대해 산화적 스트레스를 유도한다는 증거가 되므로 본 연구에서도 산화적스트레스로 인한 유영저해인 것으로 생각된다. 따라서 차후 연구를 통해 산화적스트레스 반응이 나노입자 자체의 문제인지, 중금속 이온의 영향인지 또는 나노입자와 용해이온 모두의 영향인지 연구 할 가치가 있다고 여겨진다. 또한 용해 이온의 생물 체내-외의 영향 또한 구분하여 세분화 할 수 있을 것으로 본다.

종합적으로 두 나노입자 모두 시간 및 농도가 높아질수록 *D.magna*가 유영하는데 영향을 미친 것으로 나타났으며, 특히 ZnO나노입자가 TiO₂나노입자에 비해 더 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

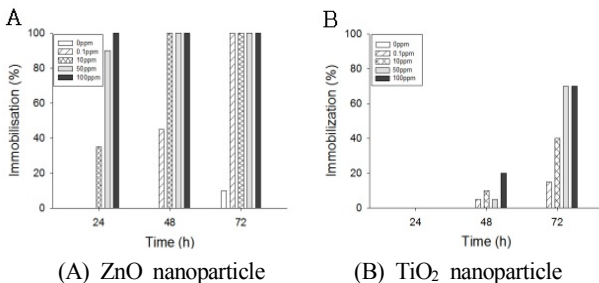


Fig. 4. Immobilization rate of *D.magna* for Nanoparticle in M4 medium.

3.3 폐사율(Death Rate)

M4배지에 두 나노입자를 첨가한 후 *D.magna*의 폐사율을 살펴보았다(Fig. 5). 우선 대조구(0 mg/L)에서는 전 실험 관찰 기간 폐사한 개체는 보이지 않았다. ZnO나노입자의 경우 24시간 경과 후 10 ppm에서 30%, 50 ppm에서 60%, 100 ppm에서 70%로 *D.magna*가 폐사된 것으로 관찰 되었으며, 48시간 경과 후에는 10 ppm 이상 전 농도 모두 폐사된 것으로 나타났다. 72시간에서는 48시간 이전의 결과와 달리 0.1 ppm에서 전 개체중 50%가 폐사되었으며, 0.1 ppm 이상의 농도에서는 48시간의 결과와 같이 모두 *D.magna*가 폐사된 것으로 나타났다(Fig. 5A).

TiO₂나노입자 경우 ZnO나노입자와 달리 48시간이 경과되더라도 폐사된 개체는 보이지 않았다. 하지만 72시간 경과된 시점에서 10 ppm과 50 ppm에서 10% 이하, 100 ppm에서는 20% 정도 *D.magna*가 폐사된 것으로 관찰되었다(Fig. 5B).

ZnO나노입자에서는 시간 및 농도가 높아질수록 폐사되는 비율이 높았으며, TiO₂나노입자에서는 72시간이 경과된 시점의 10 ppm 이상의 농도에서 폐사하는 것으로 관찰되었다.

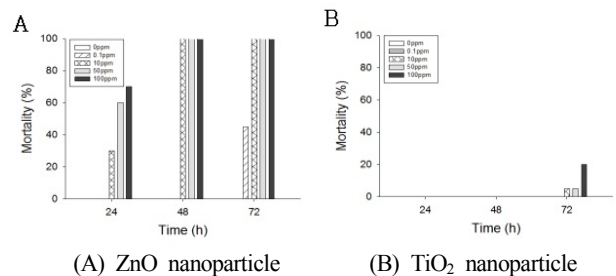


Fig. 5. Mortality rate of *D.magna* for Nanoparticle in M4 medium.

4. 결론

ZnO, TiO₂나노입자가 수생태계에 노출되어 생물종인 *D.magna*에 어떠한 영향을 미치는지 유영저해와 폐사율을 통해 살펴보았다. ZnO나노입자는 분말 상태에서 10~20 nm이었으나 M4배지에 첨가하였을 경우 약 70배 정도 증가하였으며, TiO₂나노입자는 분말상태에서 40 nm였지만, M4배지에 첨가하였을 경우 약40배 정도 증가한 것으로 나타났다. 고체상 입자가 극성 용액이나 전해질을 가진 용액 중에 존재하면 입자 표면이 하전을 띄게 되고, 표면전위와 반대부호인 용액안의 이온(일반적으로 쌍이온이라함)이 정전기적으로 표면에 끌려 응집 하게 된다(Lee and Suh, 2008). 따라서 이 연구에서는 나노입자가 고유의 물리적 특성인 작은 크기에서 비롯한 높은 표면에너지에 따라 용액 속에서 정전기적으로 응집이 된 것이라 생각된다. 이와 같은 결과는 앞으로 더 많은 연구를 통해 밝혀내야겠지만 나노물질이 수계에서 그 크

기를 유지하며 분산이 되는 것이 현실적으로 어렵다는 것을 제시하고 있다.

두 나노입자를 M4배지에 첨가한 후 *D.magna*의 유영저해와 폐사율을 살펴보았는데, 유영저해의 경우 ZnO와 TiO₂나노입자는 시간 및 농도가 증가할수록 *D.magna*의 유영에 큰 영향을 주는 것으로 보였다. 특히 ZnO나노입자의 경우 48시간이 경과되는 시점부터 10 ppm 이상 전 개체가 유영저해를 보였다. 폐사율의 경우 유영저해와 마찬가지로 시간 및 농도가 높아질수록 폐사되는 비율이 높아졌으며, TiO₂나노입자에 비해 ZnO나노입자에서 폐사되는 비율이 높았다. 이러한 결과는 같은 농도라도 TiO₂나노입자보다 ZnO나노입자가 영향이 큰 것으로 나타났다. Kim(2014)은 CuO나노입자의 용존 이온 농도가 반수영향농도(EC50) 값(44 μg L⁻¹ for 72 h)보다 매우 낮은 실험에서도 급성독성의 증가를 보였는데 이는 용존 이온이 아닌 나노입자의 영향으로 판단된다고 보고하였는데 본 연구의 ZnO의 이온독성에 고려한 영향과 달리 독성 메카니즘은 입자별로 다른 것으로 생각된다.

Kennedy et al.(2012)은 CuO나노입자의 경우, 노출시간이 증가할수록 응집이 계속적으로 증가하였으며, 응집되는 정도가 나노입자의 농도가 높을수록 급격히 일어나는 것을 확인할 수 있었고 이것은 나노입자의 농도가 높을수록 나노입자끼리 상호작용하는 빈도수가 높아져서 응집이 더 빨리 일어났기 때문이라고 판단하였다. 이는 나노입자의 응집크기가 용액성분에 따른 크기변화만이 아니라 노출 정도에 따라 그 크기가 상이하게 달라지며 그에 따른 영향도 달라질 수 있다는 것으로 볼 수 있다. 이에 농도에 따른 시간별 응집 크기의 변화를 알아보고 더불어 생물영향도 연구해 볼 가치가 있다고 생각된다.

본 연구에 사용한 *Daphnia magna*는 95%가 담수종인 시험생물로 해양환경에 관한 직접적인 영향을 제시 할 수는 없다. 하지만 나노입자의 특성상 용액 속에 존재하면 용액성분에 따라 응집 크기가 달라지는 것을 확인 할 수 있는데 이러한 특징은 수생태계의 여러 환경(담수와 기수, 해수 등)에 미치는 영향이 제각기 다를 것으로 예상된다. 따라서 기수해역과 해수에서의 영향을 국제기구의 대표적인 독성평가 시험종을 이용하여 해양생태계의 영향에 관한 나노입자 실험의 방향을 제시 할 수 있는 논문이라 생각된다. 현재까지의 연구는 단순히 생물독성에 관한 영향을 알아보았다면 앞으로는 이러한 영향의 독성 메카니즘과 먹이연쇄에 따른 나노입자의 생물농축에 관한 영향을 연구해 볼 수 있을 것이다.

Acknowledgments

'위 논문은 2014년도 정부(해양수산부) 재원으로 영남씨그랜트센터의 지원을 받아 수행된 연구임'

References

- [1] Kim, S. G.(2006), Bioassay of Industrial Effluent using the Water Flea(*Daphnia magna*) and Bioluminescent Bacteria (*Vibrio fischeri*), Hanyang university.
- [2] Kim, S. Y.(2014), Time-depement toxicity response of *Daphnia magna* exposed to CuO and ZnO nanoparticles, Korea university.
- [3] Kennedy, A. J., M. A. Chappell, A. J. Bednar, A. C. Rhan, J. G. Laird, J. K. Stanley and J. A. Steevens(2012), Impact of organic carbon on the stability and toxicity of fresh and stored silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 46:10772-10780
- [4] Franklin, N. M., N. J. Rogers, S. C. Apte, G. E. Batley, G. E. Gadd and P. S. Casey(2007), Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 41, pp. 8484-8490.
- [5] Hund-Rinke, k. and M. Simon(2006), Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles(TiO₂) on algae and daphnids, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, Vol. 13, pp. 225-232.
- [6] Hwang, E. T., J. I. Lee, B. I. Sang and M. B. Gu(2007), Toxicity Monitoring and Assessment of Nanoparticles Using Bacteria, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* Vol. 22, No. 6, pp. 414-420.
- [7] Iijima, M., M. Tsukada and H. Kamiya(2007), Effect of particle size on surface modification of silica nanoparticles by using silane coupling agents and their dispersion stability in methylethylketone, *J. Colloid Interf. Sci.*, Vol. 307, No. 2, pp. 418-424.
- [8] Lee, H. S. and Y. J. Suh(2008), Dispersion Stability of Nanofluids and Its Application, *KSFC*, Vol. 5, No. 3, pp. 30-37.
- [9] Nasu, A. and Y. Otsubo(2008), Effects of polymeric dispersants on the rheology and UV-protecting properties of complex suspensions of titanium dioxides and zinc oxides, *Vol. 326, No. 2*, pp. 92-97.
- [10] OECD(2010), Series on the safety of Manufactured Nanomaterials, *ENV/JM/MONO*, 46.
- [11] OECD(2004), OECD Guideline for Testing of Chemicals. '*Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test.'
- [12] Sillanpää, M., T. M. Paunu and P. Sainio(2011), Aggregation and deposition of engineered TiO₂ nanoparticles in natural fresh and brackish waters., *IOP Publishing*, Vol. 304. 012018.

- [13] Jeong, Y. G.(2009), Effect of Nano Particle on the Hatching rate of *Artemia* sp. Cyst Zooplankton, Journal of the Korean Society, Vol. 12, No. 4, pp. 302-306.
- [14] Warheit, D. B., W. J. Brock, W. J. Lee, K. P. Webb and K. L. Reed(2005), Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity, Toxicol. Sci., 88, pp. 514-524.
- [15] Wie, M. A., S. J. Oh, S. C. Kim, R. Y. Kim, S. P. Lee, W. I. Kim and J. E. Yang(2012), Toxicity assessment of silver ions compared to silver nanoparticles in aqueous solutions and soils using microtox bioassay, Korean J. Soil Sci. Fert., Vol. 45, No. 6, pp. 1114-1119.
- [16] Yang, R., Y. Liu, K. Wang and J. Yu(2003), Characterization of surface interaction of inorganic filters with silane coupling agents, Anal.Appl.Pyrol., Vol. 70, Issue 2, pp. 413-425.

원고접수일 : 2014년 08월 20일

원고수정일 : 2014년 10월 09일 (1차)

2014년 10월 21일 (2차)

게재확정일 : 2014년 10월 28일