

## 금나노 물질이 북방산개구리에 미치는 영향

김은지·고원배\*·한얼·김호진\*·고정원\*·정훈†

삼육대학교 동물자원학과

\*삼육대학교 융합과학과

## Effects of Gold Nanoparticles on eggs and tadpoles of *Rana dybowskii*

Eun Ji Kim·Weon Bae Ko\*·Eul Han·Ho Jin Kim\*·Jeong Won Ko\*·Hoon Chung†

Department of Animal Resource, Sahmyook University

\*Department of Convergence Science, Sahmyook University

(Received: 14 October 2015, Revised: 09 November 2015, Accepted: 09 November 2015)

### 요약

나노물질이 포함된 다양한 제품들이 증가하고 있으며, 나노물질의 수생태계 노출에 대해서는 불가피하다. 따라서 우리는 금나노입자를 이용하여 국내 다양한 습지 환경에 널리 서식하는 북방산개구리에 대한 독성평가(부화율, 바디컨디션, 행동학적민감도)를 해보았다. 행동학적 민감도는 포식자 회피반응 정도를 이용하여 Ethvision XT 9으로 측정하였다. 금나노입자에 대한 부화율과 STL의 독성은 나타나지 않았다. 하지만 금나노입자에 노출된 올챙이들은 외부자극에 대한 행동학적 민감도가 감소하였다. 이러한 결과는 실험대상 동물의 행동학적 특성을 이용한 새로운 독성평가 방식을 제시한다.

핵심어 : 금, 나노입자, 북방산개구리, 올챙이, 행동학적 독성평가

### Abstract

As the number of applications containing nanomaterials increase, aquatic ecosystem exposure to nanoparticles (NPs) is unavoidable. In this study, we carried out toxicity assessment to Au-nanoparticles(NPs) of *Rana dybowskii* eggs and tadpoles. Toxicity was recorded hatching rate, body condition(Snout-tail length, STL), and behavioral sensitivity. Behavioral sensitivity was analyzed to anti-predator behavior using Ethovision XT 9. Au-NPs did not show any toxicity of hatching rate and STL. But, Tadpoles exposed to Au-NPs decrease behavioral sensitivity of stimuli. This study has value of environmental toxicity evaluation because these results show the new way of toxicity assessment

Key words : behavior toxicity assessment, gold, nanoparticles, *Rana dybowskii*, tadpole

## 1. 서 론

최근 나노물질에 대한 다양한 연구를 통한 기술 발전으로 지난 6년간 나노산업은 매우 빠르게 성장하였다(Truong et al., 2012a). 실제로 우리 주변에 나노물질이 포함된 소비제품들은 1,000여개 이상으로 알려져 있다. 이러한 나노제품들이 증가함에 따라 불가피하게 제조, 사용, 및 처리 하는 과정 중에 환경으로 유출될 가능성이 부각되고 있다(Lee and An, 2010; Scholars et al., 2011; Zhu et al., 2010).

지금까지 나노물질에 대한 독성영향은 다양한 신규 연구를 통해 보고 되어왔다(Bermudez et al., 2004; Febrega et al., 2011; Heinlaan et al., 2008; Hu et al., 2010; Hussain et al., 2005; Jani et al., 1994; Kisin et al.,

2007; Long et al., 2006; Mayer et al., 2010; Oberdorster, 2004; Rodea-Palomares et al., 2011).

2010년 12월 금나노입자는 경제협력기구(Organization for Economic Cooperation and Development: OECD)의 제조나노물질작업반(Working Party on Manufactured Nanomaterials: WPMN) 합성나노물질 목록에 신규물질로 포함되었다(OECD 2010).

금나노입자는 화장품, 의료분야, 페인트 제품 등 다양한 분야에서 사용되어지며, 특히 의학 분야에서 주로 사용되고 있다(Geffroy et al., 2012; Huang et al., 2009; Perreault et al., 2012). 현재 금나노입자에 대한 연구는 활발하게 이루어지고 있으나 대부분 개발산업과 관련된 것이다. 하지만 최근 환경문제와 더불어 생태계 나노독성에 관련된 연구의 필요성이 부각되고 있다. 특히 수중생태계는 나노물질에 의해 영향을 받을 수 있는 취약지역으로 많은 연구가 필요하지만 금나노입자에 대한 수중생태계의 모니터링 연구는 매

† To whom correspondence should be addressed.  
Department of Animal Resource, Sahmyook University  
E-mail: chung@syu.ac.kr

우 부족하다. 나노독성에 대한 환경 연구는 주로 수증생태계 모델링 자료를 통한 예측에 관련된 것들이다(Boxall et al., 2007).

선행 연구들에 의하면 금나노입자는 어류(Asharani et al., 2011; Barllan et al., 2009; Browning et al., 2009; Farkas et al., 2010; Geffroy et al., 2012; George et al., 2011; Harper et al., 2008, 2011; Truong et al., 2012a, 2012b; Zhu et al., 2010), 물벼룩(Lee and Ranville, 2012; Li et al., 2010; Lovern et al., 2008), 홍합(Tedesco et al., 2008, 2010a, 2010b), 녹조류(Perreault et al., 2012, 2014; Renault et al., 2008; Van Hoecke et al., 2013), 그리고 박테리아(Perreault et al., 2012b)에서 이루어졌다. 하지만 이러한 연구들은 모두 치사영향에 관한 연구들로 실제 수증생태계 생물들에게 적용하는 것은 무리가 있다. 우리는 금나노입자 노출에 따른 행동학적 근거를 토대로 국내에 광범위한 수증생태계에 서식하고 있는 북방산개구리 알의 부화율과 유생의 행동변화에 따른 생존가능성에 대해 알아보고자 한다.

## 2. 연구방법

### 2.1 채집장소 및 사육

본 실험은 한국의 다양한 환경에서 흔하게 서식하는 양서류 중 하나인 북방산개구리 *Rana Dybowskii*를 대상으로 하였다(Yang et al., 2001). 실험에 사용된 모든 알은 2015년 3월 초에 서울특별시 노원구 불암산의 웅덩이와 서울특별시 종로구 인왕산의 계곡에서 채집하였다(Fig 1).

발생이 시작되지 않은 알덩이들을 구별하여 채집하였으며, 채집된 알덩이들은 각 알덩이 별로 분리하여 3L의 염소가 제거된 플라스틱수조(60cm×25cm×25cm)에서 관리하였다. 플라스틱 수조는 산소발생기를 이용하여 산소를

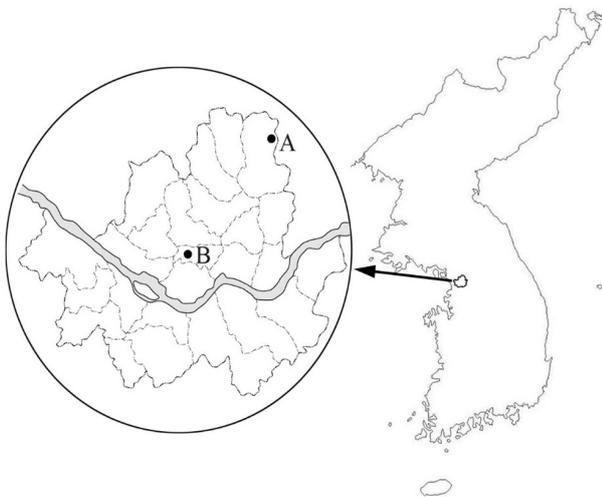


Fig. 1. Map of eggs collection(A: Bul-am Mountain, 37° 38' ~ 26.7' N, 127° 06' ~ 00.5' E, B: In-wang Mountain, 37° 35' ~ 58.0' N, 126° 58' ~ 09.3' E).

주입해 주었으며, 수온을 18~20°C로 유지하였다. 낮과 밤의 주기는 자연상태와 동일하게 맞추어 주었다. 부화 후 유생들에게는 매일 2번 Tetra Bits(Tetra, Melle, Germany)을 충분히 급여하였다.

### 2.2 나노입자 합성

금나노 입자를 합성하기 위해 Seed Solution, Growth Solution을 이용하였다.Growth Solution은 15ml 증류수에 Potassium gold(II) chloride(KAuCl<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich), Cetyltrimethyl ammonium bromide((C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Br, Samchun Chemicals), Ascorbic acid(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, Sigma-Aldrich)를 섞고 Seed Solution은 5ml 증류수에 Potassium gold(II) chloride(KAuCl<sub>4</sub>), Trisodiumcitrate dehydrate (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O, Samchun Chemicals), Sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>, Kanto Chemical Co., Inc)를 넣고 혼합하였다.Growth solution 9ml와 Seed solution 1ml에 섞어 주었다.그 후, 자석교반기를 이용하여 15분동안 저어주며, 용액의 색이 어두운 적색이 되는지 확인한 후 실험에 사용하였다(Fig 2).

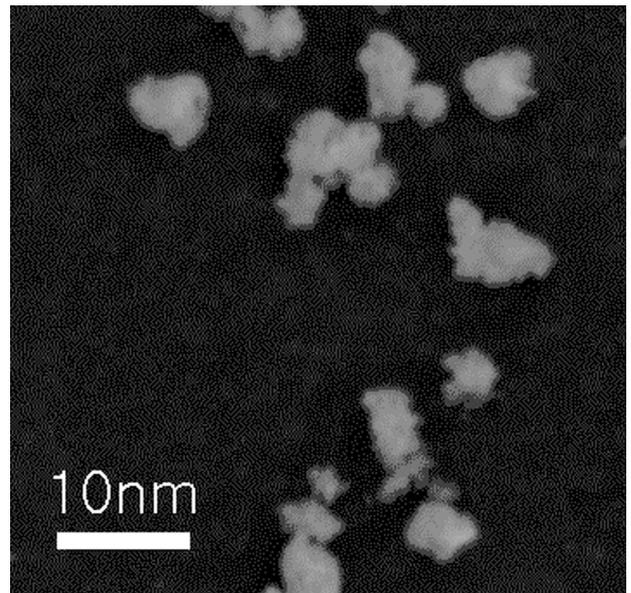


Fig. 2. SAM image of Au-NPs(7.5 ± 1.1nm).

### 2.3 부화율과 body condition

금나노입자는 농도에 따라 총 4개의 그룹(0, 1, 50, 100 µg/ml)으로 나누었다(Asharani et al., 2011). 알덩이에서 400개의 알을 무작위로 선택하여, 40개의 플라스틱 수조(20cm×13cm×13cm)에 10개씩 나누어 사육하였다. 40개의 수조를 농도마다 10개씩 나누어 분류한 농도의 금나노입자 수용액을 500ml씩 넣어주었다. 각 플라스틱 수조간 수온 차이에 의한 배아의 발생과정 차이가 발생할 수 있기 때문에 실험에 사용된 모든 플라스틱 수조간의 수온 차이를 최소화 하기 위하여 물이 들어있는 큰 탱크(120cm×45cm×60cm)에 넣어 물위에 띄운 증탕방식을 이용하였다(Fig 3).

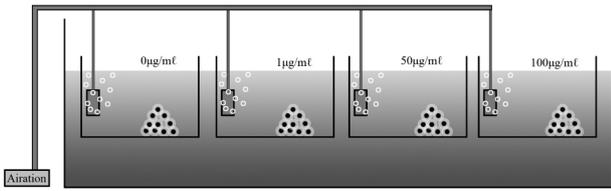


Fig. 3. Site of experimental test

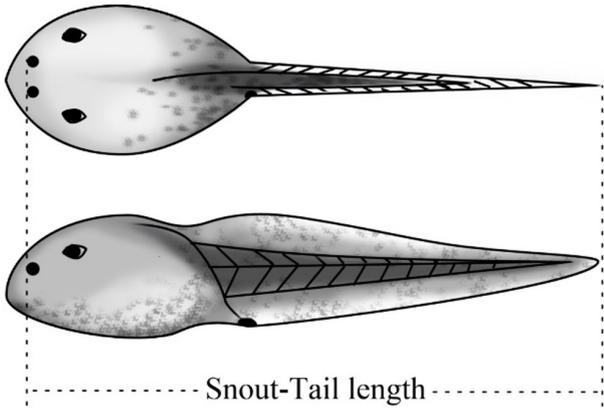


Fig. 4. STL of *Rana dybowskii* tadpole

자연상태에서의 알 상태와 최대한 유사하게 하기 위해 알을 싸고 있는 우무질은 제거하지 않고 그대로 실험하였다. 알 상태에서의 독성평가를 위해 알의 부화율과 부화 후 24시간 후의 유생의 snout-tail length(STL)를 디지털 버니어캘리퍼스(Mitutoyo CD-20CPS)로 측정하였으며, STL은 유생의 코가 위치한 곳부터 항문이 위치한 곳까지의 거리를 의미한다(Fig4). 부화에 성공한 개체는 부화 후 12시간 후의 정상적인 움직임이 가능한 개체만을 기록하였다. 부화에 성공하였지만 외부 자극에 대한 반응이 현저히 떨어지거나 정상적인 유영이 불가능하여 먹이활동을 할 수 없는 개체는 부화에 성공하지 못한 것으로 간주하여 기록하지 않았다. 부화율은 전체 알 수와 부화에 성공한 알 수의 비율로 계산하였다.

2.4 행동분석

실험에 사용된 유생들 중 금나노입자에 노출되지 않았던 유생들과 금나노입자에 노출된 경험이 있는 유생들 중 각각 50마리씩 무작위로 선택하여 플라스틱수조 (30cm×20cm×25cm, 2.5L)에서 120시간 동안 사육하였다. 처음 24시간 동안은 금나노입자에 노출되지 않은 유생은 금나노입자가 들어있지 않은 상수도에 두었고, 금나노입자에 노출된 경험이 있는 유생들은 금나노입자 100µg/mL농도에 두었다. 그 후 96시간은 두 그룹 모두 금나노입자가 들어있지 않은 일반 상수도에서 사육하였다. 이는 행동분석 시 일반 염소가 제거된 상수도에서 이루어질 때 발생할 수 있는 유생들의 쇼크를 방지하기 위함이다. 부화 5일 후, 선행연구에서 사용된 프로토콜을 적용하여 유생들을 관찰하였다(Chivers and Mirza 2001; Ferrari et al., 2007b, c; Mathis et al., 2008, Ferrari et al., 2008b). 금나노입자에

노출된 그룹과 금나노입자에 노출되지 않은 그룹의 올챙이들 중 그룹 마다 무작위로 50마리를 선택하여 개체마다 300ml염소를 제거한 상수도 500ml가 들어있는 플라스틱 컵(10cm(직경)×15cm)으로 옮겨45분간 안정을 취하게 하였다. 안정기간이 끝나고 4분 후에 포식자 큐 5ml를 주입하였다. 포식자 큐는 올챙이 알을 채집했던 웅덩이에서 채집한 왕잠자리수채를 사용하였다. 왕잠자리 수채는 일반적으로 양서류 유생의 포식자로 잘 알려져 있다(Kim et al., 2011) 실험에 사용한 왕잠자리수채는 5일 이상 북방산개구리 유생을 먹이로 포식한 개체이다. 포식자 큐를 제작하기 위해서 행동실험을 하기 24시간 전에 2L의 염소가 제거된 상수도에 왕잠자리 수채를 넣고, 그 물을 사용하였다. 또한 포식자 큐 주입에 대한 유생의 영향을 최소화 하기 위하여 포식자 큐는 주사기를 이용하여 플라스틱 컵 벽면을 따라 천천히 주입해 주었다. 포식자 큐 주입을 기준으로 주입 전 4분(포식자 위협이 없는 안정적인 상태)과 주입 후 4분(포식자 위협에 따른 회피반응 상태)동안의 행동을 녹화 하였으며, 포식자 큐가 주입되는 30초 동안은 포식자 인식기간으로 설정하여 기록하지 않았다. 또한 행동실험이 끝난 모든 개체들의 STL은 디지털 버니어캘리퍼스를 사용하여 측정하였다.

2.5 데이터 분석

우리는 노출된 농도에 따른 배아의 부화율, 부화 직후 유생들의 STL을 비교하기 위해 일원배치분산분석과 LSD 사후검증을 이용하였다. 금나노입자에 노출된 유생들과 그렇지 않은 유생들간의 부화 5일 째 STL을 비교하기 위하여 독립 t-test를 사용하였다 올챙이들의 포식자 큐 노출 전후의 이동거리 비교는 대응 표본 t-test를 사용하였고, 금나노입자에 노출되지 않은 유생들의 포식자 큐 노출 전후의 이동거리차이와 금나노입자에 노출된 경험이 있는 유생들의 포식자 큐 노출 전후의 이동거리 차이간의 비교는 독립 t-test를 사용하였다. 모든 통계적 분석은 SPSS Ver. 21.0(SPSS, Chicago, IL, U.S.A)을 사용하여 분석하였다. 포식자 큐 노출 전과 노출된 후의 이동거리측정은 Ethovision XT 9(Noldus Information Technology, Netherlands)을 사용하였다(Fig 5).

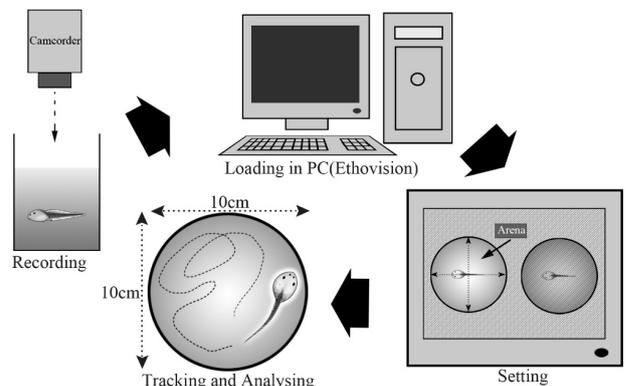


Fig. 5. Diagram of an Ethovision setup.

### 3. 결 과

금나노입자에 노출되지 않은 0 $\mu$ g과 비교하여 1, 50, 100 ( $\mu$ g/mL)농도의 금나노입자에 노출된 북방산 개구리 알들은 50 $\mu$ g 그룹에서 85%로 상대적으로 높은 부화율을 보였지만 유의성이 나타나지는 않았다(1 $\mu$ g:  $p=0.87$ , 50 $\mu$ g:  $p=0.74$ , 100 $\mu$ g:  $p=0.62$ , Fig 6). 부화 직후 유생의 STL은 0 $\mu$ g에서 8.6710 $\pm$ 0.3387mm였으며 100 $\mu$ g 그룹에서 8.5770 $\pm$ 0.2346mm으로 나타났다. 농도가 높을수록 유생의 STL이 작아지는 경향이 있었지만, 통계적 유의성은 없었다(1 $\mu$ g:  $p=0.83$ , 50 $\mu$ g:  $p=0.73$ , 100 $\mu$ g:  $p=0.12$ , Fig 7). 부화 후 5일된 금나노입자에 노출된 유생들의 STL(15.8510 $\pm$ 2.1662mm)은 금나노입자에 노출되지 않은 유생들의 STL (14.7860 $\pm$  2.1057mm)과 비교하여 유의하게 작은 것으로 나타났다(Fig 8).

포식자 큐에 노출되기 전과 포식자 큐에 노출된 후의 움직인 거리는 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(0 $\mu$ g:  $t=-4.18$ ,  $p<0.0001$ , 100 $\mu$ g:  $t=-2.02$ ,  $p<0.04$ , Fig 9). 포식자 큐에 대한 움직인 거리의 차이는 금나노입자에 노출된 그룹(28.6540 $\pm$ 14.1731cm)이 금나노입자에 노출되지 않은 그룹(73.9191 $\pm$ 17.6473cm)과 비교하여 유의하게 작은 것으로 나타났다( $t=2.0$ ,  $p<0.04$ , Fig 9).

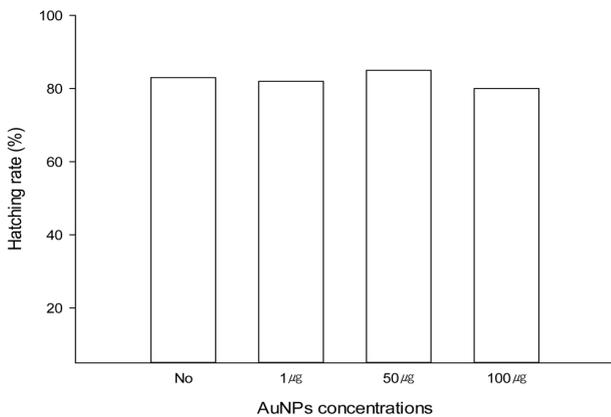


Fig. 6. Hatching rate changes according to AuNPs exposure concentrations.

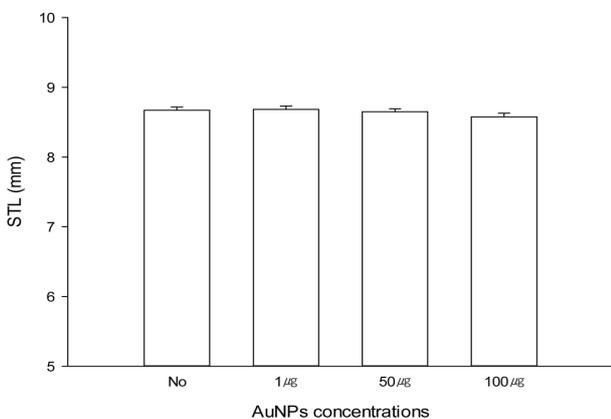


Fig. 7. STL(Mean  $\pm$  SE) change after hatching 12h according to AuNPs exposure concentrations.

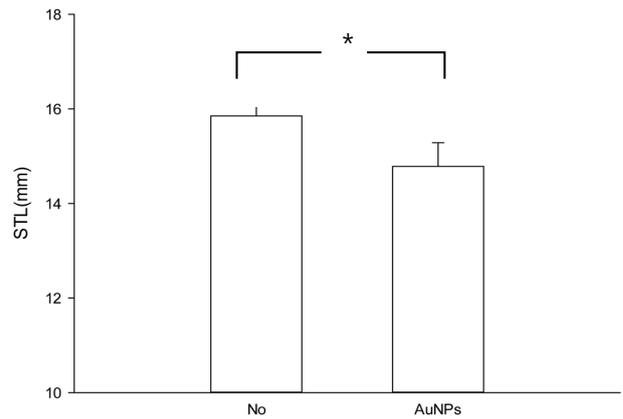


Fig. 8. STL(Mean  $\pm$  SE) change after hatching 5 days according to AuNPs exposure. Asterisk indicate statistically significant between the means .

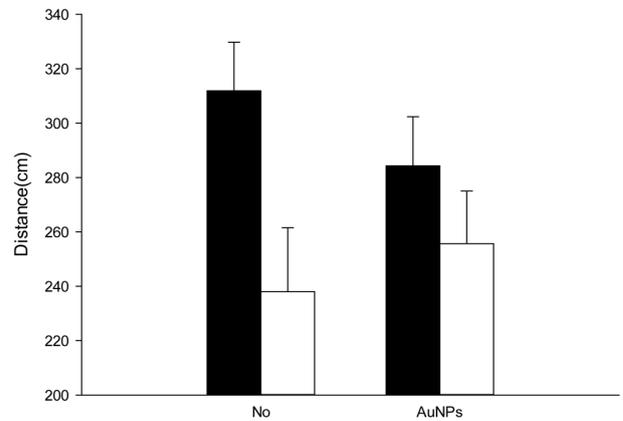


Fig. 9. Total distance (Mean  $\pm$  SE) change to AuNPs exposure. The solid bar is pre-stimulus and empty bar is post-stimulus. Asterisk indicate statistically significant between the means

### 4. 고 찰

우리는 금나노입자의 생물영향평가를 위해 농도별 금나노입자에 노출된 북방산 개구리 배아의 부화율과 부화 12 시간 후 STL 평균을 비교, 분석한 결과 통계적 유의성을 발견하지 못했다. 즉, 실험에서 사용된 농도의 금나노입자는 북방산개구리 배아의 부화율과 부화 12시간 후 유생의 STL에 영향을 주지 않는다고 할 수 있다. Asharani et al., (2011)은 금나노 입자의 크기에 따른 독성 차이를 알아보기 위하여 0, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu$ g/mL 농도의 금나노입자에 *D. rerio* 수정란을 부화 시킨 결과 금나노 농도 증가에 따른 유의한 부화율과 유생의 치사율의 변화를 발견하지 못했다. 또한 토끼를 이용한 in vitro 실험에서도 별다른 독성이 나타나지 않았다(BaKri et al., 2008). 이러한 연구 결과는 금나노입자가 다른 나노물질들에 비하여 독성이 매우 낮다는 측면에서 비슷하다고 할 수 있으며, 더불어 최근 연구결과들은 금나노입자가 배아에 대한 독성이 거의 없다는 것을 보여주고 있다(Bar-Ilán et al., 2009).

본 연구결과에 의하면 금나노입자에 노출되기 전의 활동

량에서 금나노이온에 노출된 그룹과 그렇지 않은 그룹간의 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만 금나노입자에 노출되지 않은 그룹의 유생들과 노출된 유생의 그룹간에는 포식자 큐에 대한 활동량 감소에 유의한 차이가 나타났다. 즉, 금나노입자는 북방산개구리 유생의 외부자극이 없을 때 일반적인 상황에서 활동량에는 영향을 주지 않지만, 포식자(외부자극)에 대한 회피반응 정도에 부정적 영향을 미치는 것으로 보인다. 이는 우리가 사용한 외부자극에 대한 행동학적 반응평가 방법을 테스트 하지 않았더라면 발견하지 못했을 금나노입자 노출 유무에 따른 차이이다.

일반적으로 양서류들은 유생시기를 수중에서 보낸다. 이 시기는 수중생태계 먹이사슬에서 낮은 지위를 가지는 시기로서 많은 포식자들을 피해 생존해야 한다. 생존율을 높이기 위해 양서류 유생들은 독특한 생활사 전략을 가지는데, 그 중 한가지가 포식자를 만났을 경우 포식자가 사라질 때까지 활동량을 감소시켜 회피하는 방법이다(Chivers and Mirza, 2001). 이는 수중 생활을 하는 양서류 유생들의 생존을 결정하는 중요한 행동학적 전략이다. 이러한 회피반응에 문제가 생긴다면 양서류 유생의 생존가능성은 낮아질 수 밖에 없다. 따라서 우리의 행동학적 독성평가방법이 매우 의미 있다고 생각한다.

지금까지 나노물질들의 생물 독성평가에 대한 연구들은 부화율, 치사율, 기형율, 장기내축적율등과 같은 치사영향평가 연구가 대부분이었다. 이러한 기존의 독성평가에 따르면 금나노입자는 다른 나노물질들에 비해 거의 독성이 없는 물질이라고 평가되기 때문에 다양한 분야에서 널리 사용될 수 있었다 (Bar-Ilan et al., 2009). 본 연구에서도 비슷한 결과를 보여주었다. 하지만 우리가 새롭게 제시한 유생의 생존가능성을 예측평가 해볼 수 있는 외부자극에 대한 행동학적 반응평가에서는 독성이 거의 없다는 기존의 연구 결과들과는 다른 결과를 보여주었다. 따라서 우리가 제시한 새로운 평가방법이 기존의 평가방법들과 함께 적절하게 이루어 진다면 앞으로의 생물독성평가 신뢰도를 더욱 높일 수 있을 것이라고 생각한다.

## Reference

- Asharani, PV, Lianwu, YI, Gong, Z and Valiyaveetil, S (2011). Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology*, 5(1), pp, 43-54.
- Bakri, SJ, Pulido, JS, Mukherjee, P, Marler, RJ and Mukhopadhyay, D (2008). Absence of histologic retinal toxicity of intravitreal nanogold in a rabbit model. *Retina*, 28, pp, 147-149.
- Bar-Ilan, O, Albrecht, RM, Fako, VE and Furgeson, DY (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small*, 5(16), pp, 1897-1910.
- Bermudez, E, Mangum, JB, Wong, BA, Asgharian, B, Hext, PM, Warheit, DB and Everitt, JI (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicological sciences*, 77(2), pp, 347-357.
- Boxall, AB, Chaudhry, Q, Sinclair, C, Jones, A, Aitken, R, Jefferson, B and Watts, C (2007). Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Central Science Laboratory, Department of the Environment and Rural Affairs, London, UK.
- Browning, LM, Lee, KJ, Huang, T, Nallathamby, PD, Lowman, JE and Xu, XHN (2009). Random walk of single gold nanoparticles in zebrafish embryos leading to stochastic toxic effects on embryonic developments. *Nanoscale*, 1(1), pp, 138-152.
- Chivers, DP and Mirza, RS (2001). Importance of predator diet cues in responses of larval wood frogs to fish and invertebrate predators. *J. of chemical ecology*, 27(1), pp, 45-51.
- Fabrega, J, Luoma, SN, Tyler, CR, Galloway, TS and Lead, JR. (2011). Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment international*, 37(2), pp, 517-531.
- Farkas, J, Christian, P, Urrea, JAG, Roos, N, Hassellöv, M, Tollefsen, KE and Thomas, KV (2010). Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 96(1), pp, 44-52.
- Ferrari, MC, Messier, F and Chivers, DP (2007a). Degradation of chemical alarm cues under natural conditions: risk assessment by larval woodfrogs. *Chemoecology*, 17(4), pp, 263-266.
- Ferrari, MC, Messier, F and Chivers, DP (2007b). First documentation of cultural transmission of predator recognition by larval amphibians. *Ethology*, 113(6), pp, 621-627.
- Ferrari, MC, Messier, F and Chivers, DP (2008). Larval amphibians learn to match antipredator response intensity to temporal patterns of risk. *Behavioral Ecology*, 19(5), pp, 980-983.
- Geffroy, B, Ladhar, C, Cambier, S, Treguer-Delapierre, M, Brèthes, D and Bourdineaud, JP (2012). Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology*, 6(2), pp, 144-160.
- George, S, Xia, T, Rallo, R, Zhao, Y, Ji, Z, Lin, S, Wang, X, Zhang, H, France, B, Schoenfeld, D, Damoiseaux, R, Liu, R, Lin, S, Bradley, K, Cohen, Y and Nel, AE (2011). Use of a high-throughput screening approach coupled with in vivo zebrafish embryo screening to develop hazard ranking

- for engineered nanomaterials. *ACS nano*, 5(3), pp, 1805–1817.
- Harper, S, Usenko, C, Hutchison, JE, Maddux, BLS and Tanguay, RL (2008). In vivo biodistribution and toxicity depends on nanomaterial composition, size, surface functionalisation and route of exposure. *J. of Experimental Nanoscience*, 3(3), pp, 195–206.
- Harper, SL, Carriere, JL, Miller, JM, Hutchison, JE, Maddux, BL and Tanguay, RL (2011). Systematic evaluation of nanomaterial toxicity: utility of standardized materials and rapid assays. *ACS nano*, 5(6), pp, 4688–4697.
- Heinlaan, M, Ivask, A, Blinova, I, Dubourguier, HC and Kahru, A (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71(7), pp, 1308–1316.
- Hu, CW, Li, M, Cui, YB, Li, DS, Chen J and Yang, LY (2010). Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), pp, 586–591.
- Huang, X, Neretina S and El-Sayed, MA. (2009) Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Advanced Materials*, 21(48), pp, 1–31.
- Hussain, SM, Hess, KL, Gearhart, JM, Geiss, KT and Schlager, JJ. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19(7), pp, 975–983.
- Jani, PU, McCarthy, DE and Florence, AT (1994). Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International J. of pharmaceuticals*, 105(2), pp, 157–168.
- Kim, EJ, Park, YS, Kim, DB, Jeon, MA and Chung, H (2011). The study of Predator to Korean Salamander. *J. of Natural Science*, 15(1), pp, 23–26. [Korean Literature]
- Kisin, ER, Murray, AR, Keane, MJ, Shi, XC, Schwegler–Berry, D, Gorelik, O, Arepalli, S, Castranova, V, Wallace, WE, Kagan, VE and Shvedova, AA (2007). Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J. of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70(24), pp, 2071–2079.
- Lee, BT and Ranville, JF (2012). The effect of hardness on the stability of citrate-stabilized gold nanoparticles and their uptake by *Daphnia magna*. *J. of hazardous materials*, 213–214, pp, 434–439.
- Lee, WM and An, YM (2010). Review Paper: Research Trends of Ecotoxicity of Nanoparticles in Water Environment. *J. of Korean Society on Water Environment*, 28(3), pp, 313–319. [Korean Literature]
- Li, T, Albee, B, Alemayehu, M, Diaz, R, Ingham, L, Kamal, S, Rodriguez, M and Bishnoi, SW (2010). Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag–Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(2), pp, 689–700.
- Long, TC, Saleh, N, Tilton, RD, Lowry, GV and Veronesi, B (2006). Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environmental Science & Technology*, 40(14), pp, 4346–4352.
- Lovern, SB, Owen, HA, and Klaper, R (2008). Electron microscopy of gold nanoparticle intake in the gut of *Daphnia magna*. *Nanotoxicology*, 2(1), pp, 43–48.
- Mathis, A, Ferrari, MC, Windel, N, Messier, F and Chivers, DP (2008). Learning by embryos and the ghost of predation future. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1651), pp, 2603–2607.
- Meyer, JN, Lord, CA, Yang, XY, Turner, EA, Badireddy, AR, Marinakos, SM, Chilkoti, A, Wiesner, MR and Auffan, M (2010). Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquatic toxicology*, 100(2), pp, 140–150.
- Oberdörster, E (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental health perspectives*, 112(10), pp, 1058–1062
- OECD (2010). *Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 27: List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials: Revision*.
- Perreault, F, Bogdan, N, Morin, M, Claverie, J and Popovic, R (2012). Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes. *Nanotoxicology*, 6(2), pp, 109–120.
- Perreault, F, Melegari, SP, Fuzinato, CF, Bogdan, N, Morin, M, Popovic, R and Matias, WG (2014). Toxicity of pamam-coated gold nanoparticles in different unicellular models. *Environmental toxicology*, 29(3), pp, 328–336.
- Renault, S, Baudrimont, M, Mesmer–Dudons, N, Gonzalez, P, Mornet, S and Brisson, A (2008). Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*). *Gold bulletin*, 41(2), pp, 116–126.
- Rodea–Palomares, I, Boltes, K, Fernández–Piñas, F, Leganés, F, García–Calvo, E, Santiago, J and Rosal, R (2011). Physicochemical characterization and ecotoxicological assessment of CeO<sub>2</sub> nanoparticles using two aquatic microorganisms. *Toxicological Sciences*, 119(1), pp, 135–145.

- Scholars, W.W.I.C.F. PEW (2011). *Project on Emerging Nanotechnologies*, Woodrow Wilson International Center for Scholars, Project on Emerging Nanotechnologies, Washington, DC.
- Tedesco, S, Doyle, H, Blasco, J, Redmond, G and Sheehan, D (2010a). Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(2), pp, 167–174.
- Tedesco, S, Doyle, H, Blasco, J, Redmond, G and Sheehan, D (2010b). Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 100(2), pp, 178–186.
- Tedesco, S, Doyle, H, Redmond, G and Sheehan, D (2008). Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine environmental research*, 66(1), pp, 131–133.
- Truong, L, Saili, KS, Miller, JM, Hutchison, JE and Tanguay, RL (2012a). Persistent adult zebrafish behavioral deficits results from acute embryonic exposure to gold nanoparticles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(2), pp, 269–274.
- Truong, L, Zaikova, T, Richman, EK, Hutchison, JE and Tanguay, RL (2012b). Media ionic strength impacts embryonic responses to engineered nanoparticle exposure. *Nanotoxicology*, 6(7), pp, 691–699.
- Van Hoecke, K, De Schampelaere, KAC, Ali, Z, Zhang, F, Elsaesser, A, Rivera-Gil, P, Parak, WJ, Smagghe, G, Howard, CV and Janssen, CR. (2013). Ecotoxicity and uptake of polymer coated gold nanoparticles. *Nanotoxicology*, 7(1), pp, 37–47.
- Yang, SY, Kim, JB, Min, MS, Suh, JH and Kang YJ(2001). *Monograph of Korean Amphibia*. Academi Publisher, Seoul, Korea.
- Zhu, ZJ, Carboni, R, Quercio, MJ, Yan, B, Miranda, OR, Anderton, DL, Arcaro, KF, Rotello, VM and Vachet, RW (2010). Surface properties dictate uptake, distribution, excretion, and toxicity of nanoparticles in fish. *Small*, 6(20), pp, 2261–2265.