

다양한 씨앗의 발아 및 발아지수에 근거한 나노입자 생물학적 독성평가

구본우, 이민경, 석우도, 공인철*

영남대학교 환경공학과
712-749 경북 경산시 대동 214-1

(2015년 1월 13일 접수; 2015년 2월 11일 수정본 접수; 2015년 3월 2일 채택)

Bioassessment of Nanoparticle Toxicity based on Seed Germination and Germination Index of Various Seeds

Bon Woo Gu, Min Kyeong Lee, Yu Tao Shi, and In Chul Kong*

Department of Environmental Engineering, Yeungnam University
214-1 Dae-dong, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 712-749, Korea

(Received for review January 13, 2015; Revision received February 11, 2015; Accepted March 2, 2015)

요 약

본 연구에서는 다섯 종의 씨앗(춘채, 아욱, 양배추, 배추, 당근)을 이용하여 금속산화물 나노입자(CuO, NiO, Fe₂O₃, Co₃O₄, TiO₂, ZnO)들이 씨앗발아와 발아지수에 미치는 영향을 조사하였다. CuO, ZnO, NiO 나노입자는 씨앗 활성에 뚜렷한 독성 영향을 나타내었으며, 나노입자종류에 따라 상이한 민감도를 나타내었다. 각 나노입자에 대한 독성순서(EC₅₀ 범위)는 다음과 같다: CuO 6~27 mg/L > ZnO 16~86 mg/L > NiO 48~112 mg/L. 나머지 조사 대상 나노입자인 Co₃O₄, TiO₂, Fe₂O₃은 최대 1,000 mg/L 높은 농도 노출에도 뚜렷한 영향을 나타내지 않았다. 씨앗별 상이한 민감도를 나타내었으며, 가장 민감한 종인 아욱의 씨앗발아 EC₅₀은 CuO 5.5 mg/L ZnO 16.4 mg/L, NiO 53.4 mg/L로 조사되었다. 씨앗별 나노입자에 대한 독성 영향은 CuO > ZnO > NiO > Fe₂O₃ ≈ Co₃O₄ ≈ TiO₂ 나타났으나, 당근씨앗은 NiO [EC₅₀ 80.4(71.41~90.54) mg/L]와 ZnO [EC₅₀ 85.8(69.31~106.29) mg/L]가 유사한 독성을 나타내었다.

주제어 : 나노입자, 씨앗발아, 발아지수, 독성영향

Abstract : This study investigated the effects of six metal oxide nanoparticles (NPs: CuO, NiO, TiO₂, Fe₂O₃, Co₃O₄, ZnO) on seed germination and germination index (G.I) for five types of seeds: *Brassica napus* L., *Malva verticillata* L., *Brassica oleracea* L., *Brassica campestris* L., *Daucus carota* L. NPs of CuO, ZnO, NiO show significant toxicity impacts on seed activities [CuO (6-27 mg/L), ZnO (16-86 mg/L), NiO (48-112 mg/L)], while no significant effects were observed at > 1000 mg/L of TiO₂, Fe₂O₃, Co₃O₄. Tested five types of seed showed different sensitivities on seed germination and root activity, especially on NPs of CuO, ZnO, NiO. *Malva verticillata* L. seed was highly sensitive to toxic metal oxide NPs and showed following EC₅₀s : CuO 5.5 mg/L, ZnO 16.4 mg/L, NiO 53.4 mg/L. Mostly following order of toxicity was observed, CuO > ZnO > NiO > Fe₂O₃ ≈ Co₃O₄ ≈ TiO₂, where slightly different toxicity order was observed for carrot, showing CuO > NiO ≈ ZnO > Fe₂O₃ ≈ Co₃O₄ ≈ TiO₂.

Keywords : Nanoparticles, Seed germination, Germination index, Toxicity

1. 서 론

Nano meter(나노미터)의 줄임말인 나노(nano)는 “아주 작은”을 의미하며 대략 머리카락 두께의 약 1/50,000에 해당하는 크기 정도이다. 나노입자(nanoparticles, NPs)를 이용한 기술은

단순히 매우 작은 입자의 특징 뿐 아니라, 나노 크기로 제조하였을 때 일반크기 물질과는 다른 새로운 성질을 이용하는 것이 나노물질에 대한 기술 특징이다. 나노기술은 21세기 나노 기술 자체로서 현대기술의 최고봉을 차지한다고 할 수 있으며, 또한 많은 타분야 기술의 근간을 이루고 있다. 많은 미래 기술

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ickong@ynu.ac.kr <http://cleantech.or.kr/ct/>

doi: 10.7464/ksct.2015.21.1.039 pISSN 1598-9712 eISSN 2288-0690

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

분야(화학, 물리, 생물, 공학 등)에서는 특수한 특성을 나타내는 보다 작은 나노세계로 접근하지 않고는 기술 발전을 이룰 수 없을 것이다. 생활 속에 얼마나 많은 나노기술이 이용되고 있는지를 확인해 보면 나노기술의 중요성 및 발전을 확인할 수 있을 것이다[1]. 현재 및 미래사회의 나노기술을 활용한 상품들로는 나노소재 섬유, 테니스라켓, 공, 유리코팅, 금속부식 방지용제, 자외선 차단제, 항세균 분진, 의료용구, 화장품, 공기정화 시스템, 초용량 컴퓨터, 항암물질, 무공해 엔진, 약물 전달체 등 매우 다양한 사용처를 예로 들 수 있다[2].

환경에 유입된 NPs는 동일 성질의 큰 입자들과는 달리 수생 또는 육생, 인간 건강 및 생태계에 상이한 영향을 미칠 수 있다. 특히 인체에 노출되는 경우에는 체내 깊숙한 곳까지 침투하여 침착이 가능하므로 심혈관 등의 질환에 영향을 미칠 수 있고, 특히 코 신경을 통해 침투된 NPs는 혈액에 의해 체내에서 이동이 가능하므로 뇌 손상에까지 영향을 주는 것으로 알려져 있다[3]. 향후 NPs의 사용량은 계속 증가할 것이며, 이로 인하여 생태계 및 인체에 노출되는 양 역시 증가할 것이다. 따라서 환경 노출 NPs에 대한 위해성 평가는 다양한 분야에서 필수적으로 고려되어야 할 것이다. 나노입자는 기존 이온상태의 화학물질과는 입자의 특성이 다른 관계로 기존의 연구와 달리 다각적인 관점의 연구가 진행되어야 할 것이다. 하지만 환경 내 노출량의 정량 평가 등이 난해하기 때문에 노출 농도 및 올바른 실험 조건 설정 등이 문제점으로 제기되고 있다. 그러나 분석방법 개발로 기초연구인 위해요소 확인과 나노입자의 특성에 의한 생태 및 인체 독성에 대한 연구가 점차 발전 진행되고 있다[3].

생물검정법(bioassay)은 독성 물질에 대한 생물의 반응 및 변화를 결과를 근거로 하여 오염물이 생태계에 미치는 위해성을 결정하기 위한 중요한 정보를 제공한다. 화학적 방법에 비해 측정 및 분석의 편리성, 시간 단축 및 비용의 저렴성 등의 장점이 있으며, 무엇보다도 오염물에 대한 생물이용성(bioavailability)을 측정한다는 장점이 있다[4]. 수환경을 오염시키는 유해화학물질에 대한 생물학적 환경독성 평가는 주로 물벼룩, 물고기, 조류(algae) 등을 이용하여 행해지고 있는데, 이들 중 물벼룩(*Daphnia magna*) 시험법은 낮은 농도의 화학물질 오염상태에서도 매우 민감하게 반응하기 때문에 그의 기법이 이미 잘 확립되어 있다. 한편, 식물을 이용한 독성표준시험법으로 *Duckweed*나 식물성 플랑크톤 성장저해, 또는 다양한 씨앗을 이용한 발아율 및 뿌리 성장 저해 시험 등을 들 수 있다. 식물체를 사용하여 환경독성을 평가하는 기법의 장점으로서는 결과의 반복성이나 객관성을 위하여 시험체인 생물들을 항상 유지 보관하여야 하는 어려움을 동물체에 비해 크게 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라, 수 환경 생태계에서의 식물의 중요성이 계속 증대되고 있다는 점이다. 그러므로 식물체를 사용하여 환경독성을 평가하는 생물검정기법을 개발해야 하는 요구가 급증하고 있다[5]. 예를 들면 Yang and Watts[6]는 토양에 오염된 유기물질 코팅된 Al NP (13 nm)가 수수, 오이, 콩, 양배추, 당근의 뿌리 성장을 저해한다는 조사하였다[6]. 또한 Lin and Xing[7]는 ZnO NP가 ryegrass 종자의 발아와

뿌리 성장에 억제 영향을 미치는 것으로 조사하였다[7].

본 연구에서는 독성 물질에 민감하고 취급이 간편하며 U.S. EPA [8] 및 OECD 등의 공인기관에서 추천하는 씨앗들 중 *Brassica napus L.*(춘채), *Malva verticillata L.*(아욱), *Brassica oleracea L.*(양배추), *Brassica campestris L.*(배추), *Daucus carota L.*(당근) 다섯 종의 식물 씨앗을 이용하여 NPs (CuO, ZnO, NiO, Fe₂O₃, Co₃O₄, TiO₂)들에 대한 민감도 및 씨앗별 특성에 대해 조사하였다.

2. 실험방법

2.1. 조사 대상 나노입자 및 씨앗 종

본 연구에서는 금속산화물 NPs 6종에 대한 영향을 조사하였으며, 입자 크기 분포는 다음과 같다: CuO (30~50 nm), NiO (30 nm), Fe₂O₃ (20~40 nm), Co₃O₄ (30 nm), TiO₂ (30~50 nm) (Nanostructured & Amorphous Materials Inc., USA), ZnO (40~100 nm), (Alfa Aesar, USA). 나노입자 시료의 고른 분산을 위해 용액 제조 후 초음파 세척기(DAIHAN, Korea)를 이용하여 30분간 초음파 후 사용하였다.

오염물에 대해 비교적 민감성이 높은 씨앗종인 *Brassica napus L.* (Bn, 춘채), *Malva verticillata L.* (Mv, 아욱), *Brassica oleracea L.* (Bo, 양배추), *Brassica campestris L.* (Bc, 배추), *Daucus carota L.* (Dc, 당근) (농우바이오, Korea)를 사용하여 실험을 수행하였다.

2.2. 씨앗 활성에 근거한 나노입자 독성 평가

나노입자에 대한 독성 영향은 씨앗발아와 발아지수에 근거하며 평가하였다. 씨앗은 실험 전에 3% 과산화수소로 씨앗 표면을 소독하고 증류수로 세 번 세척 후 사용하였다. 상이한 농도의 시료 5 mL를 Petri dish (90 × 15 mm)의 여과지(Advantec filter paper #2) 표면에 주입하고, 각각의 Petri dish에 소독한 20

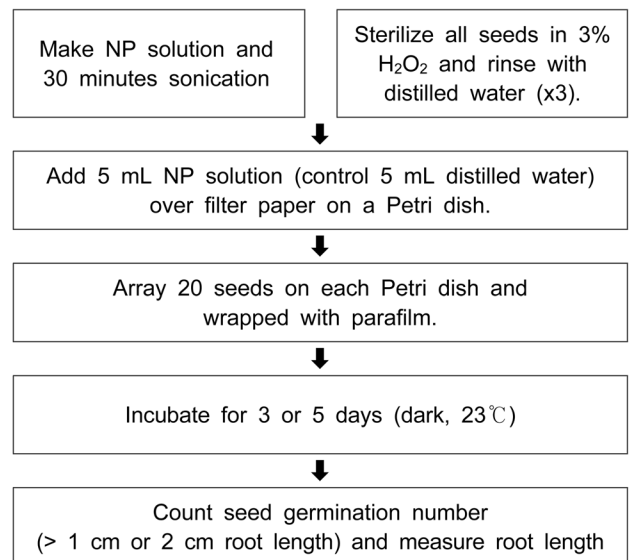


Figure 1. Protocol for seed germination activity assay.

개의 씨앗을 정렬 후 parafilm으로 밀봉하여 23°C 암소에서 배양하였다. 대조군으로는 5 mL의 멸균수를 사용하였다(Figure 1).

양성발아 기준은 춘채, 아욱, 양배추, 배추씨앗의 경우에는 3일 배양 후 뿌리 길이가 2 cm 이상 자란 것, 당근은 5일 배양 후 뿌리 길이가 1 cm 이상 자란 것을 발아한 것으로 간주하였다. 발아 씨앗은 계수와 동시에 뿌리 길이 성장도 측정 하였다. 발아율은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 독성 결과는 나노입자가 씨앗발아에 미치는 영향을 대조군과 비교한 백분율을 이용하여 EC₅₀ (50% 발아 영향 NP 농도)으로 나타내었다. 또한 발아지수(germination index, G.I)는 아래에 근거하여 계산하였다. 모든 실험은 3회 반복 수행하였다.

$$G.I = \frac{(\text{relative seed germination}) \times (\text{relative root elongation})}{100}$$

씨앗발아에 대한 독성 영향을 미국 환경청에서 제공한 Trimmed Spearman-Kärber Methods를 이용하여 EC₅₀과 함께 신뢰 구간(confidence interval)을 산출하였다. 또한 통계적으로 다른 독성평가 실험 결과 값에 유의성 여부는 graphpad Students t-test 프로그램(<http://www.graphpad.com/>)을 이용하여 통계적 유의치 p-value를 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 씨앗발아에 근거한 나노입자 독성 평가

나노입자가 생태계에 미칠 수 있는 영향을 조사하기 위해 다양한 씨앗 발아에 농도 0~100 mg/L 범위의 나노입자 (CuO, ZnO, NiO, Co₃O₄, Fe₂O₃, TiO₂)가 미치는 영향을 조사 하였다.

춘채(Bn), 아욱(Mv), 양배추(Bo), 배추(Bc), 당근(Dc) 씨앗의 경우에는 공통적으로 Co₃O₄, Fe₂O₃, TiO₂ 나노입자 최대 1,000 mg/L의 농도에서 90% 이상의 발아율이 관찰되었으며, 발아율에 거의 영향을 주지 않는 것으로 조사되었다. 그러나 3종의 나노입자 CuO, ZnO, NiO에 대해서는 노출 농도에 따라 발아율이 감소하는 것으로 나타났다. 가장 높은 씨앗발아 억제 영향을 나타낸 CuO가 5종의 씨앗 발아에 미치는 영향을 대표적으로 나타내었다(Figure 2). CuO 0~10 mg/L 구간에서 춘채, 아욱, 양배추, 배추의 발아율은 16~61%로 급격한 발아억제 영향을 나타내었다. 반면 당근의 경우 0~10 mg/L에서 92%의 발아율로 거의 발아억제 영향을 보이지 않았고, 20 mg/L 농도에서 66%의 발아율로 발아억제 영향이 나타났다. 또 당근을 제외한 4종 씨앗은 50 mg/L의 농도에서 완전 발아억제 되었지만 당근은 50 mg/L에서도 20%의 발아율을 보였다. 반면에 동일한 속(*Brassica* genus)인 춘채, 양배추, 배추는 모두 비슷한 억제 영향을 나타내었으며, EC₅₀에 근거하여 비교할 때 통계적 차이가 없는 수치로 조사되었다(p value > 0.5816). 따라서 NPs는 씨앗에 따라 상이한 영향을 나타내지만, 동일 속(genus)은 비슷한 영향을 받음을 확인할 수 있었다.

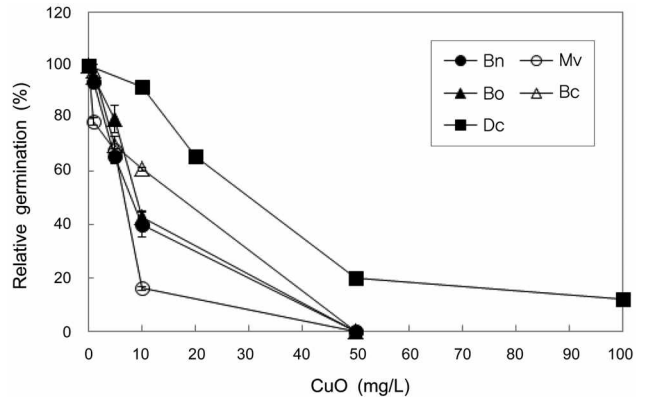


Figure 2. Effects of CuO NP on the relative seed germination (%) of five seeds.

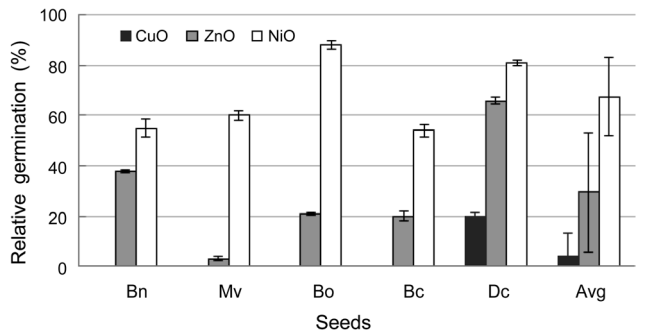


Figure 3. Effects of three NPs (CuO, ZnO, and NiO; 50 mg/L) on the activity of seed germination.

씨앗종과 NPs별 뚜렷한 영향 차이를 관찰하기 위해 50 mg/L 노출 결과를 Figure 3에 나타내었다. 모든 나노입자 농도 50 mg/L에서 씨앗발아율 평균값은 CuO (4 ± 8.9%), ZnO (30 ± 23.8%), NiO (68 ± 15.8%)로 조사되었으며, CuO > ZnO > NiO 순으로 높은 억제 영향을 나타내었다. 그러나 각 NP에 대한 EC₅₀값을 기준으로 하였을 때 당근 씨앗의 경우 억제 순서는 약간 상이하게 CuO > NiO ≈ ZnO 순으로 조사되었다 (Table 1). 당근은 NiO와 ZnO의 경우 비슷한 억제 영향을 받기 때문인 것으로 판단된다.

NPs 종류별 씨앗발아에 미치는 영향을 EC₅₀ 값에 근거하여 비교하였다(Table 1). CuO, ZnO, 및 NiO에 대한 각 EC₅₀ 범위는 6.5~10.1 mg/L, 26.6~27.7 mg/L, 48.3~111.5 mg/L로 조사되었으며, 또한 씨앗별 EC₅₀의 범위는 춘채 6.5~56.4 mg/L, 아욱 5.5~53.4 mg/L, 양배추 7.8~111.5 mg/L, 배추 10.1~48.3 mg/L, 당근 27.1~80.4 mg/L. 따라서 씨앗 및 NPs 종류에 따라 상이한 억제 영향(독성)을 나타냄을 확인할 수 있었다. 동일한 NP에 대한 모든 씨앗 종의 EC₅₀ 평균값에 근거할 때 NPs의 씨앗 발아 억제에 대한 영향은 CuO (11.4 ± 8.94 mg/L) > ZnO (36.8 ± 27.81 mg/L) > NiO (70 ± 26.28 mg/L)로 조사되었다. 또한 동일 씨앗에 대한 3종 NPs 영향은 EC₅₀ 평균값에 근거할 때 다음과 같이 나타났다: 아욱(25 ± 25.1 mg/L), 배추(29 ± 19.1 mg/L), 춘채(30 ± 25.1 mg/L), 양배추(49 ± 55.1 mg/L),

Table 1. Summary of the effects of NPs on seed germination and G.I

| Seed types | | NPs (mg/L) | | |
|------------------|-------|----------------------------------|------------------------|------------------------|
| | | CuO | ZnO | NiO |
| Bn ^{a)} | Germ. | 6.5 (5.54-7.57) ^{b)} | 26.6 (23.45-30.16) | 56.4 (49.4-64.42) |
| | G.I | 3.1 (2.65-3.63) | 17.1 (14.55-20.09) | 30.4 (26.32-35.18) |
| Mv | Germ. | 5.5 (4.49-6.89) | 16.4 (14.14-19.11) | 53.4 (47.42-60.15) |
| | G.I | 2.6 (0.98-6.72) | 13.0 (9.9-17.09) | 39.2 (34.69-44.33) |
| Bo | Germ. | 7.8 (6.82-8.85) | 27.3 (24.57-30.4) | 111.5 (94.95-130.8) |
| | G.I | 4.7 (3.79-5.9) | 21.5 (18.69-24.77) | 52.5 (44.69-61.63) |
| Bc | Germ. | 10.1 (8.66-11.81) | 27.7 (21.73-28.07) | 48.3 (42.78-54.58) |
| | G.I | 4.9 (4.1-5.83) | 17.5 (15.12-20.31) | 26.7 (22.54-31.50) |
| Dc | Germ. | 27.1 (23.79-30.94) | 85.8 (69.31-106.29) | 80.4 (71.41-90.54) |
| | G.I | 21.2 (18.95-23.67) | 52.5 (43.57-63.14) | 73.4 (65.59-82.18) |
| Average | Germ. | 11.4±8.94 | 36.8±27.81 | 70±26.28 |
| | G.I | 7.3±7.83 | 24.3±16.04 | 44.4±18.99 |

^{a)}Bn (*Brassica napus* L.), Mv (*Malva verticillata* L.), Bo (*Brassica oleracea* L.), Bc (*Brassica campestris* L.), Dc (*Daucus carota* L.)

^{b)}Value is the range of the 95% confidence level (low limit~high limit)

Table 2. Statistical significances (*p*-values) between tested types of seeds and NPs

| Parameters | <i>p</i> -value ranges |
|------------------------|---|
| Between two seed types | 0.1721-0.9534 |
| Between two NPs | CuO/ZnO (0.0004-0.0057) ZnO/NiO (0.0007-0.006)* CuO/NiO (0.0002-0.0008) |

*Effects of ZnO/NiO on Dc (carrot) only showed *p*-value 0.6765

당근(64 ± 32.4 mg/L). 현재의 연구에서는 정확한 원인 분석이 어려우나 매우 특이한 결과는 NiO 노출에 대한 양배추(Bo) 씨앗발아 EC₅₀은 111.5 mg/L(반복 확인 실험)로 다른 씨앗종에 비해 매우 낮은(1.4~2.4배) 영향을 나타내었다.

또한 씨앗 발아 활성에 대한 씨앗 종류, 나노입자별 영향 결과(EC₅₀)에 대한 통계적 유의 여부를 t-test 프로그램의 결과인 *p*(probability)-value로 평가하였다(Table 2). 씨앗별 EC₅₀에 대한 *p*-value 범위는 0.1721-0.9534로 나타났기 때문에, 비록 평균값 자체는 차이가 있지만 통계적으로 유의성을 관찰할 수 없는 것으로 조사되었다. 나노입자별 EC₅₀에 대한 *p*-value 범위는 CuO/ZnO 0.0004-0.0057, ZnO/NiO 0.0007-0.006(당근 씨앗 0.6765), CuO/NiO 0.0002-0.0008로 조사되었다. NPs간의 *p*-value에서는 당근 씨앗의 ZnO/NiO 0.6765를 제외하고는

모두 *p*-value < 0.05로 통계적으로 유의한 것으로 조사되었다. 따라서 모든 NPs에 대한 씨앗별 활성에 대한 영향은 상이한 것으로 판단되었으나, NPs간에 씨앗활성에 미치는 영향은 ZnO와 NiO가 당근씨앗에 미치는 영향이 비슷한 것을 제외하고는 모두 각 씨앗에 활성에 미치는 영향이 매우 상이한 것으로 판단되었다. 따라서 이를 바탕으로 다양한 씨앗 종에 대한 통합 결과 해석이 NPs의 영향에 대한 적절한 평가 결과를 제공해 줄 것이라 사료된다.

3.2. 발아지수(G.I)에 근거한 나노입자 독성 평가

NPs가 미치는 영향을 씨앗발아율과 뿌리성장 영향을 결합한 발아지수(G.I)를 이용하여 평가하였다. 조사 대상인 6종의 나노입자 중 Co₃O₄, Fe₂O₃, TiO₂ 들은 최대 노출 농도인 1,000 mg/L에서 80~90%의 발아지수를 나타내어 뚜렷한 억제 영향을 나타내지 않았다. 뚜렷한 억제 영향을 보인 CuO, ZnO, NiO 3종의 나노입자 중 대표적인 NiO의 노출농도별 발아지수에 미치는 영향을 Figure 4에 나타내었다. 발아율을 근거로 한 독성영향 결과와 동일하게 5종 씨앗 모두 공통적으로 나노입자 NiO의 농도가 높을수록 뿌리생장에 독성영향을 나타내어, 발아지수가 감소하였다. 그러나 씨앗발아율과 비교할 때 지수 감소 정도가 완만하게 나타났다. Figure 4를 보면 당근을 제외한 4종 씨앗의 경우 20 mg/L에서 64~80%의 발아지수를 나타내었고, 당근의 경우 90%의 발아지수를 나타내었다. 이후 20~50 mg/L 구간에서는 춘채, 아욱, 배추의 경우 37~46%의 급격한 발아지수 감소를 보였고, 양배추의 경우 24% 다소 완만한 발아지수 감소를 나타내었다. 당근의 경우 20~50 mg/L 구간에서 9%의 발아지수 감소를 나타내어 저농도 구간(0~50 mg/L)에서 다른 씨앗에 비해 나노입자 NiO에 큰 영향을 받지 않는 것으로 조사되었다.

씨앗종별, 그리고 NPs별 뚜렷한 영향 차이를 관찰하기 위해 NPs 50 mg/L 노출에 대한 영향 결과를 Figure 5에 나타내었다. Co₃O₄, Fe₂O₃, TiO₂ 나노입자의 경우 모두 최대 1,000 mg/L의 농도에서 90% 이상의 발아지수가 관찰되었으며, 발아율과 함께 발아지수 또한 매우 미미한 영향을 받는 것으로 조사

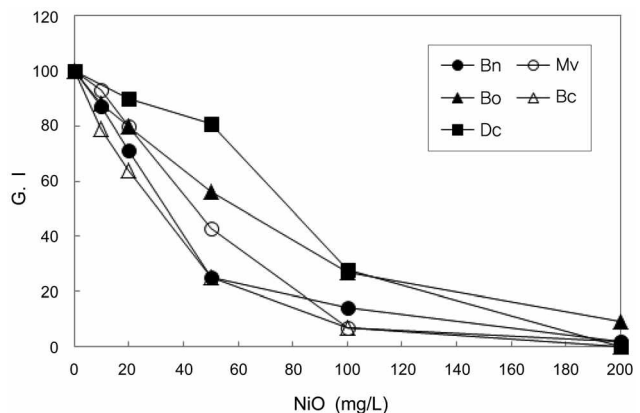


Figure 4. Effects of the NiO NP on the germination index (G.I) of five seeds.

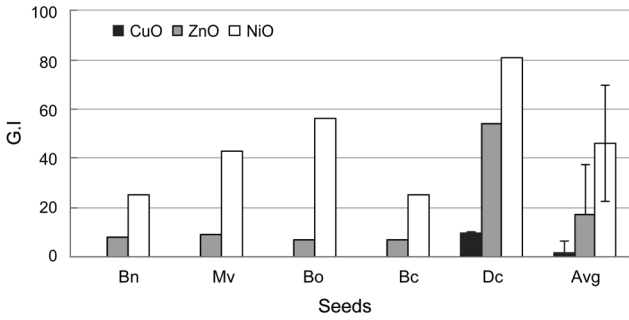


Figure 5. Effects of three NPs (CuO, ZnO, and NiO; 50 mg/L) on the germination index (G.I) of five seed types.

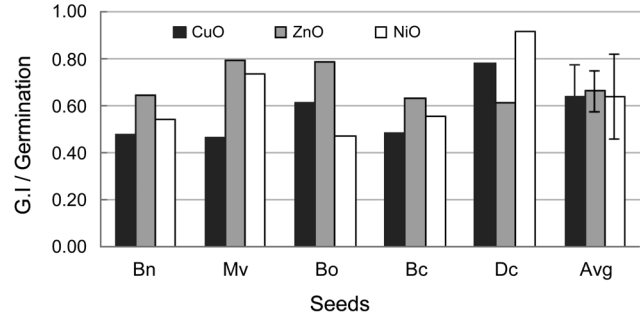


Figure 6. Effects of NPs on root growth of five seeds based on the ratio of G.I to relative seed germination (%).

되었다. 각 NPs의 50 mg/L 농도 노출에서 모든 씨앗에 대한 발아지수 평균값에 근거한 영향 순서는 CuO (2 mg/L) > ZnO (17 mg/L) > NiO (46 mg/L)로 조사되었다.

NPs의 씨앗 발아지수에 미치는 영향을 G.I EC₅₀ 값에 근거하여 나타내었다(Table 1). 각 CuO, ZnO 및 NiO에 대한 씨앗별 G.I EC₅₀ 범위는 2.6~21.2, 13.0~52.5, 26.7~73.4로 조사되었으며 NPs 따라 각 씨앗들은 매우 다양한 범위의 독성을 나타내었다. 3종의 NPs에 대한 씨앗별 G.I EC₅₀ 범위는 춘채 3.1~30.4, 아욱 2.6~39.2, 양배추 4.7~52.5, 배추 4.9~26.7, 당근 21.2~73.4로 역시 NPs별로도 상이한 영향을 나타내었다. 따라서 동일한 씨앗 종이라 하더라도 발아, 줄기 및 뿌리의 생장에 따라 오염물이 미치는 독성은 상이한 것으로 조사되었다[9]. 내성이 강한 식물의 경우 상대적으로 내성이 약한 식물에 비해 나노입자와 같은 오염물에 대한 방어기작이 활발하게 이루어져 독성 영향을 적게 받는 것으로 사료된다. 식물종과 측정기준에 따라 많은 다양한 특성이 나타남을 알 수 있기 때문에 나노입자 시료 특성에 따라 다양한 실험을 통한 적절한 방법으로 독성평가가 시행되어야 할 것이다.

3.3. 나노입자의 뿌리 생장에 대한 영향

씨앗 발아 기간 중 뿌리생장 자체에 대한 영향은 씨앗 종에 따라 상이하게 관찰되었다. 대조군의 경우 각 씨앗의 뿌리 생장은 춘채(3.7 ± 0.34 cm), 아욱(2.1 ± 0.17 cm), 양배추(3.7 ± 0.23 cm), 배추(3.4 ± 0.69 cm), 당근(0.8 ± 0.17 cm)으로 조사되었다. 동일한 속(genus)인 춘채, 양배추 및 배추의 뿌리 생장은 3.4~3.7 cm로 비슷하게 관찰되었고, 당근은 다른 종에 비해 짧은 뿌리 생장(가장 긴뿌리 생장을 보인 춘채의 22%)을 나타내었다. 씨앗크기(춘채 0.15 cm × 0.15 cm, 아욱 0.2 cm × 0.2 cm, 양배추 0.2 cm × 0.2 cm, 배추 0.2 cm × 0.2 cm, 당근 0.25 cm × 0.15 cm)와는 무관한 뿌리 생장을 관찰할 수 있었다.

NPs가 씨앗의 뿌리 생장 자체에 미치는 영향을 조사하기 위해 발아지수 EC₅₀에 씨앗 발아율 EC₅₀값을 나누어 비교하였다(Figure 6). 낮은 결과치는 높은 결과치에 비해 뿌리에 미치는 영향이 높음을 나타낸다. 전체 결과치의 범위는 최저 0.5 (CuO, 아욱)에서 최고 0.9(NiO, 당근)로 조사되었다. NPs별 평균은 CuO (0.6 ± 0.14), ZnO (0.7 ± 0.09), NiO (0.6 ± 0.18)이었으며, 또한 모든 NPs에 대한 씨앗별 평균은 춘채(0.6 ± 0.08),

아욱(0.7 ± 0.18), 양배추(0.6 ± 0.16), 배추(0.6 ± 0.07), 당근(0.8 ± 0.15)로 조사되었다. 나노입자의 경우 당근 씨앗을 제외한 모든 씨앗에 일반적으로 CuO > NiO > ZnO 순으로 뿌리 생장에 더 높은 영향을 주는 것으로 조사되었으며, 당근 씨앗의 경우는 ZnO > CuO > NiO의 순서로 뿌리 생장 영향이 관찰되었다. 또한 씨앗의 경우 당근 씨앗이 다른 씨앗에 비해 뿌리 생장에 적은 영향을 받는 것으로 조사되었고, 대조군 뿌리가 긴 씨앗(춘채, 양배추, 배추)이 아욱, 당근 씨앗에 비해 3종 나노입자에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 따라서 NPs의 뿌리생장에 대한 영향은 씨앗크기보다는 대조군의 뿌리 생장 길이에 비례함을 알 수 있었고, 또한 NPs별 씨앗발아와 뿌리에 대한 영향 정도 및 순서가 상이함을 관찰하였다.

다른 연구 결과들에 의하면 산화 금속입자인 CuO와 ZnO 나노입자가 옥수수의 발아와 성장을 저해한다는 연구결과가 있다[10]. 오이묘목을 이용한 ZnO 나노입자 독성실험 결과에 의하면, 씨앗의 뿌리생장 억제기작은 뿌리표면의 나노입자 흡착에 의한 대사작용의 물리적 차단 때문인 것으로 사료된다[11]. 또한 본 씨앗독성실험에서는 성장억제 영향이 나타나지 않았던 TiO₂ 나노입자의 경우 물벼룩을 대상으로 한 독성실험에서는 성장억제 영향을 나타내기도 하였다[12]. 이러한 점으로 미루어 볼 때 생물 종류 및 측정 종말점(endpoint)에 따라 상이한 민감도와 경향을 나타내는 것을 알 수 있다. 따라서 향후 적절한 NPs 영향 평가를 위해서 다양한 검정법(생물종)에 의한 통합 결과를 이용하는 것이 더욱 적절한 평가법이 될 것이다[13,14].

4. 결론

본 연구에서는 6종 나노입자(CuO, ZnO, NiO, Fe₂O₃, Co₃O₄, TiO₂)가 생태계에 미칠 수 있는 영향을 다양한 씨앗 종(춘채, 아욱, 양배추, 배추, 당근)의 씨앗활성(씨앗발아 및 발아지수) 결과에 근거하여 평가하였으며 다음과 같은 결론을 도출하였다.

- 1) 씨앗을 이용한 독성 평가법에서는 사용한 나노입자 종류에 따라 다양한 범위의 독성을 나타내었지만, 대체적으로 아욱 > 배추 ≈ 춘채 ≈ 양배추 > 당근 순으로 민감도가 조사되었다.

2) 5종 씨앗 모두 공통적으로 나노입자 Fe₂O₃, Co₃O₄, TiO₂는 최대 조사 농도(1,000 mg/L)에서도 씨앗 활성에 거의 독성 영향을 나타내지 않았으나, CuO, ZnO, NiO는 씨앗 발아 및 발아지수에 뚜렷한 영향 나타내었다.

3) 5종 씨앗에 대한 3종 NPs CuO, ZnO, NiO의 발아율(EC₅₀값)과 발아지수(EC₅₀값)을 비교 하였을 때 0.5~0.9배까지 차이가 나는 것으로 조사되어 씨앗 종에 따라 발아율과 발아지수에 미치는 영향 차이가 있음을 알 수 있었다. 따라서 식물 종과 측정 종말점에 따라 나노입자별 상이한 영향을 미치는 것으로 판단된다.

본 연구에 적용한 씨앗발아법은 실험과정이 비교적 간편하고, 비용적인 측면에서도 실용적이며, 측정에 소요되는 시간이 짧아 타 시험법보다 상대적으로 신속하게 결과를 얻을 수 있다. 그러나 나노입자의 종류에 따라 씨앗에 대한 상이한 민감도가 나타날 수 있는 것을 고려하여야 할 것이다. 따라서 단일 검정법에 근거한 결과가 가질 수 있는 제한적인 요인들 때문에 실제적인 평가는 다양한 검정법들의 통합 결과에 대한 해석을 통하여 접근하는 것이 바람직하다고 사료한다. 본 연구 결과를 기초자료로 하여 향후 다양한 통합 검정법을 이용한 평가가 필요하다고 사료한다.

References

- Kim, M. S., Choi, K. H., Kim, Y. H., and Yi, J. H., "Risk Assessment for Health and Environmental Hazards of Nanomaterials," *Clean Technol.*, **13**(3), 161-172 (2007).
- Maeng, S. H., and Yu, I. J., "The Concepts of Nanotoxicology and Risk Assessment of the Nanoparticles," *J. Toxicol. Pub. Health*, **21**(2), 87-98 (2005).
- Oberdrster, G., Oberdrster, E., and Oberdrster, J., "Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles," *Environ. Health Perspect.*, **113**, 823-839 (2005).
- Kong, I. C., Kwon, H. J., and Ko, K. S., "Bioassessment and Comparison of Toxicity of Arsenics based on the Results of Various Bioassays," *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, **32**(8), 795-801 (2010).
- Lee, J. N., and Hwang, I. Y., "Evaluation of Environmental Toxicities for Priority Water Pollutants in a Small Watershed by Bioassays," *Kor. J. Environ. Toxicol.*, **14**(4), 135-144 (1999).
- 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).
- Lin, D., and Xing, B., "Phytotoxicity of Nanoparticles: Inhibition of Seed Germination and Root Growth," *Environ. Pollut.*, **150**(2), 243-250 (2007).
- US. EPA., "Ecological Effects Test Guidelines - Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test," 712-C-96-154(1996).
- Liu, X., Zhang, S., Shan, X., and Zhu, Y-G., "Toxicity of Arsenate and Arsenite on Germination, Seedling Growth and Amylolytic Activity of Wheat," *Chemosphere*, **61**, 293-301 (2005).
- Kim, S., H., Jung, M., A. and Lee, I., S., "Size-dependent Toxicity of Metal Oxide Particles on the Soil Microbial Community and Growth of Zea Mays," *J. Kor. Environ. Eng.*, **31**(12), 1069-1074 (2009).
- Kim, S. H., Baek, J. H., Song, Y. R., Sin, M. J., and Lee, I. S., "Characterization and Phytotoxicity of Zn, Zn Oxide Nanoparticles," *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, 1129-1134 (2009).
- Bang, S., H., Le, T., H., Lee, S., K., Kim, P., Kim, J., S., and Min, J., "Toxicity Assessment of Titanium (IV) Oxide Nanoparticles Using *Daphnia magna* (Water Flea)," *Environ. Health Toxicol.*, **26**, 14-19 (2011).
- Mankiewicz-Boczek, J., Nalecz-Jawecki, G., Drobniewska, A., Kaza, M., Sumorok, B., Izydorczyk, K., Zalewski, M. and Sawicki, J., "Application of a Microbiotests Battery for Complete Toxicity Assessment of Rivers," *Ecotox. Environ. Saf.*, **71**, 830-836 (2008).
- Kungolos, A., Emmanouil, C., Tsiridis, V., and Tsiropoulos, N., "Evaluation of Toxic and Interactive Toxic Effects of Three Agrochemicals and Copper Using a Battery of Microbiotests," *Sci. Total Environ.*, **407**, 4610-4615 (2009).