

북방산개구리(*Rana dybowskii*) 유생의 포식자 회피 행동에 대한 FNW와 FNW-Ag 복합체의 영향

김은지·고원배*·한얼·고정원*·정훈†

삼육대학교 동물생명자원학과

*삼육대학교 융합과학과

Effects of FNW and FNW-Ag on the Antipredator Behavior of Dybowskii's Frog (*Rana dybowskii*) Larvae

Eunji Kim·Weon Bae Ko*·Eul Han·Jeong Won Ko*·Hoon Chung†

Department of Animal Biotechnology and Resource, Sahmyook University, Seoul, Korea

*Department of Convergence Science, Sahmyook University, Seoul, Korea

(Received : 15 January 2018, Revised: 05 July 2018, Accepted: 29 August 2018)

요약

기존의 독성평가는 생물의 생존가능성에 영향을 줄 수 있는 이상행동반응에 대한 평가를 거의 하지 않았다. 따라서 본 연구에서는 행동학적 이해를 바탕으로 양서류 유생들의 생존가능성과 직결되는 포식자 회피반응 행동을 이용하여 fullerene nanowhisker(FNW)와 nanowhisker-silver nanoparticle composites(FNW-Ag복합체)의 독성을 평가해 보았다. 우리는 나노물질에 노출되지 않는 그룹과 5가지 농도에 따른 나노물질에 노출되는 그룹(FNW 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 500 μ g/ml과 FNW-Ag복합체 10 μ g/ml, 50 μ g/ml)으로 나누어 실험하였다. 그 결과, FNW-Ag복합체 50 μ g/ml농도에 노출된 유생들을 제외하고는 평소 활동량에는 차이가 없었지만, FNW 10 μ g/ml농도에 노출된 유생들을 제외하고는 모두 포식자인식 반응에 따른 활동변화에서는 통계적으로 유의한 차이가 나타났다. 즉, 나노물질노출 유무는 평소 움직임에는 영향을 주지 않지만, 행동학적 이해를 바탕으로 한 분석결과 포식자 회피반응에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. 따라서 생물을 대상으로 하는 독성평가연구에 행동학적 분석이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

핵심용어 : 포식자 회피반응, 행동학적 독성 평가, 풀러렌 나노 휘스커, 풀러렌 나노 휘스커-은 복합체, 올챙이

Abstract

Existing toxicity assessment researches were rarely studied on assessment of the abnormal behavior that affecting survival. Therefore, the study used anti-predator response of amphibians larvae, based on behavioral understanding, to assess toxicity in fullerene nanowhisker(FNW) and fullerene nanowhisker-silver nanoparticle composites(FNW-Ag). The experiment was conducted by dividing the groups not exposed to nanomaterials and exposed to nanomaterials at five concentrations(FNW: 10 μ g/ml, FNW: 100 μ g/ml, FNW: 500 μ g/ml FNW-Ag: 10 μ g/ml, FNW: 50 μ g/ml). As a result, there were no differences in normal activity except those exposed to concentrations of FNW-Ag 50 μ g/ml, but there were statistically significant differences in anti-predator response except those exposed to concentrations of FNW 10 μ g/ml. That is, exposed of nanomaterials does not affect ordinary movements, but analyses based on behavioral understandings have shown that it has an influence on the anti-predator response. It is therefore considered necessary to have animal behavioral analysis method performed in the assessment of eco-toxic experiment.

Key words : Anti-predator response, Behavior toxicity assessment, Fullerene nanowhisker, Fullerene nanowhisker-silver nanoparticle composite, Tadpole

1. 서 론

인간은 지난세기동안 다양한 화학물질들을 발견하고 발

견시켜왔다. 특히 지난 10여년간은 nm(10⁻⁹)단위의 나노 물질을 이용한 산업분야가 눈에 띄게 성장하였다(Truong et al., 2012). 사용되지 않는 분야를 찾기 힘들 정도로 다양한 분야에서 이용되었고, 폭발적인 사용량 증가로 인하여 나노물질의 제조, 사용 및 처리과정에서 환경으로의 유출될 가능성이 증가하였다. 하지만 나노물질을 다양한 산업에 응용하거나 활용하기 위해 수행되는 연구들에 비하면, 환경으

† To whom correspondence should be addressed.
Department of Animal Biotechnology and Resource, Sahmyook University, Seoul, Korea
E-mail: chungh@syu.ac.kr

로 유출되었을 경우 생태계와 야생동물들에게 미칠 영향에 대한 연구들은 거의 이루어지지 않는 수준이다.

환경으로 유출된 오염물질들이 야생동물들에게 부정적인 영향을 끼친다는 것은 선행연구들을 통해 밝혀진 바 있다 (Bermudez et al., 2004; Heinlaan et al., 2008; Hu et al., 2010; Hussain et al., 2005; Jani et al., 1994; Kisin et al., 2007; Long et al., 2006; Oberdörster, 2004; Rodea-Palomares et al., 2011; Zhu et al., 2010). 특히, 전체 중 중 약 41%가량이 멸종위기에 처한 양서류의 경우, 개체수감소의 주된 원인 중 하나가 오염물질에 의한 감소일 정도로 민감하게 반응하는 분류군 중 하나이다. 또한 대부분의 양서류들이 유생시기를 보내는 습지 생태계의 퇴적물층은 퇴적작용에 의해 오염물질들이 잘 축적되는 특징을 가진다(Gottschalk et al., 2009; Pakarinen et al., 2011). 이러한 퇴적물은 수중생태계 내 가장 낮은 단계의 먹이원 중 하나이기 때문에 퇴적물의 오염은 먹이사슬에 의해 수중생태계의 여러 생물에게 영향을 미칠 수 있다. 이미 오염된 퇴적물을 섭취한 수중무척추동물들의 장기에서 오염물질의 축적과 그로 인한 부정적인 영향이 보고된바 있기 때문에, 수중무척추동물을 먹이로 하는 양서류 유생들을 비롯한 다양한 소형척추동물들의 피해가 예상가능하다. 실제로 이러한 오염물질들은 개체의 생리학적 스트레스를 증가시켜, 발생 및 성장 방해, 번식 실패, 행동변화 등에 영향을 주어 결과적으로 생존을 감소를 야기하였다(Baker et al., 2013; Boone and Bridges-Britton, 2006; Egea-Serrano et al., 2012; Hayes et al., 2010). 또한 일부 나노물질의 경우 습지로 흘러들어 수중생물들의 화학적 신호인식과정을 방해한다고 알려졌다(Wolf and Moore, 2002).

습지 내 수중생태계처럼 빛이 부족한 환경에 서식하는 생물들은 시각적 신호의 효율이 떨어지기 때문에 화학적 신호를 이용하여 먹이탐색, 성선택, 포식자인식 등의 행동을 한다(Brönmark and Hansson, 2000; Johansson and Jones, 2007). 수중생태계에서 유생시기를 보내는 양서류의 경우도, 다양한 화학적 신호를 이용하여 생존한다. 그 중 유생의 생존가능성에 직접적인 영향을 주는 포식자인식 및 회피과정은 포식자에게서 직접 분비되거나 포식자의 공격으로 인해 부상 또는 사망한 동종 및 타종에게서 분비되는 화학 신호 인식을 통해 이루어지며, 개체는 이러한 과정을 통해 포식위험이 감지되면 급격하게 활동성을 감소시킴으로써 포식자의 눈에 띌 가능성을 감소시켜 방어한다(Chivers and Smith, 1998; Holomuzki, 1995; Kats and Dill, 1998; Kiesecker et al., 1996; Stauffer and Semlitsch, 1993; Wilson and Lefcort, 1993). 하지만 오염물질로 인해 생존가능성에 직접적인 영향을 주는 이러한 포식자-피식자간인식과정에 문제가 발생한다면, 결과적으로 개체들의 생존율이 감소할 수 있다.

따라서 이러한 동물의 행동반응 변화는 독성평가연구에서 다뤄져야한다. 하지만 기존의 독성평가연구들은 생물의 치사영향에 관한 연구들이 대부분이며 행동학적 이상에 대

한 분석은 거의 이루어지지 않았다(Asharani et al., 2011; Bar-Ilan et al., 2009; Browning et al., 2009; Geffroy et al., 2012; Kim et al., 2015; Li et al., 2008; Lovern et al., 2008; Tedesco et al., 2010; Truong et al., 2012; Zhu et al., 2010). 따라서 우리는 행동학적 이해를 바탕으로 동물의 독특한 행동반응이 독성평가연구에 적용될 수 있도록 새롭게 설계 및 분석을 시도하였다.

우리는 양서류유생의 포식자회피반응에 영향을 줄 수 있는 독성물질로써 사용량이 많아 습지에 흘러들 가능성이 큰 물질로 선정하였다. 탄소소재의나노물질은 나노단위 분야에서 가장 주목받는 분야 중 하나이다. 특히, Carbon Nanotube(CNT)는 탄소로 이루어진 직경이 nm단위인 매우 작은 물질을 일컬으며, 구조, 모양, 크기, 결합물 등에 따라 전자구조가 변하여 전자정보통신, 의약, 제조분야, 에너지 생산 등 여러 산업분야에서 이용되고 있다(Erik et al., 2001). 그 중 가장 각광받고 있는 Fullerene nanowhisker(FNW)와 Fullerene nanowhisker-silver nanoparticle composites(FNW-Ag복합체)은 연료전지, 지하수교정, 다양한 화장품을 포함하는 뷰티산업, 약물전달 같은 의약품산업 등에서 이용되고 있다. 따라서 많은 사용량으로 인해 환경으로의 유출 가능성 또한 높으며, FNW가 일부 수중생물에게 부정적인 영향을 준다고 연구 된 바 있다(Fraser et al., 2011; Petersen and Henry, 2012; Tervonen et al., 2010; Waissi-Leinonen et al., 2012). 따라서 두 물질이 양서류 유생의 행동학적 변화를 일으킬 수 있는 물질로 적절하다고 판단하였다.

2. 연구방법

2.1 나노입자합성

FNW와 FullereneNanowhisker-silver nanoparticle composites(FNW-Ag)를 제조하기 위해 Fullerence은 Tokyo Chemical Industry에서 구입하였고, AgNO₃은 Sigma-Aldrich, C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, (CTAB), (C₁₆H₃₃)N(CH₃)₃Br, C₆H₈O₆, 이소프로필 알코올, 톨루엔은Samchun Chemical에서 구입하였다. NaBH₄는 Kanto Chemical에서 구입하였다.

2.1.1 FNW 제조

10mg Fullerence를 10mg 벤젠에 용해시킨 후, 45분 동안 초음파를 조사시킨 용액을 여과지를 사용하여 여과하였다. 포화 Fullerence 벤젠 용액을 50ml 바이알에 넣고 1시간 동안 5°C 냉장고에 보관하였다. 40ml의 이소프로필 알코올을 포화 Fullerence 벤젠 용액에 서서히 추가하면서 액체-액체 계면이 형성된다. 이 혼합용액을 흔들어 준 후, 냉장고에 24시간 동안 방치하면 FNW가 생성된다.

2.1.2FNW-Ag복합체 제조

Ag 나노입자용액은 1000ml 증류수에 3.66g AgNO₃, 7.36g C₆H₅Na₃O₇·2H₂O과 1M의 NaBH₄용액 240ml을 추가하여 제조하였다. Ag 나노입자성장용액은

1000ml 증류수에 3.86g AgNO₃, 20.012g (CTAB), (C₁₆H₃₃)N(CH₃)₃Br을 넣어 제조하였다. Ag 나노입자는 11ml의 Ag 나노입자종자용액과 33ml 은 나노입자성장용액을 혼합하고 0.2 M C₆H₈O₆용액 0.52ml를 첨가한 후 15분 동안 교반하여 제조하였다. 50ml Erlenmeyer 플라스크에 50mg Fullerene, 50ml 톨루엔을 추가 한 후 교반하고, 45분 동안 초음파 조사를 하였다. 톨루엔에 용해된 포화 Fullerene용액을 여과지를 사용하여 여과한 용액과 이소프로필 알코올을 20분 동안 냉장고에 보관하였다. 2ml 포화 Fullerene용액, 1ml Ag 나노입자 용액, 15ml 이소프로필 알코올을 20ml 바이엘에 추가 하였다. 이 혼합 용액을 10분 동안 초음파 조사한 후 24시간 동안 냉장고에 보관하였다. 냉장고에 보관한 혼합용액을 여과지를 사용하여 여과한 후 100°C 오븐에서 5시간 동안 건조시켜 FNW-Ag 복합체를 얻었다(Lee et al., 2009).

생성된 FNW와 FNW-Ag복합체는 X선 회절 분석기(Bruker, D8 Advance)는 CuK α 복사선($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$)를 이용하여 결정구조를 확인하였고, 주사전자현미경(JEOL Ltd, JSM-6510)은 가속전압 0.5 ~ 30Kv 조건에서 시료의 표면 형태를 확인하였다(Fig.1~4).

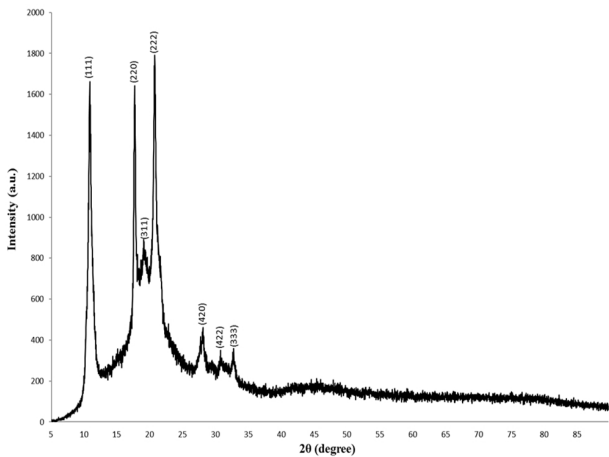


Fig. 1. XRD(X-ray diffraction) pattern of fullerene nanowhisker

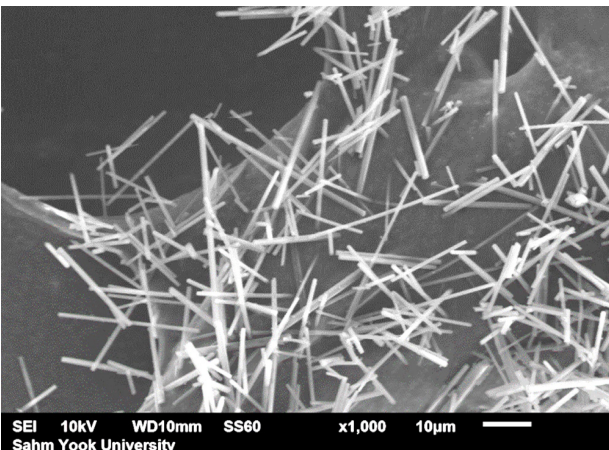


Fig. 2. SEM image of fullerene nanowhisker

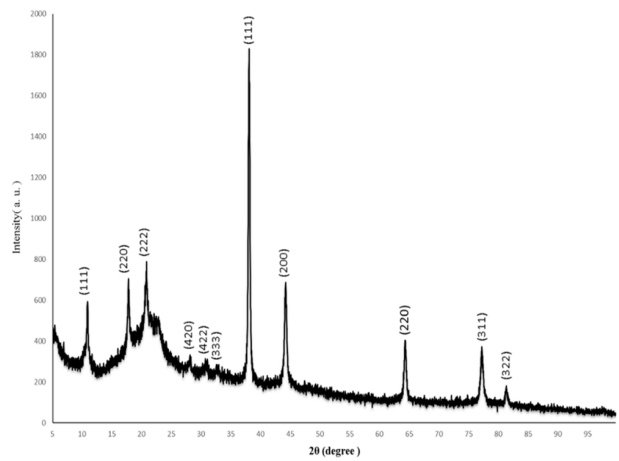


Fig. 3. XRD pattern of fullerene nanowhisker-silver nanoparticle composites

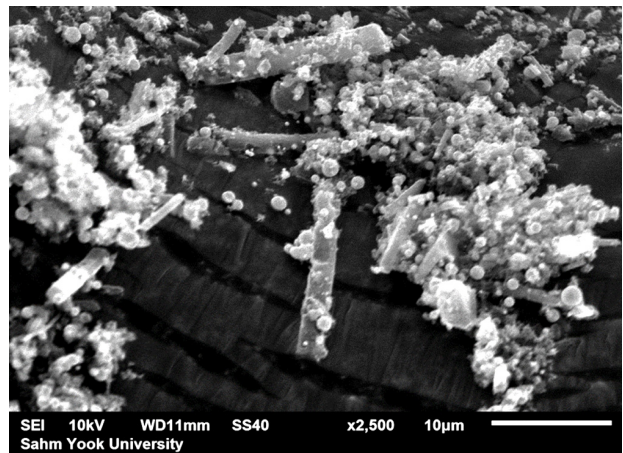


Fig. 4. SEM image of fullerene nanowhisker-silver nanoparticle composites

2.2 실험동물

2016년 3월 서울시 노원구 불암산의 습지에서 북방산개구리의 알을 총 2차례에 걸쳐 채집하였다. 1차에서는 알덩이 5개에서 Gosner stage 13 이상인 약 300개의 알을 채집하였고, 2차 채집에서는 Gosner stage 10-12인 알을 5개의 알덩이에서 500개의 알을 채집하였다(Gosner, 1960). 채집된 모든 알은 곧바로 실험실로 옮겨져 채집일에 따라 구분하여 각각 80L의 염소가 제거된 물이 들어있는 탱크(130cm×44cm×47cm)에서 사육하였다. 수온은 18~20°C로 유지하였으며, 산소발생기를 넣어주어 지속적인 산소공급을 해주었고, 낮과 밤 주기는 자연상태와 동일하게 맞추었다. 1차로 채집된 알들은 유생의 행동실험에서 포식자로 사용될 왕잠자리 수채의 먹이로 사용되었으며, 부화 후에도 실험이 끝날 때까지 동일한 조건하에 같은 탱크에서 지속적으로 사육되었다. 부화 후 매일 2번의 Tetra bits(Tetra, Melle, Germany)를 공급하였으며, 이들에 한번 50%환수를 해주었다. 2차로 채집된 알들은 부화 후 유생의 행동실험에 이용되었기 때문에, Gosner stage 25가 될 때까지 동일한 조건하에 머무르던 물탱크에서 사육되었다.

또한 우리는 유생의 행동실험에서 포식자로 사용된 왕잠자리 수채 3마리를 1차 채집한 알들이 부화한 후 알을 채집한 웅덩이에서 채집하였다. 채집된 왕잠자리 수채들은 2L의 염소가 제거된 물이 들어있는 플라스틱 수조(20cm×13cm×13cm)에서 사육되었다. 수온은 18~20°C로 유지하였으며, 매일 오전 10시에 유생 10마리를 먹이로 지급하였으며 급여 6시간 후 100% 환수해 주었으며, 환수 시까지 포식당하지 않은 유생은 제거하여 왕잠자리 수채가 받는 스트레스를 줄여주었다.

Gosner stage 25가 된 유생들은 탄소나노물질의 종류와 농도에 따라 6개의 그룹으로 나뉘어 사육되었다(Water: 염소를 제거한 물; FNW10: FNW-10µg/ml; FNW100: FNW-100µg/ml; FNW500: FNW-500µg/ml; FAg10: FNW Ag-10µg/ml; FAg50: FNW Ag-50µg/ml). 100ml 유리비커에 7가지 중 각 농도에 맞는 탄소나노물질 용액을 50ml를 넣고 유생 6마리를 72시간 동안 머무르게 하였다. 그 후 12시간 동안 탄소나노물질이 들어있지 않은 염소가 제거된 물 50ml이 들어 있는 100ml 유리비커에서 사육하였다.

이 과정을 마친 유생들은 염소가 제거된 물 300ml이 들어 있는 흰색 플라스틱 컵(8cm(직경)×5cm)에 한 마리씩 넣고 45분간 안정을 취하게 하였다. 안정기간이 끝나고 3분 후에 포식자 큐 3ml을 30초간 컵의 벽면을 따라 천천히 흘러 넣어 주었다. 포식자신호는 2L의 염소를 제거한 물에 유생을 지속적으로 포식해 온 왕잠자리 수채를 24시간동안 넣어둔 물을 사용하였다. 흰색 플라스틱 컵을 사용한 이유는 유생이 검정색에 가까운 어두운 색이기 때문에 바탕색과 유생과의 색 대비를 이용하여 행동분석 시 용이하게 하기 위함이다. 포식자신호를 넣기 전 3분간과 포식자신호를 넣은 후 3분간의 행동을 비디오키메라(SONY DCR-SX60)를 이용해 기록하였다. 기록된 행동은 행동분석프로그램 Ethovision XT9(Noldus Information Technology, Netherkands)를 이용하여 이동거리를 측정하였다(Fig. 5).

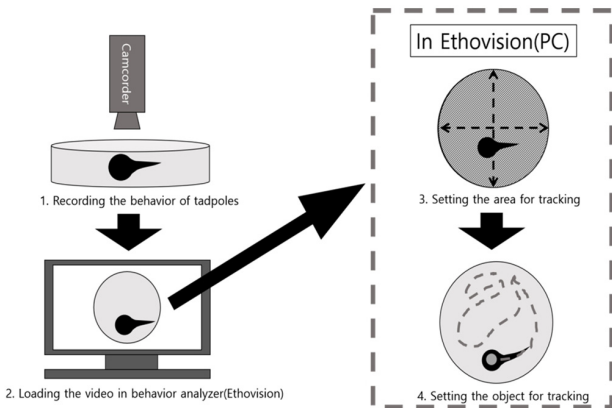


Fig. 5. Diagram of an EthoVision setup

2.3 데이터 분석

나노물질종류 및 노출 농도에 따른 포식자 신호 노출 전후의 이동거리와 행동변화량을 비교를 위해 일원배치분산분

석과 LSD를 사용하여 분석하였다. 행동변화량은 (포식자 신호 주입 후 이동거리 ÷ 주입 전 이동거리 × 100 - 100)으로 구하였다. 모든 통계적 분석은 SPSS Ver. 20.0(SPSS, Chicago, IL, U.S.A)를 이용하였으며, 유의수준 0.05에서 검정하였다.

3. 결 과

FNW 10µg, 100µg, 500µg 농도에 노출된 그룹의 유생들과 FNW에 노출되지 않은 유생들의 평소 활동량에는 통계적인 차이가 나타나지 않았다($F_{(3,224)}=0.668, p=0.573$; Fig. 6). 또한, FNW 10µg, 100µg, 500µg 농도에 노출된 그룹의 올챙이들과 FNW에 노출되지 않은 올챙이들의 포식위험 상황에서도 집단 간 통계적인 차이가 나타나지 않았다($F_{(3,224)}=0.911, p=0.437$; Fig. 7). 포식자 출현에 따른 행동감소율의 경우 FNW 10µg 그룹의 올챙이들과 FNW에 노출되지 않은 올챙이들간의 통계적인 차이가 나타나지 않았지만, 낮은 그룹의 올챙이들 간에는 통계적인 유의성이 나타났다 FNW 100µg,

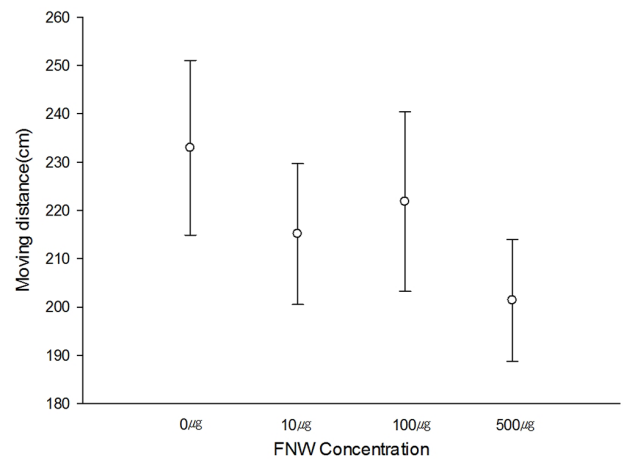


Fig. 6. Mean (±SE) of total moving distance for 3 minute(pre-injection predator cue) of tadpoles according to FNW exposure concentration

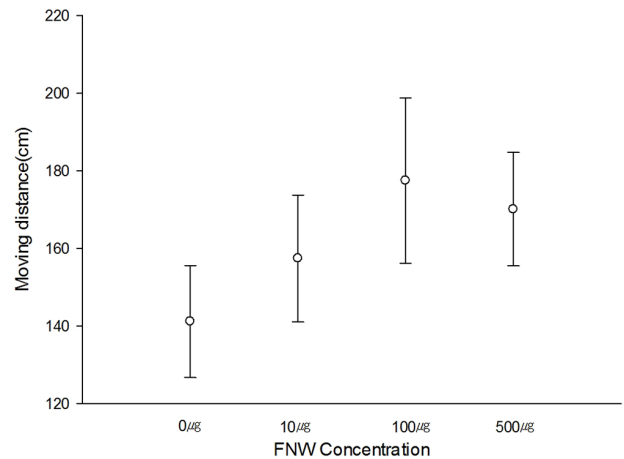


Fig. 7. Mean (±SE) of total moving distance for 3 minute(post-injection predator cue) of tadpoles according to FNW exposure concentration

500 μ g 그룹의 올챙이들과 FNW에 노출되지 ($F_{(3,224)}=3.545$, $p=0.015$; 10 μ g: $p=0.08$, 100 μ g: $p=0.002$, 500 μ g: $p=0.015$; Fig. 8).

FNW-Ag복합체 10 μ g 농도에 노출된 그룹의 올챙이들과 FNW-Ag복합체에 노출되지 않은 올챙이들의 평소 활동량에는 통계적인 차이가 없었지만, FNW-Ag복합체 50 μ g 농도에 노출된 올챙이들은 FNW-Ag복합체에 노출되지 않은 올챙이들보다 통계적으로 유의하게 적은 행동량을 보여주었다 ($F_{(2,169)}=4.655$, $p=0.011$; 10 μ g: $p=0.139$, 50 μ g: $p=0.003$; Fig. 9). 하지만 포식자 신호를 주입한 후에는 FNW-Ag복합체 10 μ g, 50 μ g 농도 그룹 모두 FNW-Ag복합체에 노출되지 않은 그룹의 올챙이들과 비교하였을 때 활동량의 차이가 나타나지 않았다($F_{(2, 169)}=0.912$, $p=0.404$; Fig. 10). 포식자 신호에 따른 행동감소율의 경우 FNW-Ag복합체 10 μ g, 50 μ g 그룹 모두 FNW-Ag복합체에 노출되지 않은 그룹의 올챙이들보다 통계적으로 더 적게 감소하였다($F_{(2,169)}=6.238$, $p=0.002$; 10 μ g: $p=0.025$, 50 μ g: $p<0.001$, Fig. 11).

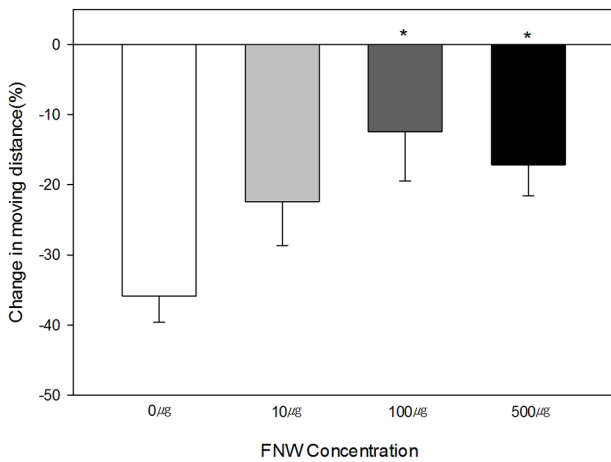


Fig. 8. Mean(\pm SE) proportion change in moving distance from the pre-injection predator cue for tadpoles exposed to predator cue (*: $p<0.05$)

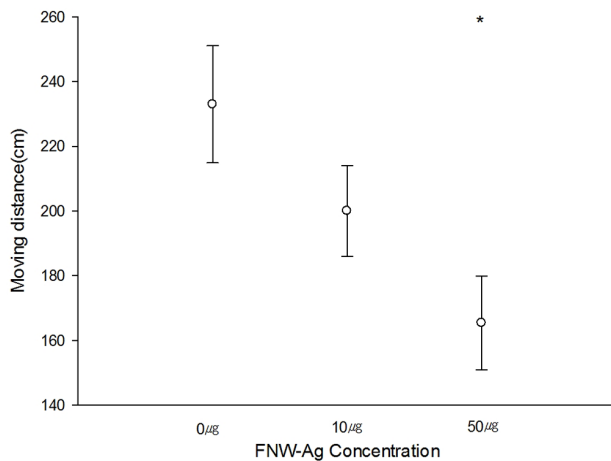


Fig. 9. Mean(\pm SE) of total moving distance for 3 minute(pre-injection predator cue) of tadpoles according to FNW-Ag exposure concentration (*: $p<0.05$)

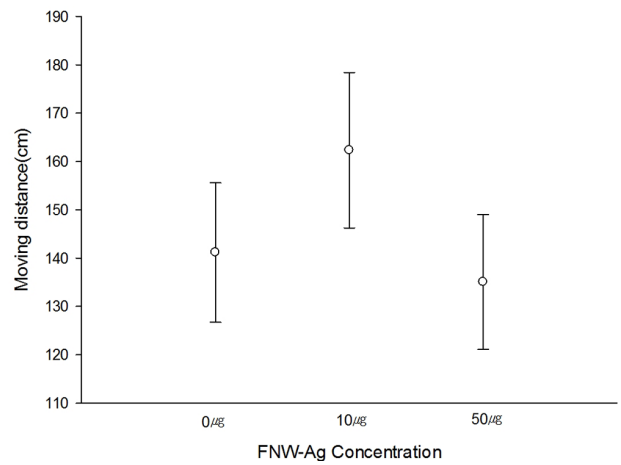


Fig. 10. Mean(\pm SE) of total moving distance for 3 minute(post-injection predator cue) of tadpoles according to FNW-Ag exposure concentration

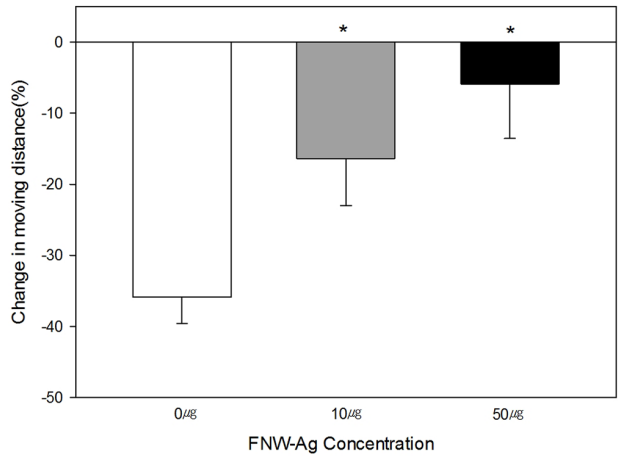


Fig. 11. Mean(\pm SE) proportion change in moving distance from the pre-injection predator cue for tadpoles exposed to predator cue (*: $p<0.05$)

4. 논 의

수중에서 유생시기를 보내는 양서류들의 경우 포식위험에 노출되었을 때 활동성을 감소시키는 방어 전략을 사용한다(Ferrari and Chivers, 2009). 활동성을 감소시키는 포식자 회피반응은 본 실험에서 사용된 북방산개구리 유생에서도 관찰 되었다. 하지만 FNW와 FNW-Ag복합체에 노출된 올챙이들에게서는 포식자에 의한 행동 감소율이 저하되는 것을 관찰 하였는데, 이는 자연생태계에서 FNW와 FNW-Ag복합체에 노출된 올챙이들은 포식자 출현 시 적절한 수준의 회피반응을 수행하지 못해 포식 위험이 증가한다는 것을 의미한다.

나노물질이 올챙이들의 행동학적 수준에 영향을 준 메커니즘을 크게 두 가지로 나누어 보았다. 우선 탄소 나노물질들이 올챙이의 근육 및 운동기관에 영향을 주어 적절한 행동변화를 방해하였을 것이다. Tervonen et al., (2010)에 의하면 탄소 나노물질이저서생물의 장기에 축적된다고 보고

한 바 있으므로, 양서류의 근육을 포함하는 장기에도 축적되어 정상적인 근육의 움직임을 방해했을 가능성이 존재한다. 본 실험에서 FNW-Ag복합체 50 μ g 농도에 노출된 올챙이들이 안전한 상황에서 활동량이 나노물질에 노출되지 않은 올챙이들보다 통계적으로 유의하게 적게 움직인 것을 고려해보면 정상적인 근육의 움직임에 문제가 있었을 것으로 충분히 추측해 볼 수 있다.

그 다음으로는 탄소나노물질이 올챙이의 화학신호 감지 과정에 부정적인 효과를 가져왔을 것이다. 시각적 제한이 있는 수중에서 서식하는 올챙이는 포식자에게서 분비되는 화학적 신호를 정확하게 감지하여야 적절한 방어행동을 취할 수 있는데, 나노물질이 올챙이가 포식자의 화학적 신호를 인식하는 다양한 감각기관에 직접적으로 영향을 주었거나, 수중생태계의 화학적 환경에 영향을 주어 간접적으로 화학적 밸런스를 붕괴시켜 올챙이의 포식자 인식과정을 방해 했을 수 있다. 어류를 대상으로 한 실험에서 일부 나노물질들이 어류의 감각기관을 손상시켜 화학신호를 정상적으로 인식하지 못하게 하였다고 발표하였다(Fabian et al., 2007; Seehausen et al., 1997). 과거 포식자의 화학신호 노출 수준과 오염물질의 농도에 따른 피식자의 사망률 증가에 관한 포식자-피식자 간의 상호작용에 대한 오염물질의 영향에 대한 연구가 이루어진 적이 있으며(Relyea, 2003, 2005; Relyea and Mills, 2001) 이외에도 오염물질들이 피식자의 포식압을 증가시킬 수 있다는 결과를 보여준 연구들이 수행 된 바 있다(Broomhall, 2002, 2004; Kim et al., 2015; Mandrillon and Saglio 2007; Ortiz-Santaliestra et al., 2011). FNW 100 μ g, 500 μ g 농도에 노출된 올챙이들이 안전한 상황과 포식자가 존재하는 상황 두 가지 모두 에서 나노물질에 노출된 경험이 없는 올챙이들과의 통계적인 차이가 나타나지 않았지만, 상황변화에 따른 행동 감소율을 분석하였을 때는 통계적인 차이가 나타났던 본 연구 결과를 살펴보면, FNW는 올챙이들의 운동능력이나 활력에는 큰 영향을 주지 않았지만 포식자-피식자간인식과정에 영향을 준 것으로 볼 수 있다. 과거 농약에 포함된 오염물질들이 수질악화와 더불어 수중생물들의 포식자 회피행동에 부정적인 영향을 준다는 것이 밝혀졌는데, 본 연구결과를 통해 FNW와 FNW-Ag복합체 같은 일부 제조나노물질들도 수중생물의 포식자 회피행동에 영향을 줄 수 있다는 것이 밝혀졌다. 지금까지 여러 연구들이 자연생태계에 존재하는 많은 화학오염물질들이 수중생물들의 방어행동을 포함한 다양한 행동들이 적절하게 일어나지 못하도록 한다고 밝혀냈다(Lefcort et al., 1998; Lüring, 2012; Mandrillon and Saglio, 2007; Raimondo et al., 1998; Troyer and Turner, 2015). 이처럼 다양한 연구들이 오염물질에 의한 포식자-피식자간 인식에 대하여 연구하고 있지만, 이에 대한 정확한 매커니즘을 밝혀내지는 못하였다.

References

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. [DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.489207>]

Baker, NJ, Bancroft, BA and Garcia, TS (2013). A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians, *Science of the total environment*, 449, pp. 150-156. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.056>]

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. [DOI: [10.1002/sml.200801716](https://doi.org/10.1002/sml.200801716)]

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. [DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh019>]

Boone, MD and Bridges-Britton, CM (2006). Examining multiple sublethal contaminants on the gray treefrog (*Hyla versicolor*): effects of an insecticide, herbicide, and fertilizer, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(12), pp. 3261-3265. [DOI: [10.1897/06-235R.1](https://doi.org/10.1897/06-235R.1)]

Brönmark, C and Hansson, LA (2000). Chemical communication in aquatic systems: an introduction, *Oikos*, 88(1), pp. 103-109. [DOI: [10.1034/j.1600-0706.2000.880112.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880112.x)]

Broomhall, SD (2002). The effects of endosulfan and variable water temperature on survivorship and subsequent vulnerability to predation in *Litoria citropa* tadpoles, *Aquatic Toxicology*, 61(3), pp. 243-250. [DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00061-9)]

Broomhall, SD (2004). Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog, *J. of Applied Ecology*, 41(1), pp. 105-113. [DOI: [10.1111/j.1365-2664.2004.00883.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2004.00883.x)]

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. [DOI: [10.1039/B9NR00053D](https://doi.org/10.1039/B9NR00053D)]

Chivers, DP and Smith, RJF (1998). Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus, *Ecoscience*, 5(3), pp. 338-352. [DOI: <https://doi.org/10.1080/11956860.1998.11682471>]

Egea-Serrano, A, Relyea, RA, Tejedo, M and Torralva, M (2012). Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review, *Ecology and evolution*, 2(7), pp. 1382-1397. [DOI: [10.1002/ece3.249](https://doi.org/10.1002/ece3.249)]

Fabian, NJ, Albright, LB, Gerlach, G, Fisher, HS and Rosenthal,

- GG (2007). Humic acid interferes with species recognition in zebrafish (*Danio rerio*), *J. of chemical ecology*, 33(11), pp. 2090–2096. [DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9377-z>]
- Ferrari, MC and Chivers, DP (2009). Temporal variability, threat sensitivity and conflicting information about the nature of risk: understanding the dynamics of tadpole antipredator behavior, *Animal Behaviour*, 78(1), pp. 11–16. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.03.016>]
- FraseR, TW, Reinardy, HC, Shaw, BJ, Henry, TB and Handy, RD (2011). Dietary toxicity of single-walled carbon nanotubes and fullerenes (C₆₀) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Nanotoxicology*, 5(1), pp. 98–108. [DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.502978>]
- 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. [DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.562328>]
- Gosner, KL (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification, *Herpetologica*, 16(3), pp. 183–190.
- Gottschalk, F, Sonderer, T, Scholz, RW and Nowack, B (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions, *Environmental science & technology*, 43(24), pp. 9216–9222. [DOI: [10.1021/es9015553](https://doi.org/10.1021/es9015553)]
- Hayes, TB, Falso, P, Gallipeau, S and Stice, M (2010). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective, *J. of Experimental Biology*, 213(6), pp. 921–933. [DOI: [10.1242/jeb.040865](https://doi.org/10.1242/jeb.040865)]
- Heinlaan, M, Ivask, A, Blinova, I, Dubourguier, HC and Kahru, A (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*, *Chemosphere*, 71(7), pp. 1308–1316. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.047>]
- Holomuzki, JR (1995). Oviposition sites and fish-deterrent mechanisms of two stream anurans, *Copeia*, pp. 607–613. [DOI: [10.2307/1446757](https://doi.org/10.2307/1446757)]
- Hu, CW, Li, M, Cui, YB, Li, DS, Chen, J and Yang, LY (2010). Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*, *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), pp. 586–591. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.12.007>]
- 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. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.034>]
- 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 journal of pharmaceuticals*, 105(2), pp. 157–168. [DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90461-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90461-8)]
- Johansson, BG and Jones, TM (2007). The role of chemical communication in mate choice, *Biological Reviews*, 82(2), pp. 265–289. [DOI: [10.1111/j.1469-185X.2007.00009.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00009.x)]
- Kats, LB and Dill, LM (1998). The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals, *Ecoscience*, 5(3), pp. 361–394. [DOI: <https://doi.org/10.1080/11956860.1998.11682468>]
- Kiesecker, JM, Chivers, DP and Blaustein, AR (1996). The use of chemical cues in predator recognition by western toad tadpoles, *Animal Behaviour*, 52(6), pp. 1237–1245. [DOI: <https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0271>]
- Kim, EJ, Ko, WB, Han, E, Kim, HJ, Ko, JW and Chung, H (2015). Effects of Gold Nanoparticles on eggs and tadpoles of *Rana dybowskii*, *J. of Wetlands Research*, 17(4), pp. 407–413. [DOI: [10.17663/JWR.2015.17.4.407](https://doi.org/10.17663/JWR.2015.17.4.407)]
- Kisin, ER, Murray, AR, Keane, MJ, Shi, XC, Schwegler-Berry, D, Gorelik, O, Arepalli, S, Casrtamova, 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. [DOI: <https://doi.org/10.1080/15287390701601251>]
- Lee, JH, Park, BE, Lee, YM, Hwang, SH and Ko, WB (2009). Synthesis of fullerene [C₆₀]-silver nanoparticles using various non-ionic surfactants under microwave irradiation, *Current Applied Physics*, 9(2), pp. e152–e156. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cap.2008.12.048>]
- Lefcort, H, Meguire, RA, Wilson, LH and Ettinger, WF (1998). Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(3), pp. 447–456. [DOI: <https://doi.org/10.1007/s002449900401>]
- Li, H, Zhang, J, Wang, T, Luo, W, Zhou, Q and Jiang, G (2008). Elemental selenium particles at nano-size (Nano-Se) are more toxic to Medaka (*Oryzias latipes*) as a consequence of hyper-accumulation of selenium: a comparison with sodium selenite, *Aquatic toxicology*, 89(4), pp. 251–256. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.008>]
- 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. [DOI: [10.1021/](https://doi.org/10.1021/)

- es060589n]
- 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. [DOI: <https://doi.org/10.1080/17435390801935960>]
- Lüring, M (2012). Infodisruption: pollutants interfering with the natural chemical information conveyance in aquatic systems. *Chemical Ecology in Aquatic Systems*, C Brönmark and L-A Hansson (eds.) Oxford university press, New York, pp. 250–271.
- Mandrillon, AL and Saglio, P (2007). Herbicide exposure affects the chemical recognition of a non native predator in common toad tadpoles (*Bufo bufo*), *Chemoecology*, 17(1), pp. 31–36. [DOI: <https://doi.org/10.1007/s00049-006-0354-8>]
- Oberdörster, E (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass, *Environmental health perspectives*, pp. 1058–1062. [DOI: [10.1289/ehp.7021](https://doi.org/10.1289/ehp.7021)]
- Ortiz-Santaliestra, ME, Marco, A and Lizana, M (2011). Realistic levels of a fertilizer impair Iberian newt embryonic development, *Herpetologica*, 67(1), pp. 1–9. [DOI: <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-10-0001.1>]
- Pakarinen, K, Petersen, EJ, Leppänen, MT, Akkanen, J and Kukkonen, JVK (2011). Adverse effects of fullerenes (nC₆₀) spiked to sediments on *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta), *Environmental pollution*, 159(12), pp. 3750–3756. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.014>]
- 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. [DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.562325>]
- Petersen, EJ and Henry, TB (2012). Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon nanotubes and fullerenes: review, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), pp. 60–72. [DOI: [10.1002/etc.710](https://doi.org/10.1002/etc.710)]
- Raimondo, SM, Rowe, CL and Congdon, JD (1998). Exposure to coal ash impacts swimming performance and predator avoidance in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*), *J. of Herpetology*, 32(2), pp. 289–292. [DOI: [10.2307/1565313](https://doi.org/10.2307/1565313)]
- Relyea, RA (2003). Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians, *Ecological Applications*, 13(6), pp. 1515–1521. [DOI: [10.1890/02-5298](https://doi.org/10.1890/02-5298)]
- Relyea, RA (2005). The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(3), pp. 351–357. [DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0086-0>]
- Relyea, RA and Mills, N (2001). Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), pp. 2491–2496. [DOI: [10.1073/pnas.031076198](https://doi.org/10.1073/pnas.031076198)]
- 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. [DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03216589>]
- 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 CeO₂ nanoparticles using two aquatic microorganisms, *Toxicological Sciences*, 119(1), pp. 135–145. [DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq311>]
- Seehausen, O, Van Alphen, JJ and Witte, F (1997). Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection, *Science*, 277(5333), pp. 1808–1811. [DOI: [10.1126/science.277.5333.1808](https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1808)]
- Stauffer, HP and Semlitsch, RD (1993). Effects of visual, chemical and tactile cues of fish on the behavioural responses of tadpoles, *Animal Behaviour*, 46(2), pp. 355–364. [DOI: <https://doi.org/10.1006/anbe.1993.1197>]
- 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. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.10.002>]
- 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. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.03.001>]
- 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. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.044>]
- Tervonen, K, Waissi, G, Petersen, EJ, Akkanen, J and Kukkonen, JV (2010). Analysis of fullerene-C₆₀ and kinetic measurements for its accumulation and depuration in *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(5), pp. 1072–1078. [DOI: [10.1002/etc.124](https://doi.org/10.1002/etc.124)]
- Thostenson, ET, Ren, Z and Chou, TW (2001). Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review, *Composites science and technology*, 61(13), pp. 1899–1912. [DOI: <https://doi.org/10.1016/>

- S0266-3538(01)00094-X]
- Troyer, RR and Turner, AM (2015). Chemosensory perception of predators by larval amphibians depends on water quality, *PloS one*, 10(6), pp. e0131516. [DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131516>]
- 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. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.09.006>]
- 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. [DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.604440>]
- Van Hoecke, K, De Schampelaere, KAC, Ali, Z, Zhang, F, Elsaesser, A, Rivera-Gil, P, Parak, WJ, Smaghe, G, Howard, CV and Janssen, CR (2013). Ecotoxicity and uptake of polymer coated gold nanoparticles, *Nanotoxicology*, 7(1), pp. 37-47. [DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.626566>]
- Waissi-Leinonen, GC, Petersen, EJ, Pakarinen, K, Akkanen, J, Leppänen, MT and Kukkonen, JV (2012). Toxicity of fullerene (C₆₀) to sediment-dwelling invertebrate *Chironomus riparius* larvae, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(9), pp. 2108-2116. [DOI: [10.1002/etc.1926](https://doi.org/10.1002/etc.1926)]
- Wilson, DJ and Lefcort, H (1993). The effect of predator diet on the alarm response of red-legged frog, *Rana aurora*, tadpoles, *Animal Behaviour*, 46(5), pp. 1017-1019. [DOI: <https://doi.org/10.1006/anbe.1993.1285>]
- Wolf, MC and Moore, PA (2002). Effects of the herbicide metolachlor on the perception of chemical stimuli by *Orconectes rusticus*, *J. of the North American Benthological Society*, 21(3), pp. 457-467. [DOI: <https://doi.org/10.2307/1468482>]
- 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. [DOI: [10.1002/smll.201000989](https://doi.org/10.1002/smll.201000989)]