

방사성동위원소 추적자 기법을 이용한 제조나노입자로 오염된 토양으로부터 지렁이(*Eisenia fetida*)의 은과 아연 축적 연구

이승하, 이병권*

전남대학교 자연과학대학 해양학과

Bioaccumulation of Ag and Zn in earthworms (*Eisenia fetida*) from soil contaminated with Ag and Zn nanoparticles using a radiotracer method

Seung Ha Lee and Byeong-Gweon Lee*

Department of Oceanography, Chonnam National University, GwangJu 61186, Republic of Korea

***Corresponding author**

Byeong-Gweon Lee
Tel. 062-530-3467
E-mail. blee@jnu.ac.kr

Received: 7 December 2021

Revised: 13 December 2021

Revision accepted: 14 December 2021

Abstract: In a radiotracer study, the bioaccumulation and efflux of metals in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to soil spiked with ZnO and Ag nanoparticles (AgNP) were compared to those exposed to soil spiked with ionic Zn and Ag. Additionally, the bioavailability and chemical mobility of nano- and ionic metals in the soil were estimated using the sequential extraction method and compared to the bioaccumulation factor (BAF). The BAF for ZnO (0.06) was 31 times lower than that for Zn ions (1.86), suggesting that ZnO was less bioavailable than the ionic form in contaminated soil. In contrast, the BAFs for two types of AgNPs coated with polyvinylpyrrolidone (0.12) or citrate (0.11) were comparable to those of ionic Ag (0.17). The sequential extraction of metals from the soil suggests that the chemically mobile fractions in the Zn ion treatment were higher (35%) than those (< 20%) in the Ag ion treatment, which was consistent with the greater BAFs in the former than the latter. However, the chemical mobility in the ZnO treatments did not predict bioavailability. The efflux rates of Ag (3.2–3.8% d⁻¹) in the worms were 2–3 × those (1.2–1.7% d⁻¹) for Zn.

Keywords: earthworm (*Eisenia fetida*), metal bioaccumulation, nanoparticle, radiotracer method, radiotracer

서 론

나노 과학과 기술의 발달로 제조나노물질의 생산이 급증하고 이들의 활용 분야 또한 확대되고 있는 추세다. 특히, 은 나노입자(AgNPs)와 산화아연입자(ZnO)는 고유의 물

리화학적 특징, 산업적 중요도 때문에 가장 많은 주목을 받고 있다(Jankovic and Plata 2019). AgNPs는 항균성을 갖는 특징 때문에 의류, 탈취제, 세척기, 의약산업, 폐수처리 그리고 농업 등에 광범위하게 적용되고 있다(Adeel *et al.* 2021). ZnO는 페인트, 화장품, 플라스틱을 비롯하여 UV로부터 세

포의 손상을 막아주는 특성 때문에 자외선차단제에 많이 이용되고 있다(Ma *et al.* 2013). 나노물질의 생산, 운반, 사용 그리고 폐기 과정을 통해서 나노물질들은 환경에 유입, 다양한 환경 매질에 분배, 생물에 축적 그리고 환경적 위해성이 증가할 것으로 예상되며, 많은 연구들이 이를 입증하고 있다(Nowack *et al.* 2013). 여러 경로를 통해 환경에 유입된 나노물질들의 양과 농도는 모델링을 통해 예측될 수 있고, 이들은 수서환경보다는 퇴적물, 오니 그리고 토양이 최종 제거원이 될 것으로 예측하고 있다(Gottschalk *et al.* 2009; Wang and Nowack 2018).

토양에 유입된 나노물질은 토양의 다양한 지화학적 조건에 따라 물리적, 화학적 그리고 생물학적 변형 과정을 거치면서 토양에 서식하는 다양한 생물들에게 악영향을 준다고 보고되고 있다(Rocha *et al.* 2017). 특히, 지렁이는 생태학적 지위와 역할 때문에 다양한 오염물질뿐만 아니라 나노물질의 토양에서 위해성 평가를 위한 표준 모델 시험생물로 사용되고 있다(ISO 11268-1 2011; OECD 2016).

토양환경에서 은이나 아연 나노입자에 대한 위해성 평가를 위해 급성 및 만성 독성의 연구는 상당히 많이 이루어졌으며, 독성의 발현은 세포 이하 수준에서부터 개체의 사망에 이르기까지 다양한 생물학적 독성 수준에서 나타나고 있다(Adeel *et al.* 2021). 하지만, 나노물질들의 life cycle 모델을 통해서 토양에 유입된 나노물질의 농도가 매우 낮을 것으로 예측되기 때문에(Gottschalk *et al.* 2009; Wang and Nowack 2018), 환경적으로 의미가 있는 낮은 농도에서 나노입자의 지화학적 거동이나 생물로의 전이에 대한 연구는 중요하다. 즉, 실제 환경에서 잠재적 노출은 급성독성보다는 생물축적을 통해서 이루어지고 만성 독성으로 나타날 가능성이 높다고 볼 수 있다(Hou *et al.* 2013). 또한 생물농축계수(bioaccumulation factor 또는 bioconcentration factor)는 미국(U.S. Environmental Protection Agency)이나 유럽연합(Registration, Evaluation, and Authorization of Chemicals (REACH) of the European Commission) 규제 기관의 오염물질 노출평가의 지표로 사용되고 있다.

토양과 생물에는 상당히 높은 농도의 금속을 이미 포함하고 있기 때문에, 고농도의 금속나노물질을 첨가하지 않고 낮은 농도에서는 기존에 토양과 생물에 축적된 금속과 구별하고 정량하는 데 방법적 한계가 있다. 예로서, 아연의 경우 오염되지 않은 토양에서 미국은 평균 $56.5 \text{ mg Zn Kg}^{-1}$ 그리고 유럽 대부분 나라에서는 평균 68 mg Zn Kg^{-1} 의 농도 범위를 보이고(Alloway 2008), 나노아연에 기인한 아연의

농도가 하수종말처리장 슬러지로 처리된 토양에서 $3.2 \sim 32 \text{ mg Zn Kg}^{-1}$ 로 예측되고 있다(Gottschalk *et al.* 2009). 하지만, 기존 연구들에서는 토양에 $100 \sim 6,400 \text{ mg Zn Kg}^{-1}$ 범위의 아연 나노입자를 첨가하여 생물농축 실험을 진행하였는데(Laycock *et al.* 2016), 이렇게 높은 농도를 첨가하지 않으면 비교군에 비해 처리군의 생물 축적에 유의한 변화가 일어나지 않기 때문이다.

본 연구에서는 감마 방사성동위원소로 금속나노입자를 합성하여, 이를 추적자로 이용하여 환경적으로 의미가 있는, 선행 연구들보다 훨씬 낮은 농도에서, 나노입자로 오염된 토양과 생물체 내 Ag과 Zn의 거동을 파악하고자 하였다. 방사성동위원소 추적자 기법은 매우 민감하여 낮은 농도에서 측정이 가능하고, 생물을 희생시키지 않고 한 개체의 체내 농도 변화를 정량적으로 추적 가능하게 한다. 기존 나노입자 합성 방법에 ^{65}Zn 이온과 $^{110\text{m}}\text{Ag}$ 이온을 첨가하여, ^{65}ZnO 산화아연 나노입자와 두 종류의 은 나노입자, PVP (polyvinylpyrrolidone) 또는 citrate로 코팅된 $^{110\text{m}}\text{Ag}(0)$ 를 합성하였다. 이들 나노입자들은 가장 보편적으로 위해성 평가에 사용되는 제품들이다. 이들 나노입자로 오염된 토양과 대조구로 은과 아연이온으로 오염된 토양에서 지렁이(*Eisenia fetida*)의 생물축적과 제거를 측정하였다. 또한, 다단계추출법(Sequential Extraction)을 이용하여 토양 내 금속의 결합 특성 및 생물이용도(bioavailability)를 예측하고 이를 생물 축적과 비교하였다.

재료 및 방법

1. 나노입자의 합성 및 특성

본 연구에서는 감마 동위원소 ^{65}Zn 와 $^{110\text{m}}\text{Ag}$ 를 이용하여 ^{65}ZnO 나노입자와 PVP (polyvinylpyrrolidone)로 코팅된 $^{110\text{m}}\text{Ag}$ 나노입자와 citrate로 코팅된 $^{110\text{m}}\text{Ag}$ 나노입자를 합성하였다. ZnO를 합성하기 위해 Jezequel *et al.* (1995)의 방법을 수정하여 이용하였다. 반응플라스크에 60 mM zinc acetate ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99% purity, Kanto chemical, Japan), 20 mL diethyleneglycol (DEG, 99% purity, Dae-jung chemical, Korea)과 ^{65}Zn (as ZnCl_2 , Perkin Elmer, USA)을 함께 첨가해 주었다. Zinc acetate가 DEG에 완전히 녹은 후 100°C 에서 가열한 후 180°C 에서 1시간 동안 가열하여 ^{65}ZnO 를 합성하였고, 상온이 될 때까지 교반시켜 주었다. 이후 생성된 ^{65}ZnO 콜로이드 용액을 $23,000 \times \text{g}$ 로 20분 동

안 원심분리시켜 상층액을 버렸고, 남겨진 ^{65}ZnO 입자에 증류수를 첨가하여 혼합한 후 같은 방법으로 원심분리하였다.

PVP로 코팅 시킨 은 나노입자는 Arshi *et al.* (2011)의 방법을 일부 수정하여 합성하였고, 합성 과정 중 아세톤에 PVP ($(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$, Sigma Aldrich, USA)와 AgNO_3 (99% purity, Sigma Aldrich, USA)을 첨가하여 합성하였다. 먼저 50 mg AgNO_3 를 0.15 mL 증류수에 용해시킨 다음 아세톤 40 mL와 ^{110m}Ag (as AgNO_3 , Korea Atomic Energy Research Institute)을 첨가하여 20분 동안 교반시켜 주었고 이후 PVP 1.6g을 첨가한 후 40분 동안 혼합시켜 주었다. 이후 갈색의 끈적한 덩어리가 생성되면 남아있는 아세톤을 제거하고 증류수 50 mL를 첨가하여 이 용액을 10일 동안 교반시켜 PVP로 코팅된 $^{110m}\text{AgNP}$ -PVP를 합성하였다.

Citrate로 코팅 시킨 은 나노입자는 Chinnapongse *et al.* (2011)의 방법에 따라 제조하였다. 먼저 58.8 mM AgNO_3 0.845 mL와 ^{110m}Ag (as AgNO_3)를 20 mL 증류수에 첨가하고 약하게 가열하면서 교반시켜 합성을 진행하였다. 34 mM sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99% purity, Junsei Chemical) 1.46 mL을 한 방울씩 첨가하였고, 100 mM Sodium borohydride (NaBH_4 , 99% purity, Alfa Aesar, USA)를 천천히 한 방울씩 첨가하여 용액의 색상이 변한 후 30분 반응시켰다. 이후 이 용액을 실온에서 식혀주어 citrate로 코팅된 은 나노입자(AgNP -citrate)를 합성하였다.

합성된 나노입자들은 0.1 M EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)로 씻어서 입자 표면에 흡착되어 있는 방사성동위원소의 방사능을 제거하였다. 제조된 나노입자의 형태와 크기 및 구성원소를 알아보기 위하여 투과전자현미경과 엑스선 분광계를 이용하였다.

2. 실험생물 배양 및 실험토양제조

본 연구에서 사용된 지렁이 (*Eisenia fetida*)는 전라남도 화순군의 지렁이 사육 농가에서 구입했으며, 실험 7일 전부터 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 사육온도에서 배양되었고, 실험에는 지렁이의 체중이 300~600 mg인 성체를 선택하여 이용하였다. 실험에 사용된 인공토양은 OECD Guideline (OECD 1984)에서 제시한 방법을 변형하여 조제하였다. 본 실험에서 인공토양 제조는 OECD Guideline에 따라 이루어졌고, 토양의 양, 노출시간 그리고 생물로부터 축적된 금속의 배출 등은 본 실험의 목적에 맞게 변형하여 사용하였다. 이러한 변형

은 방사성물질로부터 노출과 방사성폐기물 생성을 최소화하기 위해 필요한 조치였다. 물이끼 토탄 (Sphagnum peat)과 카올리나이트 점토 그리고 석영을 1:2:7의 비율로 사용하였으며, pH는 CaCO_3 를 이용하여 7.0 ± 0.5 가 되도록 조절하였고, 수분은 30%가 되도록 하였다.

인공토양에 나노입자를 첨가하기 위해 나노입자를 증류수로 실험 농도에 맞게 희석한 후, 나노입자의 응집을 최소화하기 위해 30초간 음파처리해 주었고, 이후 준비된 토양을 25 mL 바이알에 5g 넣어준 후 ^{65}ZnO , $^{110m}\text{AgNP}$ -PVP와 $^{110m}\text{AgNP}$ -citrate를 3 mL씩 첨가하여 나노입자의 농도를 $100 \text{ mg Zn Kg}^{-1}$ 와 $2.50 \text{ mg Ag Kg}^{-1}$ 로 맞춰 주었다. 위 나노입자들의 거동과 기존에 잘 알려진 금속이온의 거동을 비교하기 위해 용존상의 $\text{ZnCl}_2 + ^{65}\text{ZnCl}_2$ 와 $\text{AgNO}_3 + ^{110m}\text{AgNO}_3$ 를 첨가하여 농도가 위 나노입자들의 농도와 같아지도록 하였다.

3. 생물농축계수(Bioaccumulation Factor, BAF)

실험에 사용된 지렁이는 실험 24시간 전 탈장과정을 거친 후, 5g의 각 금속으로 오염된 토양이 담긴 바이알에 각각 한 마리씩 넣어주었으며, 각 처리구에 5개의 반복수를 두었다. 지렁이는 총 10일간의 노출기간 동안 노출 직후, 2, 5, 7일째 방사능을 측정했다. 방사능 측정을 위하여 지렁이는 깨끗한 토양으로 옮겨져 6시간의 탈장과정을 거친 후, 지렁이 표면에 남아있는 토양을 증류수로 제거한 후 무게를 측정하고 방사능을 3분간 측정하였다. 탈장시간은 지렁이의 섭취된 먹이의 장내 체류시간이 $18 \sim 23^\circ\text{C}$ 에서 3.6~5.2 h로 보고되어서 6시간을 선택하였다 (Cosin *et al.* 2002). 방사능 측정이 끝난 후 실험생물은 다시 실험용기로 옮겨져 계속하여 노출되었다. 10일간의 노출기간이 끝난 지렁이는 24시간 동안 탈장과정을 거친 이후 오염되지 않은 토양이 든 바이알로 옮겨 총 7일간 금속을 제거하도록 하였으며 2일째, 7일째에 생물을 꺼내어 체내 방사능을 측정하였다. 매 측정 시, 생물 체내에 금속 축적을 파악하기 위해 생물농축계수를 산출하였고, 생물농축계수는 생물 체내 금속의 농도를 토양 내 금속의 농도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{BAF} = \frac{C_{\text{org}}}{C_s}$$

여기서, C_{org} = 생물 체내 농도, C_s = 토양에서 농도

10일 노출기간 동안 산출된 BAF는 방사능을 측정할 때 마다 6시간 동안 오염되지 않은 토양에서 탈장시켰기 때문에 연속 노출을 통한 BAF보다는 낮은 값을 나타낼 것이다. 이를 고려하면 2, 5, 7일째 측정된 BAF는 각각 약 13, 10 그리고 11% 정도 과소평가되었을 것으로 추정된다. 하지만, 탈장과정을 거치지 않으면 장내 소화 흡수되지 않은 내용물에 함유된 금속으로 인해 BAF가 과대평가되는 오류를 범할 수 있어 이러한 탈장과정이 필요하였다. 이러한 효과가 각 처리구 간 동일하게 이루어져서 각 처리구 간 BAF 비교에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 판단되어, 결과에 보고된 BAF 자료는 이에 대한 보정을 하지 않았다.

4. 다단계추출법(Sequential Extraction)

토양 내 각 금속의 결합특성과 생물이용도(bioavailability)를 비교하고자 다단계추출법을 이용하였다. 다단계추출법은 Tessie *et al.* (1979)과 Clark *et al.* (1996)에서 제시한 방법을 일부 수정하여 적용시켰다. 먼저 나노입자가 포함된 토양을 60°C에서 24시간 건조시켜 약 1g을 취하였고 이를 50 mL polypropylene centrifuge tubes에 담아 추출을 진행하였으며 4개의 반복수를 두었다. 첫 번째로 토양 시료에 8 mL의 증류수를 첨가한 후 상온에서 1시간 동안 교반시켜 준 후 water fraction (F1)을 추출하였고 다시 0.5 M MgCl₂ (pH 7.0) 8 mL를 첨가하여 exchangeable fraction (F2)을 추출하였다. 이후, 1 M NaOAc (pH 5.0 with HOAc) 8 mL를 첨가한 후 20°C에서 5시간 동안 교반시켜 carbonate fraction (F3)를, 0.04 M NH₂OH·HCl (in 25% HOAc) 20 mL를 첨가한 후 80°C에서 6시간 동안 교반시켜 Fe-Mn oxides fraction (F4)를 추출하였다. 최종적으로 0.02 M HNO₃ 3 mL와 30% H₂O₂ (pH 2.0) 5 mL를 넣은 후 80°C에서 2시간, 30% H₂O₂ 3 mL를 첨가해 3시간 동안 추가 교반시킨 후 실온으로 식혀주었고, 3 mL 3.2 M NH₄OA (in 20% HNO₃)를 첨가해 30분간 교반시켜 주어 최종적으로 organic fraction (F5)과 residual (F6)을 얻었다.

5. 방사능 분석 및 통계처리

방사성 동위원소의 방사능(radioactivity)은 gamma counter (Wallac 1480 wizard, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 측정하였다. ⁶⁵Zn와 ⁶⁵ZnO ($t_{1/2}=244.1$ d)는 1,115 keV, ^{110m}Ag와 ^{110m}AgNP-PVP, ^{110m}AgNP-citrate ($t_{1/2}=250.4$ d)는 658

keV에서 방사능을 측정하였다. 모든 샘플의 측정 시간은 3분으로 하고, 측정 에러(propagated error)는 5% 이내였다. 방사능의 측정 시 적절한 배경시료를 이용하여 배경방사능은 보정되었다. 모든 분당 붕괴율(disintegration per min, dpm)은 반감기를 고려하여 수정하고, cpm(count per min)으로 나타낸 원본 자료는 적절한 기준과 반감기 조정을 이용하여 dpm(disintegration per min)으로 전환하였다. 통계 처리는 일원배치 분산분석을 통하여 분석하였으며 통계적인 유의성은 항상 $p=0.05$ 에서 검증되었고, 모든 통계적인 분석은 SPSS를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 나노입자 특성

합성한 산화아연 나노입자는 타원 형태로 22.13 ± 8.76 nm 사이즈를 나타냈으며, EDX를 통해 측정된 결과 이들 입자가 Zn로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). PVP와 citrate로 코팅된 은 나노입자는 대부분 구 형태를 보였고 크기는 각각 9.40 ± 2.99 nm와 13.10 ± 2.44 nm로 나타났다. 두 나노물질 모두 Ag로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 합성을 위해 첨가한 방사성동위원소들의 90% 이상이 나노입자로 생성되어서 합성효율은 90% 이상이었다. 합성을 통해 생성된 나노입자들을 EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid)로 씻어준 결과 나노입자 표면에 흡착된 동위원소는 미미하였다. 이는 방사성동위원소들이 나노입자의 생성과정에서 주 원료인 안정성 원소들과 평형(isotopic equilibrium)을 이루고 있었음을 제시해 준다. 따라서, 합성된 나노입자 내 방사성동위원소는 나노입자들의 환경이나 생물 내 거동을 추적하는 데 유용하게 이용될 것으로 판단된다. 기존 몇몇 연구에서 안정성 동위원소(Dybowska *et al.* 2011; Khan *et al.* 2013)나 방사성동위원소(Li and Wang 2013)를 이용해 나노입자의 수생생물의 금속추적 연구는 존재하나 토양에 적용한 연구에 대한 보고는 찾을 수 없었다.

2. 금속의 생물 추적 및 배출

산화아연 나노입자로 오염된 토양으로부터 지렁이는 아연을 추적하였으나 아연이온으로 오염된 토양에 비해 미

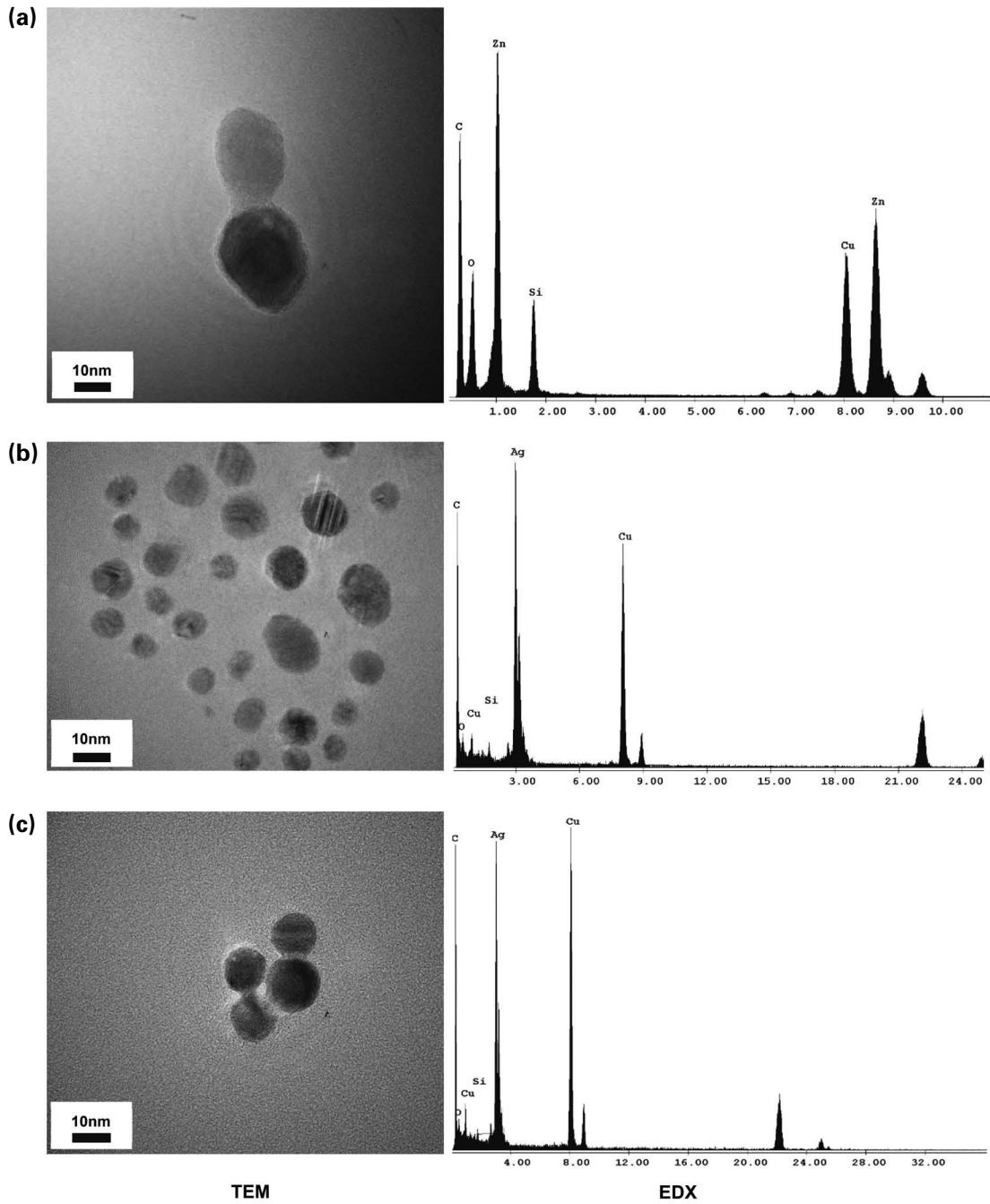


Fig. 1. TEM (transmission electron microscopy) image and EDX (energy-dispersive X-ray spectroscopy) data of laboratory-synthesized ZnO nanoparticles (a), PVP (polyvinylpyrrolidone)-capped Ag(0) nanoparticles (b), and citrate-capped Ag(0) nanoparticles (c).

미한 흡수를 보였다. 산화아연 나노입자와 아연이온이 첨가된 토양에 노출되었던 지렁이들의 BAF는 노출기간 동안 계속 증가하였으며, 각각 노출 7일째 0.06과 1.86으로 약 31배 정도의 유의한 차이가 나타났다($p < 0.01$, Fig. 2).

방사능 측정을 위해 지렁이를 오염된 토양으로부터 제거하여 6시간 동안 탈장시킨 전과 후 체내 방사능을 측정하였는데, 산화아연 나노입자와 아연이온에 오염된 토양에 노출되었던 생물들은 탈장과정을 통해 각각 약 63%와

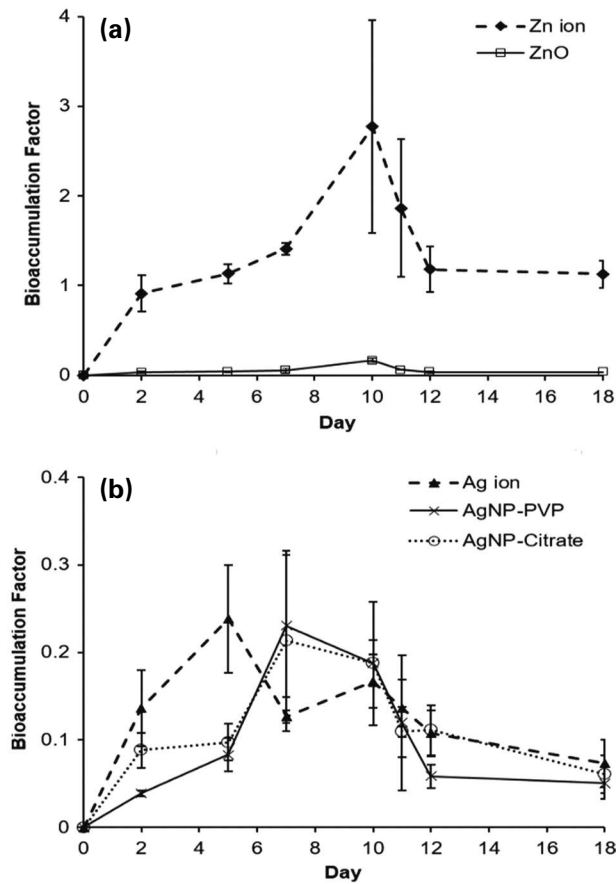


Fig. 2. Bioaccumulation factor (BAF) of Zn in worms exposed to soil contaminated with either Zn ions or ZnO nanoparticles (a) and the BAF of Ag with Ag ion, PVP-capped Ag(0) nanoparticles (AgNP-PVP), or citrate-capped Ag(0) nanoparticles (AgNP-citrate) (b) during 10-d exposure and 8-d depuration periods.

12.8%의 아연을 제거하였다. 먹이섭식을 통한 금속의 흡수 효율(dietary assimilation efficiency)의 측정은 탈장 후 체내에 남아있는 농도와 먹이를 섭식시킨 직후 체내 농도의 비로 나타내기 때문에 (Croteau *et al.* 2007), 위 결과는 섭식 경로를 통한 금속의 체내 흡수효율 차이를 간접적으로 제시한다고 볼 수 있다. 토양에 함유된 금속은 체내로 섭식된 후 소화과정에서 일부분만 장막을 통해 흡수되고 나머지는 배설물로 배출되어서 나타난 결과이고, 이는 산화아연의 낮은 BAF와 일치한다.

실험생물의 금속축적은 섭식경로와 표피를 통한 흡수 경로를 통해 이루어졌을 것으로 추정되고, 본 연구에서 상대적 기여도는 파악할 수 없었다. 두 흡수 경로의 상대적 중요성은 금속의 토양에서 입자상과 용존상 간의 분배 계수(distribution coefficient)를 포함한 지화학적 요인뿐만 아

니라 먹이 섭식을 통한 흡수 효율(assimilation efficiency), 표피를 통한 용존 금속의 흡수 효율(influx rate), 제거율(efflux rate) 등의 독성역학에 영향을 받을 것이다. Laycock *et al.* (2015)는 나노아연으로 오염된 토양에서 지렁이는 섭식을 통해서 95% 정도 나머지 5%는 표피흡수를 통해서 아연을 축적한다고 보고하였다. Romero-Freire *et al.* (2017)은 $500 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ 토양에서 공극수의 용존 아연의 농도가 나노아연 처리구보다 이온성 아연 처리구에서 10배 더 높게 나타난다고 보고하고 있다. 따라서, 이온성 아연 처리구의 지렁이는 표피를 통해서 공극수의 용존 아연을 상대적으로 더 흡수했을 것으로 추정된다.

본 연구에서 측정된 BAF는 지렁이를 56 mg Zn kg^{-1} 아연이온 농도에 노출시킨 후 산출된 BAF 2.3 (Koen 2001)과 $100 \sim 5,000 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ 산화아연 농도에 노출하여 얻은 BAF (0.01~0.37) 값 (Hu *et al.* 2010)과 근사한 범위를 보인다. 이와 유사하게, He *et al.* (2019)은 14일간 오염된 토양에 노출된 지렁이의 아연 흡수율이 이온성 아연 처리구에서 나노아연 처리구보다 2~3배 더 높게 나타남을 보고하고 있다.

은의 경우 앞서 언급된 아연의 경우와 마찬가지로 나노입자와 이온 형태의 은으로 오염된 토양으로부터 지렁이 체내로 축적은 되었으나, 은의 오염 형태에 따른 차이는 미미하였다(Fig. 2). 은의 축적은 나노물질 처리구에서 노출 7일까지 증가하고, 은이온 처리구에서는 5일까지 증가하다가 감소하는 경향을 보인다. 노출 7일 후 모든 처리구에서 은의 BAF는 유의한 차이 없이 ($p > 0.05$), 0.17~0.23의 범위를 보인다.

지렁이의 은 축적은 아연에 비해 개체 간 노출기간 간 변이가 매우 크게 나타났다(Fig. 2). 은은 아연에 비해 독성이 훨씬 강한 금속으로 알려져 있으며, Shoults-Wilson *et al.* (2011a)은 약 7 mg Ag kg^{-1} 으로 오염된 토양에서 지렁이가 오염된 토양을 회피한다고 보고하고 있다. 은 축적에서 이렇게 큰 변이를 보이는 이유는 본 실험에서 사용된 은의 농도에서도 실험생물이 섭식활동 변화 등의 행동양식이나 다른 아치사 독성효과에 따른 것으로 추정한다.

은이온으로 오염된 토양에서 지렁이의 은 축적은 토양의 지화학적 특성, 은의 농도 등에 영향을 받고, 상당히 넓은 BAF (0.01~3.63)의 범위를 보인다(Nahmani *et al.* 2009). 다른 연구들에서도 토양으로부터 지렁이의 은 축적은 은의 유입 형태보다는 은의 토양 내 농도에 더 큰 영향을 받았으며, 토양 내 은 농도에 따라 0.02~0.06의 BAF

값 (Shoults-Wilson *et al.* 2011a, b)과 0.74~0.89 BAF 값 (Makama *et al.* 2016)을 보고하고 있다.

10일간의 노출기간과 24시간의 탈장과정을 마친 후 다시 7일간 오염되지 않은 토양에 생물을 넣어 아연의 생물체외로 배출을 살펴보면, 산화아연 나노입자와 아연이온 모두 실험 11일째부터 12일째까지 빠른 금속의 배출을 확인할 수 있었다. 그 이후 6일간은 체내 금속의 제거가 매우 느린 biphasic elimination pattern을 보였다. 두 번째 제거기간 동안 아연의 제거율을 비교하면, 산화아연 나노입자와 아연이온 처리군은 각각 1.7% d⁻¹와 1.2% d⁻¹로 일단 체내에 흡수된 아연은 매우 느린 속도로 제거됨을 알 수 있다. 아연의 축적률과 달리 제거 속도가 유사함은 섭취된 아연의 형태에 무관하게 일단 장막을 통해서 체내에 흡수된 아연은 체내에서 유사하게 거동하는 것으로 보여진다.

세 가지 형태의 은에 노출되어 체내에 흡수된 은의 제거는 토양에 오염시킨 은의 화학종에 영향을 받지 않았으며, 아연의 경우처럼 biphasic elimination pattern을 보였다. 두 번째 제거기간 동안 은의 제거율은 3.2~3.8% d⁻¹의 범위를 보였으며, 아연의 제거율보다는 약 2~3배 높게 나타났다 ($p < 0.05$).

3. 다단계추출법

다단계추출법에 따른 토양이나 퇴적물 내 금속의 결합 형태 중 water fraction, exchangeable fraction, carbonate fraction은 mobile fraction으로 비교적 약한 결합을 하고 있고, 잠재적으로 생물축적 (bioavailability)이 가능한 결합 형태로 알려져 있다. 나머지 부분과 결합된 금속은 불가역적인 부분으로 생물학적 그리고 화학적 반응도가 낮은 결합 형태로 알려져 있다 (Salbu *et al.* 1998; Basta and Gradwohl 2000).

각 처리구에서 은과 아연의 상대적 분포는 Fig. 3에 나타나 있고, 각 fraction의 추출농도는 위 비율에 토양에 첨가된 100 mg Zn kg⁻¹ (아연 나노입자와 이온 처리구)와 2.50 mg Ag kg⁻¹ (은 나노입자와 이온 처리구) 농도를 곱하여 얻어질 수 있다. 아연이온 처리구와 산화아연 처리구에서 아연은 각각 Fe-Mn oxides fraction에 53.2% (53 mg Zn kg⁻¹)와 carbonate fraction에 41.0% (41 mg Zn kg⁻¹)로 가장 높게 분포하고, residual fraction에서는 <5% (<5 mg Zn kg⁻¹)의 분포를 보였다 (Fig. 3). Mobile fraction에는 아연이온 처리구와 산화아연 처리구에서 각각 약 35%와 65%의 분포를

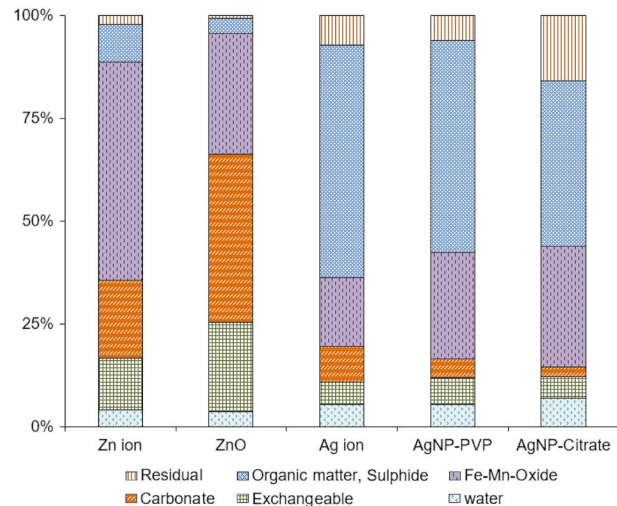


Fig. 3. Relative distribution of Zn in the 6 different fractions of sequential extractions of soils contaminated with either Zn ions, ZnO nanoparticles (ZnO), Ag ions, PVP-capped Ag(0) nanoparticles (Ag-PVP), or citrate-capped Ag(0) nanoparticles (Ag-citrate).

보이고 있다. 한편, 은의 경우 오염 형태에 무관하게 organic matter & sulphide fraction과 Fe-Mn oxides fraction에 >80% (>2 mg Ag kg⁻¹) 분포하였다 (Fig. 3). 은은 mobile fraction에 <20% (<0.5 mg Ag kg⁻¹) 분포하여, 아연에 비해 화학적 그리고 잠재적 생물학적 활성도가 낮을 것으로 예측되었다.

이온상 처리구 간의 금속축적을 비교하면 아연이온 처리구 BAF는 1.86으로 은이온 처리구 BAF 0.17보다 약 10배 높았는데, 이는 아연이온이 토양에서 비교적 mobile fraction과 결합하고 은이 대부분 강한 결합을 하는 결과와 일치한다. 즉, 토양 내 결합특성에 따른 생물이용도 (bioavailability) 예측과 실제 생물축적과 일치한다고 볼 수 있다. 이온상으로 오염시킨 토양에서는 금속이온이 용존 상태로 유입되어서 각 결합상 (phase)으로 용이하게 이동하고 분배되어 결합되었을 것으로 추정된다.

하지만, 산화아연과 아연이온 처리구에서 토양 내 아연의 결합특성에 따른 잠재 생물이용도 예측과 실제 생물축적과는 반대의 현상을 보였다. 오염 초기에 산화아연입자들은 토양입자들과 물리적, 정전기적으로 흡착되거나, 일부 용해되어 존재하다, 시간이 지나면서 환원되어 이온상으로 변하고 지화학적 속성작용을 통해서 각각의 결합상으로 재분배되어질 것으로 추정되어진다. 이러한 추정은 Romero-Freire *et al.* (2017) 자료에서 언급했듯이 나노아연

처리구에서 공극수에 용존 아연 농도가 낮게 나타난다는 결과가 뒷받침해 준다. 따라서, 본 결과는 다단계추출법이 오염 초기에는 토양의 금속나노물질의 생물이용도 예측에 적합하지 않음을 제시해 준다.

본 연구의 결과는 방사성동위원소로 표지된 나노입자를 합성하여 나노물질에 함유된 금속의 퇴적물이나 생물체내에서 거동을 파악하는 데 방사성동위원소 추적자 기법이 유용하게 활용될 수 있음을 보여주었다. 또한, 제조 나노물질이 토양에서 생물로 축적되고, 축적 정도는 제조 나노물질에 따라 다르며, 제거율도 금속별로 차이가 있음을 제시해 준다.

적 요

본 연구에서는 방사성동위원소 추적자 실험을 통해서 산화아연 또는 두 종류의 은나노물질로 오염시킨 토양에서 지렁이(*Eisenia fetida*)의 금속축적과 제거율을 비교하였고, 이들을 이온상의 Ag와 Zn으로 처리한 대조구와 비교하였다. 추가적으로 토양의 금속을 다단계추출법(sequential extraction method)을 이용하여 금속의 결합 형태로부터 생물이용도(bioavailability)를 예측하고 실제 생물축적(BAF, bioaccumulation factor)과 비교하였다. ZnO 처리구의 BAF(0.06)는 아연이온 처리구 BAF(1.86)보다 31배 낮았는데, 이는 토양에서 ZnO의 생물전이가 매우 낮음을 제시해 준다. 한편, 은의 BAF는 금속의 오염 형태에 무관하게 0.11~0.17의 범위를 보였다. 다단계추출법을 통해서 아연이온 처리구의 아연은 토양에 비교적 약한 결합을 하는 형태(mobile fraction)에 35% 분포하여 아연이온처리구 값(<20%)보다 높았고, 이는 전자의 더 높은 BAF와 일치한다. 하지만, ZnO 처리구의 다단계추출은 생물이용도나 BAF를 잘 예측하지 못했으며 이는 ZnO가 토양에서 아연이온과 지화학적으로 다른 거동을 하기 때문으로 추정된다. 지렁이 체내에 축적된 은의 제거율($3.2\sim 3.8\% d^{-1}$)은 아연의 제거율($1.2\sim 1.7\% d^{-1}$)보다 2~3배 더 높았다.

사 사

심사위원들과 편집위원회의 의견과 제시 사항에 감사드리며 양경선 양의 도움에 고마움을 표현합니다.

REFERENCES

- Adeel M, N Shakoor, M Shafiq, A Pavlicek, F Part, C Zafiu, A Raza, MA Ahmad, G Jilani, JC White, E-K Ehmoser, I Lynch, X Ming and Y Rui. 2021. A critical review of the environmental impacts of manufactured nano-objects on earthworm species. *Environ. Pollut.* 290:118041.
- Alloway BJ. 2008. Zinc in the Soil and Crop Nutrition. 2nd Edition. International Zinc Association. Durham, NC. p. 139.
- Arshi N, F Ahmed, S Kumar, MS Anwar, BH Koo and CG Lee. 2010. Comparative study of the Ag/PVP nano composites synthesized in water and in ethylene glycol. *Curr. Appl. Phys.* 11:S346-S349.
- Basta N and R Gradwohl. 2000. Estimation of Cd, Pb, and Zn bioavailability in smelter-contaminated soils by a sequential extraction procedure. *J. Soil Contam.* 9:149-164.
- Chinnapongse SL, RI MacCuspie and VA Hackley. 2011. Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. *Sci. Total Environ.* 409:2443-2450.
- Clark SB, WM Johnson, MA Malek, SM Serkiz and TG Hinton. 1996. A comparison of sequential extraction techniques to estimate geochemical controls on the mobility of fission product, actinide, and heavy metal contamination in soils. *Radiochim. Acta* 74:131-179.
- Cosin DJD, MP Ruiz and MH Garvin. 2002. Gut load and transit time in *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) in laboratory cultures. *Eur. J. Soil Biol.* 38:43-46.
- Croteau MN, SN Luoma and B Pellet. 2007. Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope tracers. *Aquat. Toxicol.* 83:116-125.
- Dybowska AD, MN Croteau, SK Misra, D Berhanu, SN Luoma, P Christian, P O'Brien and E Valsami-Jones. 2011. Synthesis of isotopically modified ZnO nanoparticles and their potential as nanotoxicity tracers. *Environ. Pollut.* 159:266-273.
- Gottschalk F, T Sonderer, RW Scholz and B Nowack. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, Fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.* 43:9216-9222.
- He E, H Qiu, X Huang, CAM van Gestel and R Qiu. 2019. Different dynamic accumulation and toxicity of ZnO nanoparticles and ionic Zn in the soil sentinel organism *Enchytraeus crypticus*. *Environ. Pollut.* 245:510-518.
- Hou HC, P Westerhoff and JD Posner. 2013. Biological accumulation of engineered nanomaterials: a review of current knowledge. *Environ. Sci. - Processes Impacts* 15:103-122.
- Hu CW, M Li, YB Cui, DS Li, J Chen and LY Yang. 2010. Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol. Biochem.* 42:586-591.

- ISO. 2012. Soil Quality Effects of Pollutants on Earthworms Part 1: Determination of Acute Toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. ISO 11268-1. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Jankovic NZ and DL Plata. 2019. Engineered nanomaterials in the context of global element cycles. *Environ. Sci. - Nano* 6:2697–2711.
- Jezequel D, J Guenot, N Jouini and F Fievet. 1995. Submicrometer zinc oxide particles: Elaboration in polyol medium and morphological characteristics. *J. Mater. Res.* 10:77–83.
- Khan FR, A Laycock, A Dybowska, F Larner, BD Smith, PS Rainbow, SN Luoma, M Rehkämper and E Valsami-Jones. 2013. Stable isotope tracer to determine uptake and efflux dynamics of ZnO Nano- and bulk particles and dissolved Zn to an estuarine snail. *Environ. Sci. Technol.* 47:8532–8539.
- Koen L and RJ Colin. 2001. Zinc and cadmium bodyburden in terrestrial oligochaetes: Use and significance in environmental risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:2067–2072.
- Laycock A, M Diez-Ortiz, F Larner, A Dybowska, D Spurgeon, E Valsami-Jones, M Rehkämper and C Svendsen. 2015. Earthworm uptake routes and rates of ionic Zn and ZnO nanoparticles at realistic concentrations, traced using stable isotope labeling. *Environ. Sci. Technol.* 50:412–419.
- Li WM and WX Wang. 2013. Distinct biokinetic behavior of ZnO nanoparticles in *Daphnia magna* quantified by synthesizing ⁶⁵Zn tracer. *Water Res.* 47:895–902.
- Ma H, PL Williams and SA Diamond. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - a review. *Environ. Pollut.* 172:76–85.
- Makama S, J Piella, A Undas, WJ Dimmers, R Peters, VF Puentes and NW van den Brink. 2016. Properties of silver nanoparticles influencing their uptake in and toxicity to the earthworm *Lumbricus rubellus* following exposure in soil. *Environ. Pollut.* 218:870–878.
- Nahmani J, ME Hodson, S Devin and MG Vijer. 2009. Uptake kinetics of metals by the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 157:2622–2628.
- Nowack B, FJ Ranville, S Diamond, JA Gallego-Urrea, C Metcalfe, J Rose, N Horne, AA Koelmans and SJ Klaine. 2013. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 31:50–59.
- OECD. 1984. Guidelines for the Testing of Chemicals No. 207: Earthworm Acute Toxicity Test. Organization for Economic Co-operation and Development. Paris.
- OECD. 2016. Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). Organization for Economic Co-operation and Development. Paris.
- Rocha TA, NC Mestre, SMT Saboia-Morais and MJ Bebianno. 2017. Environmental behavior and ecotoxicity of quantum dots at various trophic levels: a review. *Environ. Int.* 98:1–17.
- Romero-Freire A, S Lofts, J Francisco, M Peinado and AM van Gestel. 2017. Effects of aging and soil properties on zinc oxide nanoparticle availability and its ecotoxicological effects to the earthworm *Eisenia Andrei*. *Environ. Toxicol. Chem.* 36:137–146.
- Salbu B, T Krekling and DH Oughton. 1998. Characterization of radioactive particles in the environment. *Analyst* 123:843–849.
- Shoultz-Wilson WA, BC Reinsch, OV Tsyusko, PM Bertsch, GV Lowry and JM Unrine. 2011a. Role of particle size and soil type in toxicity of silver nanoparticles to earthworms. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75:365–377.
- Shoultz-Wilson WA, BC Reinsch, OV Tsyusko, PM Bertsch, GV Lowry and JM Unrine. 2011b. Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in Earthworms (*Eisenia fetida*). *Nanotoxicology* 5:432–444.
- Tessier A, PGC Campbell and M Bisson. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metal. *Anal. Chem.* 51:844–851.
- Wang Y and B Nowack. 2018. Dynamic probabilistic material flow analysis of nano-SiO₂, nano iron oxides, nano-CeO₂, nano-Al₂O₃, and quantum dots in seven European regions. *Environ. Pollut.* 23:589–601.