

# 재첩 (*Corbicular fluminea*) 의 먹이섭식을 통한 은과 산화 아연 나노물질의 흡수효율, 제거율 그리고 조직내 분포 특성 연구

양송이, 이병권

전남대학교 자연과학대학 해양학과

## Bioaccumulation, efflux and subcellular partitioning of Ag and Zn in the clam (*Corbicular fluminea*) exposed to nanoparticles via dietary route

Yang Song Yi and Lee Byeong-Gweon

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

### ABSTRACT

In a radiotracer study, assimilation efficiency and efflux rate of Ag and Zn in the fresh water bivalve (*Corbicular fluminea*) fed to the two types of Ag nanoparticles (coated with citrate or polyvinylpyrrolidone) or ZnO particles amended with algae or seston diets were determined. These were compared with those clams fed to the diets treated with dissolved Ag and Zn. Additionally, subcellular partitioning of Ag and Zn in tissues of the clam after 21d depuration of bioaccumulated metals were compared. The clams were capable of assimilating (AE) Ag and Zn from the ingested nanoparticles and assimilation efficiency was higher for Zn (22-47%) than Ag (15-27%). The AE in the clams fed the food treated with dissolved Zn (56-58%) was higher than those treated with dissolve Ag (7-25%). Ag and Zn release from the clams during 21-d depuration followed two compartment model, initial rapid loss (20-30%) in 3-4 d of depuration and followed by much slower rate for Ag (0.003-0.006 d<sup>-1</sup>) and Zn (0.002-0.006d<sup>-1</sup>). The subcellular partitioning of Ag in the clam tissue was mostly in cellular debris (45-60%) and heat sensitive protein (20-30%), while Zn was distributed mostly in cellular debris (50%) and organelles (30%).

**Keywords:** clam (*Corbicular fluminea*), nanoparticles, bioaccumulation, efflux rate, subcellular partitioning

### 서 론

이매패류는 많은 량의 물을 여과하는 능력을 가지고 있어서 용존상뿐만 아니라 부유물질에 포함된 오염물질을 체내에 흡수할 수 있고 광범위한 분포 특성 때문에, 환경에서 여러 가지 금속 및 유기오염물질에 대한 지시자로서 사용되어왔다

(O'Connor, 1996). 이매패류는 체내에 높은 농도로 금속을 축적할 수 있다고 알려져 있으며, 해양 이매패류 (특히, *Mytilus edulis*) 는 전 세계 여러 곳에서 연안환경의 금속오염을 모니터링 하는 대상 생물로써 이용되고 있다 (Mouneyrac *et al.*, 1998). 한편, 담수 이매패류의 대표종인 재첩 (*Corbicula fluminea*) 은 아시아지역뿐만 아니라 북미와 유럽지역에 유입된 이후로 전 세계적인 분포를 보이고 있다. 재첩 역시 퇴적물에 고착하여 용존 및 부유 오염물질을 잘 축적하여, 담수 환경에서 오염물질을 모니터링하는데 지표종으로 사용되어 왔다 (Guo and Feng, 2018).

나노과학과 나노기술의 발달로 인하여 탄소나노물질들과 금속나노입자들은 광범위한 산업분야와 제품에서 매년 용도와 사용량이 증가추세에 있다. 금속나노물질 중에서 은나노입자 (AgNPs) 와 산화아연입자 (ZnO) 는 고유의 물리화학적 특성, 산업적 중요도 때문에 가장 많은 주목을 받고 있다. AgNPs는

Received: December 12, 2023; Revised: December 22, 2023;  
Accepted: December 31, 2023

Corresponding author: Byeong-Gweon Lee

Tel: +82 (62) 530-3467, e-mail: blee@jnu.ac.kr  
1225-3480/24854

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

향균성을 갖는 특징 때문에 의류, 탈취제, 세척기뿐만 아니라 물리화학적 특성 때문에 전자재료, 광학제품과 폐수처리 등에 광범위하게 적용되고 있으며 (Adeel *et al.*, 2021), ZnO는 의약품, 향균, 페인트, 화장품, 플라스틱을 비롯하여 자외선 차단제 등 사용 범위가 매년 증가 추세에 있다 (Ma *et al.*, 2013). 이러한 금속나노물질의 생산, 운반, 제품에 적용과정, 그리고 사용하면서 마모와 손상 그리고 폐기 과정에서 나노물질들이 수서환경으로의 유입은 불가피하고, 나노입자의 사용분야와 제품이 증가할수록 유입량 또한 증가할 것으로 예상된다. 이들 나노입자의 수서환경에 대한 영향과 잠재적 독성에 대한 관심이 증가하고 있으며, 박테리아를 비롯하여, 식물플랑크톤, 물벼룩, 이매패류 그리고 어류 등을 대상으로 AgNPs와 ZnO를 비롯한 여러 금속나노물질의 급성 및 만성 독성에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다 (Allen *et al.*, 2010; Franklin *et al.*, 2007; Griffitt *et al.*, 2008; Maurer-Jones *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013).

물질순환분석 (material flow analysis) 은 물질의 생산에서 최종 소모까지의 life cycle을 추적하는 기법이다 (Boxall *et al.*, 2007). 이를 나노물질에 대해 적용하여 모델링한 결과들에 따르면, 환경에 유입될 나노입자의 양과 농도가 예측 가능하고, 예측된 농도는 강 그리고 강하구 퇴적물에 기존에 오염되어 존재하는 금속의 농도 보다 훨씬 더 낮을 것으로 추정되어진다 (Wang and Nowack 2018; Hong *et al.*, 2021). 예로서, 나노아연에 기인한 아연의 농도가 하수종말처리장 슬러지에서 3.2-32 mg Zn Kg<sup>-1</sup>, 토양에서 3.2 mg Zn Kg<sup>-1</sup>, 그리고 물에서 0.2-1.4 ug L<sup>-1</sup>로 예측되는데 (Gottschalk *et al.*, 2009; Maurer-Jones *et al.*, 2013), 이는 실제 하천, 강 그리고 강하구로 유입되면서 더욱 희석될 것으로 보인다. 이에 비해, 우리나라 4대강 퇴적물의 아연농도는 50-1,400 mg Zn Kg<sup>-1</sup> 범위 (Pandey *et al.*, 2019) 를, 남해 연안 표층퇴적물은 평균 109와 22-312 mg Zn Kg<sup>-1</sup> 범위 (Song *et al.*, 2014) 를 보인다. 즉, 환경에 유입될 것으로 예측되는 나노금속의 농도가 현재 환경에 존재하는 농도보다 매우 낮음을 알 수 있다. 따라서, 환경적으로 의미가 있는 매우 낮은 농도에서 나노입자에 기인한 금속의 거동이나 생물로의 전이에 대한 연구가 중요하다.

하지만, 수서 환경의 매질과 서식하는 생물들은 상당히 높은 배경 금속 농도를 포함하고 있기 때문에, 고농도의 금속나노물질을 첨가하지 않고 낮은 농도에서는 기존에 토양과 생물에 축적된 금속과 구별하고 정량 하는데 방법적 한계가 있다. 이러한 예로서, ZnO로 오염된 토양이나 퇴적물에서 생물의 아연 축적을 평가하기 위해 토양에 100-4,400 mg Zn Kg<sup>-1</sup> (Lahive *et al.*, 2019) 그리고 퇴적물에 600-2,000 mg Zn Kg<sup>-1</sup> (Huang *et al.*, 2019) 을 첨가했는데, 이렇게 높은 농도

를 첨가하지 않고는 처리군의 생물 축적을 평가하는데 통계적으로 유의한 결과를 얻기 어렵기 때문이다.

한편 높은 에너지의 감마선을 방출하는 동위원소를 추적자로 이용할 경우 기존 연구들과는 달리 금속을 추출하지 않고 비파괴적으로 매질이나 생물개체 내 농도변화를 시간 경과에 따라 연속적으로 추적할 수 있다. 또한 기존 환경의 배경 금속과 구별하여 환경적으로 의미 있는 낮은 농도의 변화를 짧은 시간 내에 감지할 수 있다. Lee and Lee (2021) 는 감마 동위원소 <sup>110m</sup>Ag와 <sup>65</sup>Zn을 이용하여 나노입자를 합성하고, 이를 추적자로 이용하여 나노입자로 오염된 토양으로부터 지렁이로 금속 전이에 대한 연구를 수행한 바 있다.

본 연구에서는 위 연구의 후속으로 방사성동위원소로 추적자 기법을 이용하여 수서 환경에서 나노입자의 생물이용도 (bioavailability) 를 평가하였다. 나노물질의 환경에 유입 예상 농도가 매우 낮기 때문에, 나노물질로의 먹이 섭식을 통한 전이를 먼저 파악하고, 여러 가지 만성독성에 연구는 추후에 진행할 예정이다. 본 연구에서는 방사성동위원소로 표지된 은과 아연나노입자를 합성하여, 재첩의 먹이 섭식을 통한 이들 물질로부터 Ag와 Zn의 흡수 효율을 측정하고자 하였다. 또한 재첩 체내에 축적된 이들 물질의 체외로의 제거율을 산출하고, 생물 체내에 축적된 금속의 조직 내 분포/결합 특성을 파악하고자 하였다. 그리고 나노입자 형태 (처리구) 의 금속과 용존상 (비교구) 의 금속의 거동과 비교하였다. 먹이는 부유성 식물플랑크톤과 재부유 퇴적물을 이용하였고, 환경에 유입된 나노입자들이 이들 부유성 먹이들과 흡착되어 응집체 (aggregates) 를 형성할 것을 예상하여 나노입자를 이들 먹이와 응집시킨 후 실험생물에 섭식시켰다.

## 재료 및 방법

### 1. 방사성동위원소로 표지된 나노입자 합성 및 특성

본 연구에서는 AgNPs와 ZnO 그리고 용존 Ag와 Zn의 매질과 생물내 거동을 파악하기 위해서 방사성 동위원소 <sup>110m</sup>Ag와 <sup>65</sup>Zn을 추적자로 사용하였다. 감마방사성 동위원소 <sup>110m</sup>Ag (in 0.1 M HNO<sub>3</sub>, specific activity 666MBq mg<sup>-1</sup>, t<sub>1/2</sub> = 250.4d) 과 <sup>65</sup>Zn (in 0.5 M HCl, specific activity 161 MBq mg<sup>-1</sup>, t<sub>1/2</sub> = 244d) 는 각각 한국원자력연구원과 Perkin Elmer (USA) 에서 구매하였다. 방사성 동위원소로 표지된 나노입자의 합성은 Lee and Lee (2021) 에 상세히 기술되어 있다.

PVP (polyvinylpyrrolidone) 로 코팅 시킨 은나노입자는 Arshi *et al.*, (2011) 의 방법을 일부 수정하여 합성하였다. PVP-<sup>110m</sup>AgNPs를 합성하기 위하여 AgNO<sub>3</sub> (99% purity, Sigma Aldrich) 25 mg과 <sup>110m</sup>AgNO<sub>3</sub>를 0.15 ml의 초순수

(Milli-Q, Millipore) 에 녹인 후, 아세톤 20 ml을 첨가하여 20분 동안 막대자석을 이용하여 섞어주었고, PVP ((C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO)<sub>n</sub>, Sigma Aldrich) 0.8g을 첨가한 후 다시 40분 동안 교반시켰다. 이 후 생성된 흑갈색의 콜로이드 형태의 입자는 여러 번의 세척을 거친 다음 10일 동안 교반시켜 나노입자를 합성하였다. Citrate로 코팅된 <sup>110m</sup>AgNPs의 합성은 Chinnapongse *et al.* (2011) 이 제시한 방법에서 농도를 변화시켜 적용하였다. 반응조에 58.8 mM의 AgNO<sub>3</sub> 0.845 ml와 <sup>110m</sup>AgNO<sub>3</sub>를 20 ml 초순수에 넣고 60°C로 열을 가하면서 교반시켜 주었다. 합성용액에 34 mM sodium citrate (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 99% purity, Junsei Chemical) 1.46 ml을 가하고, 100 mM sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>, 99% purity, Alfa Aesar) 1 ml을 한 방울씩 첨가하였으며, 용액이 연황색으로 바뀌면, 추가적으로 20분 동안 더 반응시킨 후 실온에서 방냉하였다.

ZnO 합성을 위하여 Jezequel *et al.* (1995) 의 가수분해법을 수정 적용하였다. 반응플라스크에 150 mM zinc acetate (Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 99% purity, Kanto chemical), 100 ml diethyleneglycol (DEG, 99% purity, Dae-jung Chemical) 과 <sup>65</sup>Zn (as ZnCl<sub>2</sub>, Perkin Elmer) 을 함께 첨가 해주었다. 혼합물을 180°C에서 1시간 동안 가열하여 <sup>65</sup>ZnO를 합성하였고, 상온이 될 때까지 교반시켜 주었다. 생성된 <sup>65</sup>ZnO 콜로이드를 회수하기 위해 생성물을 23,000 g로 20분 동안 원심분리시켜 상등액을 버리고, 초순수를 첨가하여 여러 번 원심분리하여 나노입자를 획득하였다.

합성된 나노입자들의 크기와 입자형태는 투과전자현미경 (Transmission Electron Microscope; TEM; Tecani F20, FEI, USA) 으로 그리고 화학조성은 엑스선분광계 (Energy Dispersive X-ray spectrometer; EDX; Tecani F20, FEI, USA) 로 분석하였다.

## 2. 실험생물과 먹이

실험에 사용된 재첩 (*Corbicular fluminea*) 은 섬진강에서 채집한 후 실험실로 옮겨와 폐각의 이물질을 제거하고, 18°C에서 1주일 동안 중경수 (moderately hard water; EPA 2002) 에 순치시켰다. 순치기간 동안 먹이생물로 녹조류 *Scenedesmus obliquus*와 *Selenastrum capricornutum*를 충분히 공급하였고, 실험 하루 전에는 먹이를 공급하지 않았다. 플랑크톤은 BG11 medium (*S. obliquus*) 또는 WC medium (*S. capricornutum*) 에 광주기는 14:10으로 하여 18°C에서 배양하였다.

재첩의 먹이입자로 이용할 *Scenedesmus obliquus*를 1.2 μm 여과지 (Millipore) 로 여과하여 500 mL BG11 medium이 담긴 플라스크에 재부유시켰다. 또 다른 먹이입자

로 이용할 표충 강퇴적물은 63 μm 체로 걸러서 1.2 μm 여과지로 입자를 회수한 후 중경수에 재부유시켰다. 각각의 먹이가 재부유된 플라스크에 PVP-<sup>110m</sup>AgNPs, Citrate-<sup>110m</sup>AgNP와 <sup>65</sup>ZnO 그리고 <sup>110m</sup>Ag (as AgNO<sub>3</sub>: 3 nM Ag) 와 <sup>65</sup>Zn (as ZnCl<sub>2</sub>: 55 nM Zn) 를 첨가하여 3일 동안 교반하면서 배양하였다. 배양 용기에 첨가된 나노입자 형태나 이온성 금속의 농도는 동일하였으며, 각각 0.6 mg Ag L<sup>-1</sup>과 7 mg Zn L<sup>-1</sup>이다. 배양 후 각각의 물질로 표지 (이온성 금속) 된 또는 나노입자가 응집 (aggregated) 된 플랑크톤 (algae) 이나 부유퇴적물 (seston) 을 0.45 μm 여과지로 여과하여 재첩의 먹이로 후회에 사용하였다.

## 3. 금속 흡수효율

재첩의 섭식을 통한 먹이입자 (algae, seston) 와 응집된 처리구 (AgNPs, ZnO)와 비교구 (흡수/흡착시킨 용존 Ag와 Zn) 의 Ag과 Zn의 흡수효율 (AE, %) 을 파악하기 위하여 pulse-chase 방법을 이용하였다 (Wang and Fisher, 1999). 각각의 먹이 마다 1-L 비커에 중경수를 준비하고 20마리의 재첩을 넣어주었다. 재첩이 폐각을 열고 여과작용을 시작하면, 먹이입자들을 재부유시켜 aeration하면서 60분 동안 먹이를 섭식하게 하였다. 이 후 재첩을 회수하여 3마리 씩 그룹 (n = 4) 지어 초기에 섭식한 방사능을 측정할 뒤, 깨끗한 담수가 담긴 정화 (depuration) 비커로 옮겨 오염되지 않은 먹이를 섭식시키며 흡수되지 않은 금속을 48시간 동안 배설하도록 하였다 (Fig. 1). 정화 비커에서 재첩은 나일론 메쉬로 바닥으로부터 분리시켜 배설물을 채취하여 배설된 방사능을 주기적으로 측정하였다. 정화기간이 끝난 후에 생물을 절개하여 조직과 폐각으로 분리하여 개별로 방사능을 다시 측정하였다. 흡수효율 (%) 은 다음 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{Absorption efficiency (\%)} = A_f / (A_f + A_{\text{feces}}) \times 100$$

A<sub>f</sub>은 정화기간 종료 후 (t = 48h) 에 생물체내 방사능, A<sub>feces</sub>은 정화기간 중 회수한 모든 배설물 방사능의 합을 나타낸다. 여기서, A<sub>f</sub> + A<sub>feces</sub>는 초기에 먹이를 통해 섭식한 방사능을 산정한 값이다.

## 4. 제거율과 조직내 결합 특성

재첩 체내에 흡수된 후 금속의 제거율 (efflux rate) 은 PVP-<sup>110m</sup>AgNPs, Citrate-<sup>110m</sup>AgNPs, <sup>65</sup>ZnO을 함유한 먹이를 섭식시킨 처리구와 용존상 <sup>110m</sup>Ag과 <sup>65</sup>Zn에 노출한 비교구를 비교하였다. 각각 처리구에 재첩 30 개체를 10일 동안 노출시킨 후 각 처리구의 재첩을 회수하여 깨끗한 중경수로 폐각에 묻어있는 오염된 입자와 노출용액을 제거시킨 생물을 3개체씩

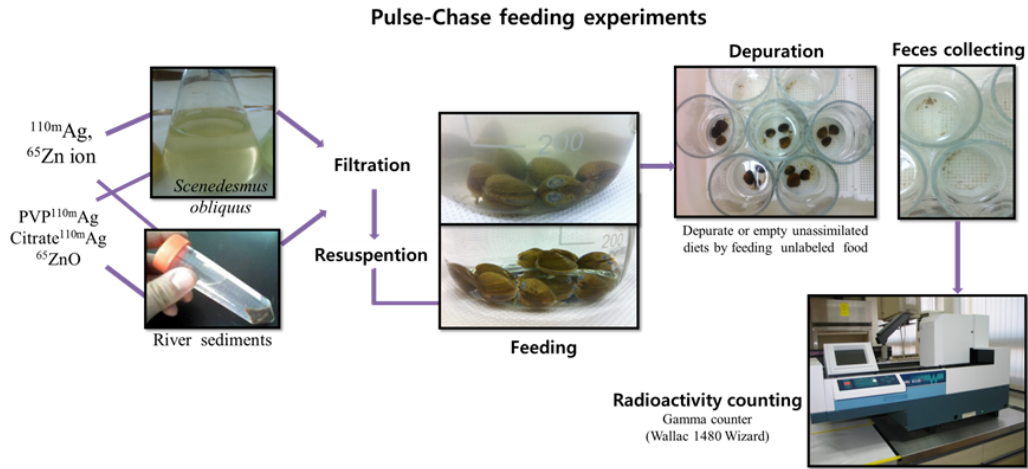


Fig. 1. Schematics of pulse-chase feeding experiments for absorption efficiency measurement.

그룹 (n = 4) 지어 깨끗한 20 L의 중경수가 담긴 수조로 옮겼다. 유지조건은 흡수효율 실험의 정화기간과 동일하게 하였다. 금속의 제거율은 생물체내에 금속이 흡수 동화된 이후 생리적으로 제거 (physiological turn-over) 되는 것을 의미하므로, 실험생물의 섭식 후 장내 흡수되지 않은 금속을 배설물로 충분히 배출할 수 있도록 48시간이 경과된 후 제거율을 측정하였다. 이렇게 48시간이 지난 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 17 그리고 21일에 재첩과 배설물의 방사능을 측정하였다. 제거율은 다음과 같은 일차 지수함수를 이용하여 계산하였다.

$$C(t) = a e^{ke_1 \cdot t} + b e^{ke_2 \cdot t}$$

여기서, C(t) 는 t 시간에 이패매류 체내 방사능, a와 b는 상수, ke<sub>1</sub>과 ke<sub>2</sub>는 배출속도 상수, t 는 일을 나타낸다.

위 방법에 따라 10일 동안 실험생물을 금속에 노출시킨 후 체내에 남아 있는 Ag와 Zn의 조직내 분포 특성은 다단계 원심분리법 (Wallace *et al.*, 2003) 를 이용하여 측정하고 분류하였다. 먼저, 3마리씩 4개의 반복수로 재첩 개체 조직을 분리하여 유리 바이알에 넣고 20 mM tris buffer를 생물조직 무게의 3-10배 용량으로 넣고 세포분쇄기 (Polytron®) 로 분쇄한 후 4°C에서 1,450 g로 15분간 원심분리 하였다. 상등액은 다른 원심분리 판에 옮기고 펠릿 (debris) 은 100°C의 수욕상에서 2분간 열을 가해준 후 20 mM tris buffer를 넣어주었다. 그 후 1 N 수산화나트륨을 tris buffer와 동일량을 넣어준 후 다시 60-70°C의 수욕상에서 1시간 동안 열을 가해준 후 4°C에서 10분간 5,000 g로 원심분리 하여 상등액 (cellular debris) 과 펠릿 (Metal-rich granules, MRG) 으로 나눈 후 각각의 방사능을 측정하였다. 상등액은 4°C에서 100,000 g로 1시간

원심분리하여 펠릿 (Organelles: Org) 과 상등액 (Cytosol) 으로 분리하였다. 펠릿 (Organelles) 은 방사능을 측정하고 상등액은 80°C의 수욕상에서 10분간 열을 가한 다음 1시간 동안 냉장고에서 냉각시켰다. 그 후 4°C에서 30,000 g로 10분간 원심분리 하여 펠릿 (Enzymes, Heat Sensitive Protein (HSP)) 과 상등액 (Metallothionein Like Protein; MTLP) 으로 분리한 후 각각의 방사능을 측정하였다.

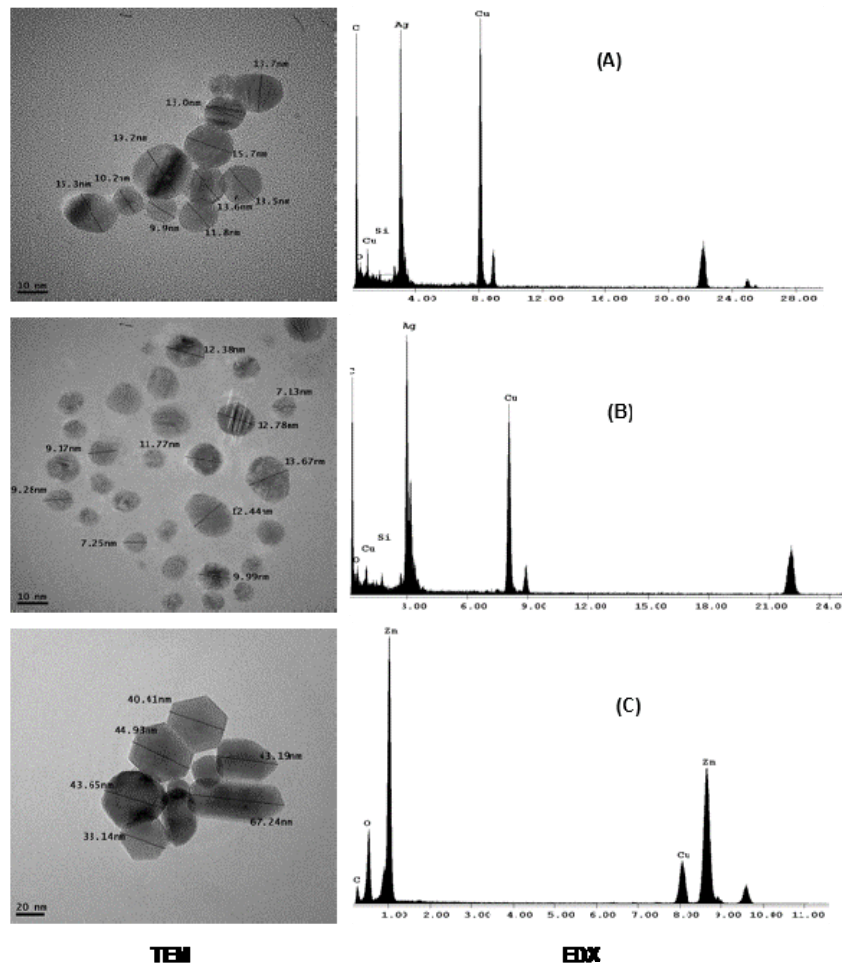
## 5. 방사능 측정과 분석

방사능 (activity) 은 감마카운터 (Wallac 1480 Wizard; Perkin Elmer, Turku, Finland) 를 이용하여 연속적으로 모니터링 하고, 이때 <sup>65</sup>Zn (t<sub>1/2</sub> = 244.1d) 은 1,115 keV, <sup>110m</sup>Ag (t<sub>1/2</sub> = 250.4d) 은 643 keV에서 방사능을 측정하였다. 모든 샘플의 측정 시간은 3분으로 하고, 측정 에러 (propagated error) 는 5% 이하였다. 측정된 방사능은 반감기를 고려하여 보정하였고, cpm (count per min) 은 보정계수를 이용하여 dpm (disintegration per min) 으로 전환하였다. 흡수효율과 세포내 분포의 백분율 결과값은 arcsine 변환하여 통계분석을 하였으며, 모든 통계분석은 SPSS 20을 이용하였다. 결과들 간의 차이를 확인하기 위하여 일원배치분산 분석 (One-way ANOVA) 을 이용하였으며, 사후검정은 Tukey 분석을 적용하였다. 통계적인 유의성은 항상 p = 0.05에서 검증되었다.

## 결과 및 고찰

### 1. 나노입자 특성

합성된 PVP 또는 citrate로 코팅된 두 종류의 은나노입자는 모두 구형을 띠고 잘 분산되어 있으며, 입자는 비교적 균질



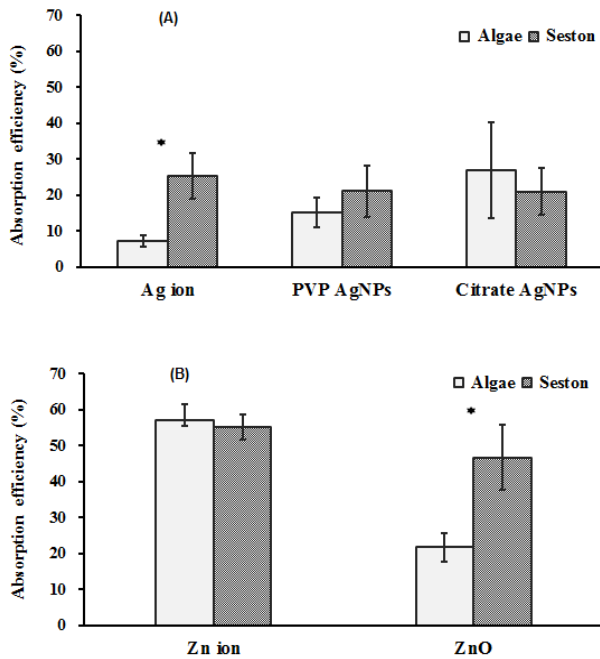
**Fig. 2.** TEM (transmission electron microscopy) image and EDX (energy dispersive X-ray Spectroscopy) data of the laboratory synthesized PVP (polyvinylpyrrolidone)-capped Ag nanoparticles (A), citrate-capped Ag nanoparticles (B) and ZnO nanoparticles (C).

한 크기를 가지며, 각각  $9.40 \pm 2.99$  nm (PVP-AgNPs) 와  $13.10 \pm 2.44$  nm (Citrate-AgNPs) 범위를 보였다 (Fig. 2). ZnO 나노입자는 구형 또는 굴곡이 있는 타원형이고 부분적으로 응집되어 있으며 크기는  $38.95 \pm 11.65$  nm로 나타났다 (Fig. 2). DLS로 측정된 크기는 170-190 nm (PVP-AgNPs), 39-41 nm (Citrate-AgNPs), 210-288 nm (ZnO) 로 나타났으며, zeta potential은 각각 -1-9 mV, -36-30 mV, +10-11 mV였다. 입자의 구성성분을 EDX로 분석한 결과, 제조된 입자들이 각각의 물질들로 구성되어 있음을 확인하였다 (Fig. 2). 본 실험에서 합성된 금속나노 입자들의 크기, 형태와 특성 등이 유통되는 물질의 특성과 유사하여, 동위원소로 표지된 나노물질이 금속나노물질의 거동을 추적하는 추적자로 유용하게 활용될 수 있으리라 평가된다. 본 연구와 유사하게 기존 몇몇 연구 (Dybowska *et al.*, 2011; Khan *et al.*,

2013) 에서는 안정성 동위원소를 이용하여 실험실에서 나노입자를 합성하고 나노물질의 생물전이에 대한 연구를 수행한 바 있다. 안정성동위원소로 합성한 나노물질의 경우 환경적으로 의미 있는 낮은 농도에서 실험은 가능하나, 방사성 동위원소가 아니기 때문에 시료를 비파괴적으로 시간 경과에 따라 연속적으로 추적할 수 없다는 단점이 있다.

## 2. 먹이입자 흡수효율

본 연구의 결과는 이매페루인 재첩이 먹이입자에 응집된 매우 낮은 농도의 금속나노물질을 섭취하여 Ag와 Zn를 체내에 모두 흡수할 수 있음을 보여주었다 (Fig. 3). 재첩은 AgNP를 섭취하여 코팅물질과 먹이 종류에 상관없이 15-27%의 Ag를 흡수하였다. 용존 Ag와 결합한 먹이들로부터 Ag의 흡수 효율은 seston 처리구 (25%) 가 algae 처리구 (7%) 보다 더 높게



**Fig. 3.** Absorption efficiencies of Ag (A) and Zn (B) by the clam *Corbicula fluminea* (n = 4) fed algae or seston labeled either with dissolved metal (Ag or Zn ion) or amended with PVP-AgNPs or Citrate-AgNPs and ZnO nanoparticles. ★: significantly different at  $p = 0.01$

나타났다. 재첩의 Zn 흡수는 algae (22%) 보다 seston (47%)에 흡착된 ZnO의 섭취에서 더 높은 효율로 흡수되었다. 재첩은 섭취를 통해 Zn을 먹이와 금속 유형에 상관없이 Ag 보다는 더 효과적으로 흡수하는 것으로 나타났다.

일반적으로 이매패류의 장으로 유입된 금속은 일부 식세포 작용 및 세포내 소화과정을 거치는 경우를 제외하고 대부분 용존상태로 변환을 거쳐야 장내에서 흡수될 수 있다고 알려져 있으며, 이 때 장내의 Eh, pH 그리고 효소와 관련된 조건 등이 금속물질의 흡수에 영향을 줄 수 있다고 보고되었다 (Decho and Luoma, 1996; Griscom *et al.*, 2002). 따라서, 먹이와 함께 섭취된 나노금속들은 장에서 체류하는 동안 소화효소를 비롯한 소화액의 작용으로 일부 환원되어 용해되어 지고 용해된 금속들이 장막세포를 통해서 흡수되었을 것으로 추정된다. Franklin *et al.* (2007) 은 100 ZnO mg L<sup>-1</sup> 초순수 용액에서 72시간 후에 ZnO의 19%가 용존 Zn으로 해리되며, Li and Wang (2013) 은 더 낮은 농도인 0.5 mg L<sup>-1</sup>에서 ZnO의 30%가 2시간 이내에 용해되어 평형상태에 도달한다고 보고하였다. ZnO에 비해 은나노입자들은 다양한 용액에서 은이온으로 해리된 비율이 더 작은 것으로 보고 (Mirsa *et al.*, 2012) 되고 있고, Odzak *et al.* (2014) 은 다양한 자연수에서 은나노입자는 5일 동안 약 5% 용해되나 ZnO는 약 49% 정도

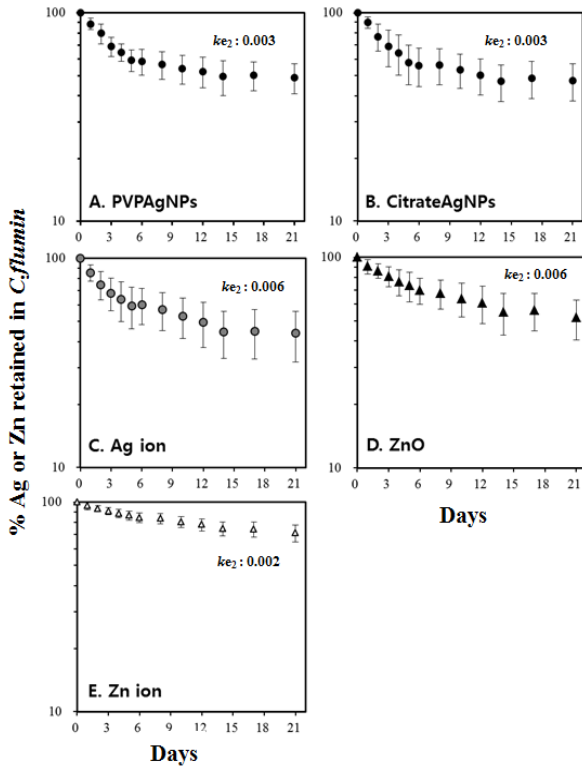
용해된다고 보고하고 있다. 생물 장액이 산성이고 여러 효소들의 역할을 감안하면 장내 나노물질의 용해는 자연수에서 보다 더 높을 것으로 판단되고 장내에서 용해된 금속은 장막세포를 통해 흡수되었을 것으로 추정된다. 이러한 두 나노입자의 용해도 차이가 AgNPs 보다 ZnO에서 더 높은 흡수효율을 부분적으로 설명할 수 있어 보인다.

또한, 나노입자는 생물의 장에서 장막을 통과하여 체내로 직접 나노입자 형태로 흡수되어 축적될 수 있다는 사실이 보고되었다. Renault *et al.* (2008) 은 담수조류 (*Scenedesmus subspicatus*) 에 흡착된 금나노입자를 6일간 재첩에 섭취시킨 후 위, 아가미, 소화선의 상피세포를 통과해 존재하는 금나노입자를 TEM으로 관찰하였다. 또한 Meyer *et al.* (2010) 은 PVP-AgNPs와 Citrate-AgNPs 모두 선충류 (*Caenorhabditis elegans*) 세포막을 통과하여 체내에 존재할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 재첩이 섭취과정과 소화과정에서 나노입자를 식세포작용과 같은 경로를 통해서 나노입자를 세포내로 흡수 하였다고 보여진다. 하지만, 본 연구에서는 장에서 나노입자가 용존되어 흡수된 것과 직접적으로 흡수된 상대적 비율을 파악할 수 없었다.

본 연구의 결과와 같이, 일반적으로 수서생물의 Ag의 흡수효율은 Zn에 비해 낮은 것으로 보고 되어 있다. Wang and Fisher (1996) 는 규조류를 섭취한 홍합 (*Mytilus edulis*) 의 Ag의 흡수효율 (19-21%)이 Zn의 흡수효율 (38-54%) 보다 낮고, Griscom *et al.* (2000) 은 다양한 퇴적물을 섭취한 해양 이매패류 *Mytilus edulis*와 *Macoma balthica*의 Ag의 흡수효율 (5- 22%) 이 Zn의 흡수효율 (21-36%) 보다 낮다고 보고하고 있다. 기존 연구에서는 나노입자의 생물축적 자료가 용존 경로에 대한 노출에 국한되어 있고, 먹이 섭취를 통한 노출 경로는 결핍되어 있으며, AgNPs와 ZnO를 동시에 조사한 결과가 없어서 본 결과와 비교의 어려움이 있다.

### 3. 축적된 Ag와 Zn의 제거

먹이입자와 나노금속의 응집체 또는 용존상에 10일 동안 노출시킨 후 재첩에 축적된 Ag와 Zn가 21일 동안 제거되는 양상은 two-compartment 제거모형을 따랐다 (Fig. 4). 초기 3-4일 동안 빠른 제거율과 그 후 매우 느린 제거 패턴을 보여 주고 있다. 이러한 패턴은 수서생물이 축적된 금속을 제거하는 일반적인 양상으로, 체내 금속이 fast-release pool과 두 번째 slow-release pool에서 제거된다고 보고있다. 제거 양상을 지수함수로 표현하고 빠른 제거구간 ( $ke_1$ ) 과 느린 제거구간 ( $ke_2$ ) 의 제거율 상수는 수학적 stripping 방법을 적용하여 구하였다 (Newman and Clements, 2008). AgNPs과 용존 Ag에 노출된 생물은 초기 빠른 제거구간에서 약 30%이상의 Ag가 제거되었다. 그 후에는 매우 느린 속도 ( $ke_2 =$



**Fig. 4.** Fraction of Ag or Zn retained in the clam (*Corbicula fluminea*) tissue during 21-d depuration following 10-d exposure either to food amended with PVP-AgNPs (A) or Citrate-AgNPs (B) and ZnO nanoparticles (D) or dissolved Ag (C) and Zn (E).  $k_{e2}$  values denote efflux rate constant.

0.003-0.006  $d^{-1}$  로 배출되었으며, AgNPs 처리구가 용존 Ag 처리구 보다 2배 더 느린 속도로 제거되었다.

ZnO 처리구에서 재첩은 초기 약 20%가 제거되었고 이 후 제거속도는  $k_{e2} = 0.006 d^{-1}$  였다. 용존 Zn 처리구의 Zn 제거는 one-compartment 제거모델에 가깝게 초기부터 매우 느리게 제거되었고, 제거 속도는  $k_{e2} = 0.002 d^{-1}$  였다. Zn의 제거는 Ag와는 반대로 ZnO 처리구에서 용존 Zn 처리구보다 3배 더 빠르게 제거되는 것으로 나타났다. 재첩으로부터 금속제거의 생물학적 반감기 ( $t_{1/2}$ ) 는 Zn이온 처리구 ( $t_{1/2} = 346d$ ) > AgNPs 처리구 ( $t_{1/2} = 231d$ ) > Ag이온과 ZnO 처리구 ( $t_{1/2} = 115d$ ) 순으로 나타났다.

본 연구의 결과는 AgNPs와 ZnO 입자가 재첩에 축적된 후 이온성 금속과 같이 생물로부터 배출되어지고, 배출되어지는 속도는 섭취되는 금속형태에 따라 조금씩 차이가 있음을 제시해 준다. Croteau *et al.* (2011) 은 안정성동위원소 추적자를 기법으로 담수우렁이 (*Lymnea stagnalis*) 가 AgNPs (citrate-, humic acid-AgNPs) 과 Ag이온에 4시간 노출과 25일간 제거기간을 거친 후 Ag 제거율은 각각 0.051-0.058

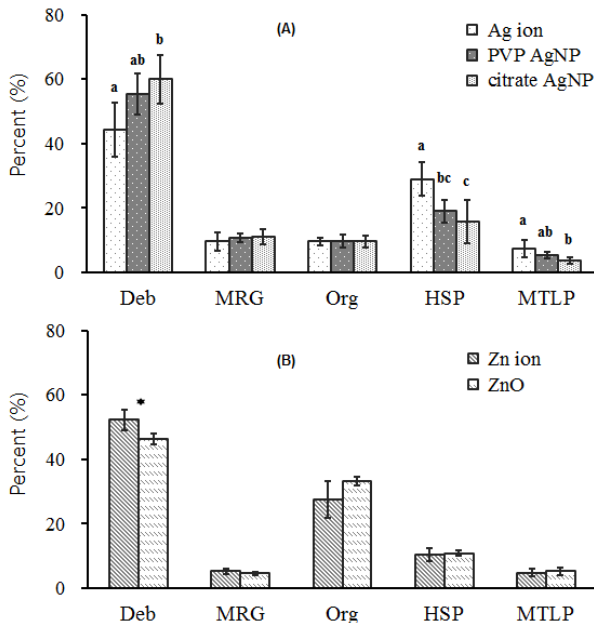
그리고 0.004  $d^{-1}$ 로 보고했다. 여기서도 제거율은 코팅제 종류에 무관했고 Ag이온 처리구의 제거속도는 본 연구결과와 동일하였다. 가리비 (*Chlamys islandica*) 의 이온형태 Ag와 polyallylamine (PAAM)-AgNPs에 6시간 노출 후 Ag 제거는 매우 빠르게 진행되어 생물학적 반감기는 17-50d 였으며, 빠른 제거속도는 아마도 짧은 노출기간에 기인한 것으로 보인다 (Al-Sid-Cheikha *et al.*, 2013). 강하구 우렁이 (*Peringia ulvae*) 의 용존 Zn와 ZnO에 7일 노출과 28일 제거기간에 Zn의 제거율은 노출경로에 무관하게 0.012  $d^{-1}$ 로 보고했다 (Khan *et al.*, 2013). 방사선 동위원소 추적자 기법으로  $^{110m}AgNPs$ 와  $^{65}ZnO$ 으로 오염된 토양에 지렁이 (*Eisenia fetida*) 의 10일간 노출 후 축적된 금속의 7일간 제거에서, Ag의 제거율은 코팅형태에 무관하게 0.03-0.04  $d^{-1}$ 이고 Zn의 제거율은 0.01-0.02  $d^{-1}$ 을 보였다 (Lee and Lee, 2021). 재첩으로부터 다른 금속의 제거율은 Cu와 Se이 각각 0.004와 0.006  $d^{-1}$ 로 보고 되고 있다 (Croteau *et al.*, 2004). 따라서, 생물로부터 축적된 금속의 제거율은 금속종류, 노출경로, 노출시간, 제거기간 그리고 생물의 종류에 따라 다양하게 나타나고, 나노물질을 섭취한 생물도 이러한 제거 패턴을 따름을 확인하였다.

**4. Ag와 Zn의 조직내 분포 특성**

Ag의 조직내 분포는 코팅종류나 노출 경로에 무관하게 Ag의 대부분이 cellular debris (45-60%) 에, 다음으로 HSP > MRG = Org > MTLP 순으로 분포하였다 (Fig. 5). Zn의 조직내 분포 역시 노출경로에 크게 영향을 받지 않았으며 cellular debris에 약 50%, Org에 약 30%가 분포하였으며, 그리고 나머지 3개 fraction에서 각각 5-10%로 분포하였다 (Fig. 5).

다른 연구결과들도 본 연구와 유사하게 나노물질에 노출된 생물들의 조직에서 대부분의 금속이 cellular debris에 분포한다고 보고하고 있다. ZnO에 30일간 노출된 금붕어 (*Carassius Auratus*) 의 간에서 아연은 cellular debris + MRG에 55% 그리고 HSP에 25% 분포한다고 보고했다 (Fan *et al.*, 2013). 식물에서는 나노입자 노출 후 대부분 금속이 cellular debris에 분포했는데, AgNPs에 노출된 상추 (*Lactuca sativa* L.) 의 Ag는 약 80%가 cellular debris와 MRG에 그리고 약 15%가 Org에 분포하고 (Li *et al.*, 2020), AgNPs와 ZnO에 노출된 해양 규조류 (*Thalassiosira weissflogii*) 의 Ag와 Zn는 cellular debris에 각각 80%와 65% 그리고 Org에 각각 13%와 18% 분포 (Biemyer-Fraseret *et al.*, 2014) 한다고 보고하였다.

본 연구에서는 방사성동위원소  $^{110m}Ag$ 와  $^{65}Zn$ 로 표지된 나노입자를 합성하였고 이를 추적자로 활용하여, 환경적으로 의미가 있는 낮은 농도에서 수생생물의 나노입자의 섭취를 통한



**Fig. 5.** Proportional distribution of Ag (A) and Zn (B) in subcellular fractions of the clam (*Corbicular fluminea*) after 10-d dissolved phase (Ag or Zn ion) exposure or dietary exposure to PVP-AgNPs, Citrate-AgNPs or ZnO nanoparticles. Subcellular fractions are grouped as cellular debris (Deb), metal-rich granules (MRG), organelles (Org), heat-sensitive proteins (HSP), metallothionein-like protein (MTLP). Different letters denote statistically significantly different at  $p = 0.05$ . ★: significantly different at  $p = 0.01$

흡수효율, 제거 그리고 조직내 분포 특성을 조사하였다. 현재 까지 나노입자가 생물체내에 흡수된 이후에 일어날 수 있는 상 변화, 해리, 결합리간드의 변화 등에 대한 정보가 부족한 실정이다. 추후에, 동위원소추적자 기법을 이용하고 HPLC와 2D gel electrophoresis 등을 활용한다면 이들 변화에 대한 더 자세한 정보를 얻을 수 있으리라 기대한다.

### 요 약

본 연구에서는 방사성동위원소 추적자 실험을 통해서 재첩 (*Corbicular fluminea*) 에 ZnO 또는 두 종류의 AgNPs 물질을 먹이와 함께 섭식시켜 금속의 흡수효율과 제거율을 비교하였고, 이들을 용존 상의 Ag와 Zn로 처리한 대조군과 비교하였다. 추가적으로 재첩에 축적된 Ag와 Zn의 조직내 분포 특성을 비교하였다. 재첩은 먹이 섭식을 통해서 나노금속을 흡수할 수 있었으며, 흡수효율은 일반적으로 Zn (22-47%) 가 Ag (15-27%) 보다 더 높게 나타났다. 용존금속에 노출된 먹이의 섭식에서 재첩은 Zn (56-58%) 를 Ag (7-25%) 보다 더 효율적으로 흡수하였다. 재첩 체내에 흡수된 금속의 제거는

two-compartment loss pattern을 보였으며, 초기 3-4일에 약 20-30%가 빠르게 제거되고, 이후에는 Ag (0.003-0.006 d<sup>-1</sup>) 와 Zn (0.002-0.006 d<sup>-1</sup>) 는 매우 느리게 제거되었다. 재첩의 생물학적 금속 체류 반감기 ( $t_{1/2}$ ) 는 용존 Zn 처리군 ( $t_{1/2} = 346d$ ) > AgNPs 처리군 ( $t_{1/2} = 231d$ ) > 용존 Ag, ZnO 처리군 ( $t_{1/2} = 115d$ ) 순으로 나타났다. 체내에 흡수된 Ag는 대부분 cellular debris (45-60%) 와 heat sensitive protein (20-30%) 그리고 Zn는 cellular debris에 약 50% 그리고 organelles에 약 30% 분포하였다.

### 사 사

심사위원들과 편집위원회의 의견과 제시 사항에 감사드립니다.

### REFERRECES

- Adeel, M., Shakoor, N., Shafiq, M., Pavlicek, A., Part, F., Zafiu, C., Raza, A., Ahmad, M.A., Jilani G., White, J.C., Ehmoser, E.-K., Lynch, I., Ming, X. and Rui, Y. (2021) A critical review of the environmental impacts of manufactured nano-objects on earthworm species. *Environmental Pollution*, **290**: 118041.
- Al-Sid-Cheikh, M., Pelletier, E. and Rouleau, C. (2011) Synthesis and characterization of [<sup>110m</sup>Ag]-nanoparticles with application to whole-body autoradiography of aquatic organisms. *Applied Radiation Isotopes*, **69**(10): 1415-1421.
- Al-Sid-Cheikh, M., Rouleau, C. and Pelletier, E. (2013) Tissue distribution and kinetics of dissolved and nanoparticulate silver in Iceland Stebounova (*Chlamys islandica*). *Marine Environmental Research*, **86**: 21-28.
- Allen, H.J., Impellitteri, C.A., Macke, D.A., Heckman, J.L., Poynton, H.C., Lazorchak, J.M., Govindaswamy, S., Roose, D.L. and Nadagouda, M.N. (2010) Effects from filtration, capping agents and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **29**(12): 2742-2750.
- Bielmyer-Fraser, G.K., Javis, T.A., Lenihan, H.S. and Miller, R.J. (2014) Cellular partitioning of nanoparticles versus dissolved metals in marine phytoplankton. *Environmental Science and Technology*, **48**: 13443-13450.
- Boxall, A., Chaudhry, Q., Jones, A., 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.
- Chinnapongse, S.L., MacCuspie, R.I. and Hackley, V.A. (2011) Persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural fresh waters, synthetic seawater, and simulated estuarine waters. *Science of the total Environment*, **409**(12): 2443-2450.

- Croteau, M.N., Luoma, S.N., Topping, B.R. and Lopez, C.B. (2004) Stable metal isotopes reveal copper accumulation and loss dynamics in the fresh water bivalve *Corbicula*. *Environmental Science and Technology*, **38**(19): 5002-5009.
- Croteau, M.N., Misra, S.K., Luoma, S.N. and Valsami-Jones, E. (2011) Silver bioaccumulation dynamics in a fresh water invertebrate after aqueous and dietary exposures to nanosized and ionic Ag. *Environmental Science and Technology*, **45**(15): 6600-6607.
- Decho, A.W. and Luoma, S.N. (1996) Flexible digestion strategies and trace metal assimilation in marine bivalves. *Limnology and Oceanography*, **41**: 568-572.
- Dybowska, A.D., Croteau, M.N., Misra, S.K., Berhanu, D., Luoma, S.N., Christian, P., O'Brien, P. and Valsami-Jones, E. (2011) Synthesis of isotopically modified ZnO nanoparticles and their potential as nanotoxicity tracers. *Environmental Pollution*, **159**(1): 266-273.
- Fan, W., Li, Q., Yang, X. and Zhang, L. (2013) Zn subcellular distribution in liver of goldfish (*Carassius auratus*) with exposure to zinc oxide nanoparticles. *PLOS*, **8**(11): e78123.
- Franklin, N.M., Rogers, N.J., Apte, S.C., Batley, G.E., Gadd, G.E. and Casey, P.S. (2007) Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a fresh water microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental Science and Technology*, **41**(24): 8484-8490.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W. and Nowack, B. (2009) Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science and Technology*, **43**(24): 9216-9222.
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C. and Barber, D.S. (2008) Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **27**(9): 1972-1978.
- Griscom, S.B., Fisher, N.S., Aller, R.C. and Lee, B.G. (2002) Effects of gut chemistry in marine bivalves on the assimilation of metals from ingested sediment particles. *Journal of Marine Research*, **60**(1): 101-120.
- Griscom, S.B., Fisher, N.S. and Luoma, S.N. (2000) Geochemical influences on assimilation of sediment-bound metals in clams and mussels. *Environmental Science and Technology*, **34**: 91-99.
- Guo, X. and Feng, C. (2018). Biological toxicity response of Asian Clam (*Corbicula fluminea*) to pollutants in surface water and sediment. *Science of the total Environment*, **631-632**: 56-77.
- Huang, C.-W., Li, S.-W. and Liao, V. H.-C. (2019) Long-term sediment exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. 2019. *Environmental Science: Nano*, **6**: 2609-2614.
- Jezequel, D., Guenot, J., Jouini, N. and Fievet, F. (1995) Submicrometer zinc oxide particles: Elaboration in polyol medium and morphological characteristics. *Journal of Marine Research*, **10**(1): 77-83.
- Khan, F.R., Laycock, A., Dybowska, A., Larner, F., Smith, B.D., Rainbow, P.S., Luoma, S.N., Rehkämper, M. and Valsami-Jones, E. (2013) Stable isotope tracer to determine uptake and efflux dynamics of ZnO Nano- and bulk particles and dissolved Zn to an estuarine snail. *Environmental Science and Technology*, **47**(15): 8532-8539.
- Lahive, E., Mstzeke, M., Svendsen, C. Spurgeon, D.J., Pouran, H., Zhang, H., Lawior, A., Pereira, G.M. and Lofts, S. (2023) Soil properties influence the toxicity and availability of Zn from ZnO nanoparticles to earthworms. *Environmental Pollution*, **319**: 120907.
- Lee, S.H. and Lee, B.G. (2021) Bioaccumulation of Ag and Zn in earthworms (*Eisenia fetida*) from soil contaminated with Ag and Zn nanoparticles using a radiotracer method. *Korean J. Environ. Biol.*, **39**: 550-558.
- Li, W.M. and Wang, W.X. (2013) Distinct biokinetic behavior of ZnO nanoparticles in *Daphnia magna* quantified by synthesizing <sup>65</sup>Zn tracer. *Water Research*, **47**(2): 895-902.
- Li, W.-Q., Qing, T., Li, C.-C., Li, F., Ge, F., Fei, J.-J. and Peijnenburj, W.J.G.M. (2020) Integration of subcellular partitioning and chemical forms to understand silver nanoparticles toxicity to lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Chemosphere*, **258**: 127349.
- Ma, H., Williams, P.L. and Diamond, S.A. (2013) Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - a review. *Environmental Pollution*, **172**: 76-85.
- Maurer-Jones, M.A., Gunsolus, I.L., Murphy, C.J. and Haynes, C.L. (2013) Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Analytical chemistry*, **85**(6): 3036-3049.
- Meyer, J.N., Lord, C.A., Yang, X.Y., Turner, E.A., Badireddy, A.R., Marinakos, S.M., Chilkoti, A., Wiesner, M.R. and Auffan, M. (2010) Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquatic Toxicology*, **100**(2): 140-150.
- Mirsa, S.K., Dybowska, A., Berhanu, D., Croteau, M.N., Luoma, S.N., Boccacini, A.R. and Valsami-Jones, E. (2012) Isotopically modified nanoparticles for enhanced detection in bioaccumulation studies. *Environmental Science and Technology*, **46**(2): 1216-1222.
- Mouneyrac C., Amiard J.C. and Amiard-Triquet C. (1998) Effect of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters (*Crassostrea gigas*) from a polluted estuary. *Marine Ecology Progress Series*, **162**: 125-135.
- Newman, M.C. and Clements, W.H. (2008) Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment. CRC Press.
- O'Connor T.P. (1996) Trends in chemical concentrations in mussels and oysters collected along the US coast from 1986 to 1993. *Marine Environmental Research*,

31(2): 183-200.

- Odzak, N., Kistler, D., Behra, R. and Sigg, L. (2014) Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. *Environmental Pollution*, **191**: 132-138.
- Pandey, L.K., Park, J., Son, D.J., Kim, W., Islam, M.S., Choi, S., Lee, H. and Han, T. (2019) Assessment of metal contamination in water and sediments from major rivers in South Korea from 2008 to 2015. *Science of the Total Environment*, **651**: 323-333.
- 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): 116-126.
- Song, Y., Choi, M.S., Lee, J.Y. and Jang, D.J. (2014) Regional background concentrations of heavy metals (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Pb) in coastal sediments of the South Sea of Korea. *Science of the Total Environment*, **482**: 80-91.
- U.S. EPA. (2002) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater marine organisms, 5th edition. EPA-821-R-02-012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.
- Wallace, W.G., Lee, B.G. and Luoma, S.N. (2003) Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series*, **249**: 183-197.
- Wang, W.X. and Fisher, N.S. (1996) Assimilation of trace elements by the mussel *Mytilus edulis*: effects if diatom chemical composition. *Marine Biology*, **125**: 715-724.
- Wang, W.X. and Fisher, N.S. (1999) Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**(9): 2034-2045.
- Wang, Y. and Nowack, B. (2018) Dynamic probabilistic material flow analysis of nano-SiO<sub>2</sub>, nano iron oxides, nano-CeO<sub>2</sub>, nano-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and quantum dots in seven European regions. *Environmental Pollution*, **23**: 589-601.