

미량금속 노출에 따른 갯지렁이(*Perinereis nuntia*)의 미량금속 축적 및 생리화학적 반응

원은지¹ · 나공태² · 홍성진¹ · 김정태² · 이재성³ · 신경훈^{1,†}

¹한양대학교 과학기술대학 해양환경과학과

²한국해양연구원 해양환경·방제연구부

³한양대학교 자연과학대학 화학과

Effect of Trace Metal on Accumulation and Physiological Response of the Polychaete, *Perinereis nuntia*

Eun-Ji Won¹, Kongtae Ra², Seongjin Hong¹, Kyung-Tae Kim²,

Jae-Seong Lee³ and Kyung-Hoon Shin^{1,†}

¹Department of Environmental Marine Sciences, College of Science and Technology,
Hanyang University, Ansan 426-791, Korea

²Marine Environment & Pollution Prevention Research Department, Korea Ocean Research and
Development Institute (KORDI), Ansan 426-744, Korea

³Department of Chemistry, Hanyang University, College of Natural Sciences, Seoul 133-791, Korea

요 약

환경 내 미량금속 오염의 지표생물로 널리 이용되고 있는 갯지렁이의 체내 미량금속 축적 및 생체지표 변화를 연구하기 위하여 구리와 카드뮴에 혼합 노출시킨 *Perinereis nuntia*의 체내 미량금속의 농도, 금속결합 단백질(metallothionein-like proteins, MTLPs) 및 항산화효소 중 하나인 글루타치온 S-전이효소(glutathione S-transferase, GST)를 분석하였다. 갯지렁이 체내 미량금속의 농도는 노출 시간과 농도에 따라 증가하였으며, 특히 카드뮴 노출 초기의 축적률과 시간에 따른 증가율이 구리에 비해 높았다. 시간에 따른 미량금속 체내 축적률(net accumulation rate)은 카드뮴의 경우 초기에 높은 값을 보인 후 시간에 따른 증감이 보이지 않았으나, 구리는 노출시간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 노출시킨 구리의 농도에 따라 두 원소의 축적이 저해되었으며, 이는 원소에 따라 다른 체내 흡수 기작이 있음을 보여주고 있다. 금속결합 단백질은 노출 후 6 시간째 가장 높은 농도를 보였으며 이후 노출시간 증가에 따라 감소하는 경향을 보였으나, 구리의 농도를 100 µg/L, 200 µg/L로 처리한 실험군의 48 시간째를 제외하고 노출시간과 농도에 따라 유의한 변화를 보이지 않았다. 항산화효소인 글루타치온 S-전이효소의 경우 시간과 농도에 따라 증가하는 경향을 보였으며 갯지렁이 체내 미량금속의 농축 비와 유사하게 높은 구리 농도에서 24 시간 이후 감소하는 경향을 보였다. 본 연구를 통해 구리와 카드뮴이 동시에 영향을 미칠 때 *P. nuntia*의 체내 미량 금속의 축적과 생체지표의 반응에 대한 정보를 얻을 수 있었으며, 향후 다양한 오염물질에 대한 체내 축적 및 생체지표를 이해하기 위한 연구가 요구된다.

Abstract – Metal exposure experiments using polychaete (*Perinereis nuntia*) as a bio-indicator of trace metals contamination were conducted to evaluate the bioaccumulation and the biomarkers responses such as metallothionein-like protein (MTLPs) and glutathione S-transferase (GST) which was simultaneously exposed to Cadmium (Cd) and Copper (Cu). Cu and Cd concentrations in polychaete were enhanced with increasing exposure time and their concentrations of aqueous medium. Initial accumulation of Cd was higher than that of Cu. Our results showed that the bioaccumulation of Cu and Cd were prohibited, especially at higher Cu levels, suggesting the different cellular uptake mechanisms when Cu and Cd are co-exist. Net accumulation rate of Cu was

[†]Corresponding author: shinkh@hanyang.ac.kr

declined with exposure time but it did not show any significant change for Cd. Although the highest MTLPS concentration was observed at 6 hr of exposure time, it did not show any significant change related to exposure times and metals concentrations. An increase of GST activity tended to increase as a function of exposure time and metals concentrations. And GST activities in *P. nuntia* have similar tendency with bioconcentration factors in high concentration of Cu (treatment group IV) at post 24 h of exposure. Our results provide new information of the bioaccumulation and biomarker responses to understand the effects of co-existing contaminants (Cu and Cd) using polychaete. Further studies are required to elucidate the bioaccumulation and biomarkers responses for various contaminants.

Keywords: Polychaete(갯지렁이), bioaccumulation(생물농축), trace metals(미량금속), biomarker(생체지표), Metallothionein-like proteins(금속결합 단백질), Glutathione *S*-transferase(글루타치온 *S*-전이효소)

1. 서 론

급속한 경제성장 및 산업 활동에 의해 발생된 다양한 오염물질은 강이나 하천 혹은 대기를 통하여 해양으로 유입된다. 미량금속은 환경 내 미량으로 존재하며, 생물의 기능 유지에 필요한 필수 금속 및 해로운 영향을 미치는 비필수금속으로 구분할 수 있다. 필수금속 역시 언제나 독성의 잠재력을 가지고 있어 체내의 임계농도까지는 방어기작 및 유지기작을 통해 조절될 수 있지만 그 한계를 넘을 시에 독성을 나타낸다(Hopkin, 1989). 카드뮴은 낮은 농도에서도 심각한 생물독성을 나타내며(Sorensen, 1991), 구리는 카드뮴과 달리 필수금속으로써 metalloenzyme와 respiratory pigment 등의 세포대사에 필요한 원소이다(Cousins, 1985). 이러한 미량금속은 환경 내에서 분해가 되지 않고 생물체 내에 축적되어 먹이사슬을 통해 상위영양단계로 농축되어 그 위해성이 크다(Gnandi and Tobschall, 1999; Morillo *et al.*, 2004; Vazquez and Sharma, 2004). 해양에 유입된 용존 형태의 미량금속은 입자와의 친화력이 크기 때문에 입자물질에 흡착되어 침강하여 퇴적물 내 축적되고 있다. 퇴적물 내 존재하는 미량금속은 해수에 비해 상대적으로 안정된 형태로 존재하지만 물리·화학적 환경변화에 따라 재부유되거나 수층으로 재용출되기도 한다.

저서생물은 퇴적물에 존재하는 오염물질에 직접적으로 노출되기 때문에 오염물질의 독성을 평가하기 위한 모니터링에 다양한 지표생물로 이용되고 있다(Brown and Luoma, 1995; Lotufo *et al.*, 2001; Zorita *et al.*, 2007; Martín-Díaz *et al.*, 2007). 지표생물은 그 환경을 가장 잘 대표하는 종으로써 어류와 같이 이동성이 큰 생물보다는 제한적인 이동을 보이는 저서생물이 이용된다. 다양한 지표생물 중 갯지렁이(Polychaete)는 퇴적물에 서식하면서 퇴적물 내 유기물을 섭식하기 때문에 유해 퇴적환경 내 오염에 대한 감시자로 많이 이용되고 있으며, 상위 영양자의 먹이가 되므로 먹이연쇄에 있어 오염물질의 이동 및 축적에 기여하고 있다(Sato and Nakashima, 2003; Zhou *et al.*, 2003; Won *et al.*, 2008).

기존에 수행되었던 해수, 퇴적물 및 생물 체내 미량금속 농도를 개별적으로 분석하는 연구의 단점을 보완하고 오염물질이 생물에 미치는 영향을 명확하게 알기 위해 최근에는 생물학적 이용성과 생물화학적 독성연구가 활발히 진행되고 있다(Serafim *et al.*, 2002;

Martín-Díaz *et al.*, 2007; Won *et al.*, 2008). 생체지표 연구는 환경 스트레스에 대한 생물체의 지표물질로 오염물질에 대한 정성적인 수치를 제공하며, 환경오염평가를 개체 이하의 수준에서 조기에 진단하고 복원하기 위한 방법의 하나이다(Peakall and Shugart, 1993; Sarkar *et al.*, 2006). 실제 환경에 서식하는 생물은 다양한 환경 스트레스에 영향을 받고 있기 때문에 이러한 영향에 대하여 복합적인 연구가 필요하지만 그 연구 및 예측이 어렵기 때문에 실험실 내에서 수온, 염분의 영향 및 일부 오염 물질에 대한 영향과 생물체 내 축적 및 독성에 대한 연구가 실행되고 있으며(Langston *et al.*, 1998; Serafim *et al.*, 2002; Mosleh *et al.*, 2006; Sun and Zhou, 2007), 이러한 연구를 토대로 오염 및 환경변화에 대한 조기오염경보지표로서 지표생물과 생체지표를 이용하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다(Ait *et al.*, 2006; Won *et al.*, 2008).

본 연구에서는 퇴적환경의 미량금속 오염을 모니터링 하기 위한 예비연구로서 실험실 내에서 갯지렁이 *P. nuntia*를 독성 및 세포 산화에 관여하는 카드뮴과 구리에 동시 노출시켜 미량금속 이용성과 생체지표 반응에 대하여 조사하였다. 동시 노출된 구리 농도에 따라 카드뮴과 구리의 축적 정도를 비교함으로써 카드뮴과 구리의 복합독성이 갯지렁이 체내 미량금속의 축적과 아울러 갯지렁이의 생체지표로서 금속결합 단백질(Metallothionein-like proteins; MTLPS)과 항산화요소 중 하나인 글루타치온 *S*-전이효소(glutathione *S*-transferase; GST)의 변화에 미치는 영향을 알아보았다.

2. 재료 및 방법

2.1 노출실험

실험에 이용한 갯지렁이는 참갯지렁이과에 속하는 눈썹참갯지렁이(*Perinereis nuntia*)로 전라남도 여수 갯지렁이 양식장에서 구입하였다. 크기에 따른 오차를 피하기 위하여 체중 0.05 ± 0.01 g 인 개체를 선별하여 실험을 진행하였다. 실험 전 갯지렁이는 실험실에서 72 시간의 순치기간을 두었으며, 총 720 개체를 구리와 카드뮴을 첨가한 2 L의 각각의 수조에 48 시간 동안 노출시켰다. 카드뮴의 농도는 동일종에 대한 이전의 연구에서 7 일 간의 노출 동안 치사가 나타나지 않고, 동일 시간에 금속결합 단백질(Metallothionein-

like proteins)의 농도가 가장 높았던 농도로 선정하였으며, 구리의 농도는 동일한 실험에서 반치사 농도보다 낮은 범위 하에서 선정하였다(Won *et al.*, 2008). 구리와 카드뮴은 각각 1000 mg/L의 atomic absorption spectrometry(AAS)용 standard 용액(Merck Co., Germany)을 이용하였으며 pH의 영향을 배제하기 위하여 미리 산 세척된 테프론 용기에 증발시킨 후 재 용해시킨 다음 waterborne exposure test로 진행하였다. 노출시킨 농도는 I)카드뮴 50 µg/L (Cd50), II)카드뮴 50 µg/L과 구리 50 µg/L(Cd50 + Cu50), III)카드뮴 50 µg/L과 구리 100 µg/L (Cd50 + Cu100), IV)카드뮴 50 µg/L과 구리 200 µg/L (Cd50 + Cu200)로써 카드뮴의 농도는 고정하고 구리의 농도를 증가시켜 노출시켰다. 대조군은 미량금속의 농도를 조절하지 않은 동일한 해수에 노출 시켰다. 실험기간 동안 먹이를 급여하지 않았으며, 24 시간에 한번 90 %의 시험수를 교환 해주었다. 수온과 pH 그리고 염분은 실험과정 동안 각각 25 °C, pH 8.1 ± 0.1, 30 psu가 유지되도록 하였다. 갯지렁이 체내 미량금속과 생체지표 분석을 위한 시료 채취는 노출 시작 후 6, 12, 24 시간 그리고 48 시간에 각각의 수조에서 항목별 12 개체씩을 취하였다.

2.2 미량금속 분석

P. nuntia 체내 미량금속 분석을 위하여 카드뮴과 구리에 노출시킨 갯지렁이를 증류수로 여러 차례 세척한 후 동결 건조하였다. 건조된 *P. nuntia*는 미리 산 세척된 테프론 용기에 넣고 Supra급 질산 5 mL를 가한 뒤 180 °C에서 24 시간 동안 생물이 완전 분해될 때까지 가열하였으며 산을 증발시킨 후 2% 질산으로 희석하여 Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry(ICP-MS, Thermo elemental X-7)로 분석하였다. 미량금속 분석을 위한 시료는 농도 및 시간 별 4 개체의 갯지렁이를 풀링하여 3 반복 분석하였으며 분석 된 농도를 평균하였다. 표준물질은 NRC Canada의 DORM-2와 NOAA의 CRM 2976을 이용하였으며 99~101%의 높은 회수율을 보였다(Table 1).

2.3 생물 농축계수

실내 노출 시간 동안 갯지렁이 체내 축적된 미량금속에 대한 생물 농축계수(bioconcentration factor, BCF)는 처리한 해수의 미량금속 농도와 갯지렁이 체내 미량금속 농도를 이용하여 다음과 같이 계산하였다.

$$BCF = \frac{(C_{exposure} - C_{control})}{C_{seawater}}$$

Table 1. Recovery rate of standard reference materials in this study

	DORM-2 (µg/g dw)		CRM 2976 (µg/g dw)	
	Cd	Cu	Cd	Cu
Verified values	0.043	2.34	0.83	4.02
Analytical values	0.044±0.008	2.32±0.21	0.81±0.16	4.01±0.11
Recovery (%)	101.2	98.9	99.0	99.7

여기서 $C_{exposure}$ 과 $C_{control}$ 은 노출 전후 갯지렁이 체내 미량금속 농도(µg/g dry wt.%)를 나타내며 $C_{seawater}$ 는 노출시켜준 해수의 농도(µg/L)를 나타낸다.

또한 시간에 따른 갯지렁이 체내 미량금속 축적률을 비교하기 위하여 체내 축적률(net accumulation rate)은 다음과 같이 계산하였다(Zhou *et al.*, 2003).

$$Net\ accumulation\ rate = \frac{(C_{exposure} - C_{initial})}{t}$$

$C_{initial}$ 은 갯지렁이 초기 미량금속 농도를 나타내며 t는 노출시킨 시간을 나타낸다.

2.4 생체지표

금속결합단백질(Metallothionein-like proteins, MTLPs); MTLPs는 체내에서 금속과 결합하여 항상성 조절, 또는 무독화 작용을 하는 단백질로써 spectrophotometric method(Viarengo *et al.*, 1997)로 분석하였다. 미량금속에 노출시킨 갯지렁이를 antiproteolytic agent가 포함된 buffer에서 균질화한 후 원심분리하여 metallothionein이 포함되어 있는 cytosol을 분리한 뒤 DTNB(5,5-dithiobis-2-nitrogen benzoic acid; Ellman's reagent)로 발색시켜 412 nm(pH 8)에서 흡광도로 정량하였고, Standard는 reduced glutathione(GSH)를 이용하였다.

글루타치온 S-전이효소(Glutathione S-transferase, GST); GST는 세포의 산화적 손상에 대항하는 중요한 방어기작의 하나로 진화적으로 잘 보존된 효소로써 세포 내 중요한 항산화제인 GSH와의 conjugation을 통해 다양한 xenobiotic화합물의 해독기작에 관여한다. 분석은 균질화 된 갯지렁이 시료를 18000 g에서 90 분간 원심 분리 한 세포 분획의 상등액을 취하여 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)와 GSH를 기질로 하는 혼합시약을 가해 340 nm 파장에서 4 분 동안 GSH와 CDNB의 결합으로 인해 증가하는 흡광도를 측정하였다(Regoli *et al.*, 1997). 항목별 12 개체의 *P. nuntia*를 채취하여 4 개체의 갯지렁이를 풀링하여 세 번 반복 분석하여 평균하였다. 시료 내의 총 단백질은 균질화 된 상등액을 취하여 Bradford 방법을 따라 측정하였으며, standard는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다(Bradford, 1976).

2.5 통계분석

측정된 미량금속 농도와 생체지표는 평균값(± SD)으로 나타내었고 각각의 처리군에 대한 일원분산분석(One-way ANOVA)을 실시하였으며, 유의성 $p < 0.05$ 수준에서 사후검정을 실시하였다(Tukey's post hoc analysis). 체내 미량금속의 농도 및 축적비에 대한 측정치의 비교는 t-검정을 하였다(t-test, $p < 0.05$). 체내 축적된 미량금속 농도, 생물농축비(bioconcentration factors), 체내 축적률(bioaccumulation rate) 및 생체지표(MTLPs and GST)간의 상관관계는 피어슨 상관관계(Pearson's correlation coefficient; $p < 0.05$)로 나타내었다. 통계 프로그램은 SPSS® version 17.0 software를

이용하였다(SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. 결과 및 고찰

3.1 갯지렁이 체내 미량금속 농도

해수의 농도를 조절하지 않은 대조군의 경우, 구리와 카드뮴의 *P. nuntia* 체내 초기 농도는 각각 $18.3(\pm 2.1)$, $0.39(\pm 0.08)$ $\mu\text{g/g}$ 이었으며, 48 시간 후 구리 $17.9(\pm 1.9)$ $\mu\text{g/g}$, 카드뮴 $0.37(\pm 0.07)$ $\mu\text{g/g}$ 을 보여 시간에 따른 유의한 변화가 없었다. 카드뮴과 구리를 처리한 실험군에서 *P. nuntia* 체내 구리와 카드뮴의 농도는 노출 시간과 금속의 농도에 따라 증가하는 경향을 보였다. 실험군 I(Cd 50)의 경우 노출시간 6, 12, 24 그리고 48 시간 후 구리의 농도는 각각 $20.7(\pm 5.4)$, $16.6(\pm 2.1)$, $13.9(\pm 1.0)$, $18.7(\pm 1.0)$ $\mu\text{g/g}$ 으로 변화가 없었으며, 카드뮴의 농도는 각각 $0.66(\pm 0.14)$, $0.84(\pm 0.06)$, $0.98(\pm 0.10)$, $2.39(\pm 0.10)$ $\mu\text{g/g}$ 으로 시간에 따라 증가하였다. 실험군 II(Cd50 + Cu50)의 경우 구리는 시간에 따라 $25.2(\pm 1.7)$, $30.1(\pm 0.11)$, $39.5(\pm 6.6)$ 그리고 $46.4(\pm 1.0)$ $\mu\text{g/g}$ 으로 증가하였으며, 카드뮴의 경우 $0.71(\pm 0.04)$, $0.93(\pm 0.02)$, $1.81(\pm 0.09)$ 그리고 $3.03(\pm 0.10)$ $\mu\text{g/g}$ 까지 증가하였다. 실험군 III(Cd50+Cu100)의 경우 노출시간 6, 12, 24 그리고 48 시간 후 구리의 농도는 각각 $39.8(\pm 12.6)$, $35.5(\pm 3.1)$, $82.0(\pm 1.0)$ 그리고 $137.6(\pm 2.0)$ $\mu\text{g/g}$, 카드뮴의 농도는 $1.36(\pm 0.84)$, $0.85(\pm 0.13)$, $2.26(\pm 0.10)$ 그리고 $3.93(\pm 0.10)$ $\mu\text{g/g}$ 으로 실험군 II보다 높은 농도를 보였다. 그러나 실험군 IV의 경우 시간에 따른 구리의 농도는 $39.5(\pm 1.7)$, $46.7(\pm 1.0)$, $53.0(\pm 1.8)$ 그리고 $59.9(\pm 1.00)$ $\mu\text{g/g}$ 으로 실험군 III에 비해 낮았으며, 카드뮴 역시 $0.85(\pm 0.04)$, $0.86(\pm 0.10)$, $2.06(\pm 0.051)$ 그리고 $1.41(\pm 0.10)$ $\mu\text{g/g}$ 였다. *P. nuntia* 체내 구리 농도는 카드뮴에 단독 노출시킨 실험군 I의 경우(Cd50)를 제외하고 모든 실험군에서 12 시간까지는 유의한 증가를 보이지 않았으며($p>0.05$), 24 시간과 48 시간에서 초기 농도에 비해 크게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1a; $p<0.05$). 카드뮴의 경우 12 시간째 초기 농도에 비해 두 배 이상의 농도를 보여 카드뮴이 구리에 비해 노출 초기 갯지렁이 체내 축적률이 높은 것으로 나타났으며 시간 별 체내 증가량이 구리에 비해 카드뮴이 더 높았다(Fig. 1b). 구리 농도를 증가시킨 실험군 III(Cd50 + Cu100)의 경우, 12 시간까지는 실험군 II(Cd50 + Cu50)와 큰 차이를 보이지 않지만 24 시간째에는 갯지렁이 체내 구리 흡수가 급격히 증가하여 초기 농도의 약 4.5 배인 $82.0 \mu\text{g/g}$, 48 시간째에는 7.5 배에 달하는 $137.6 \mu\text{g/g}$ 의 높은 농도를 보였다. Sun and Zhou (2007)는 $3000 \mu\text{g/L}$ 의 카드뮴에 노출시킨 갯지렁이(*Hediste japonica*)의 체내 농도가 노출 후 72 시간째 $400 \mu\text{g/g}$ 을 넘는 농도를 축적함을 확인하였고, 노출 6 일째 $581.5 \mu\text{g/g}$ 까지 증가하였으며, Won et al.(2008) 역시 구리와 카드뮴에 각각 노출시킨 *P. nuntia* 체내 미량금속의 농도가 짧은 시간 급격히 증가함을 보여 갯지렁이가 체내 높은 미량금속을 축적할 수 있음을 보여준 바 있다. 그러나 구리의 농도가 가장 높은 실험군 IV(Cd50 + Cu200)의 갯지렁이는 실험군 III에 비해 낮은 체내 축적률을 보였으며, 카드뮴 농도에서도 동일한

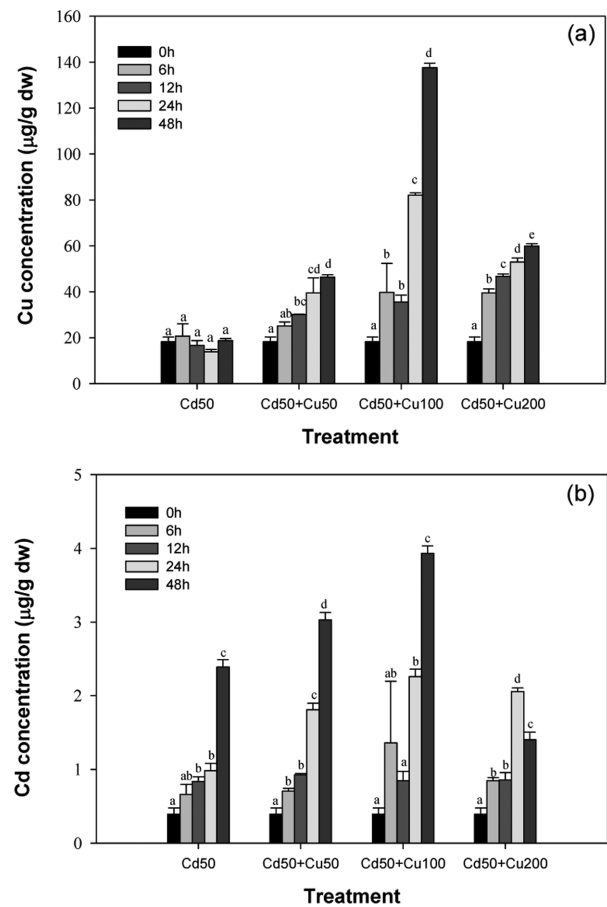


Fig. 1. Cu and Cd concentration in *P. nuntia* (a) Copper and (b) Cadmium. Values (mean $\pm$ SD) with different letters (a, b, c, d and e) indicate significant differences over initial values (t = 0h) at same treatment, n=3, $p<0.05$.

경향을 보였다(Fig. 1, $p<0.05$). *P. nuntia* 체내 축적 된 카드뮴과 구리 농도는 실험군 II(Cd50 + Cu50)에서의 증가량과 유사하였다. 카드뮴에만 단독으로 노출시킨 실험군 I에서 갯지렁이 체내 축적 된 카드뮴의 농도는 노출 시간에 따라 $0.6 \mu\text{g/g}$ 에서 $2.4 \mu\text{g/g}$ 까지 증가하였으며, 이때 BCF값은 노출 6 시간째 5.4 였으나 48 시간째 40 까지 증가하였다. 하지만 카드뮴과 구리를 같은 농도에서 동시 노출시킨 실험군 II의 경우 카드뮴의 농도는 48 시간에서 $3.0 \mu\text{g/g}$ 까지 유의한 증가를 보였으며 48 시간째 BCF값은 52.8, 실험군 III의 경우 70.8의 높은 값을 보였다(Fig. 1, Table 2). 갯지렁이 체내 카드뮴 농도는 동시에 노출시킨 구리 농도의 증가에 따라 통계학적으로 유의하게 증가하는 경향을 보였으며 카드뮴을 단독 노출시킨 경우에 비해 약 1.5 배의 카드뮴을 더 축적하는 것으로 나타났다(Fig. 1(b), $p<0.05$). 구리의 농도를 가장 높게 처리한 실험군(Cd50 + Cu200)에서 카드뮴의 축적은 다른 실험군에 비해 낮은 증가율을 보였다(Table 2). 카드뮴의 농도가 일정할 때 구리 농도가 $100 \mu\text{g/L}$ 이하에서는 구리의 존재가 카드뮴의 축적을 증가시키고 시간에 따라 카드뮴과 구리의 축적이 증가하지만 구리의 농도가 높을 때($\text{Cu } 200 \mu\text{g/L}$)에는 카드뮴과 구리 모두 체내 축적

Table 2. Bioconcentration factors (BCFs) of *P. nuntia* exposed at 50 µg/L of Cd and different concentrations of Cu.

Cu (µg/L)	Cu				Cd			
	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr
0 [*]	-	-	-	-	5.4	8.9	11.8	40.0
50 ^{**}	138	237	424	563	6.3	10.7	28.3	52.8
100 ^{***}	215	172	638	1193	19.4	9.1	37.4	70.8
200 ^{****}	106	142	173	208	9.1	9.3	33.3	20.3

^{*}treatment I; ^{**}treatment II; ^{***}treatment III; ^{****}treatment IV

Table 3. Net accumulation rate of *P. nuntia* exposed at 50 µg/L of Cd and different concentrations of Cu.

Cu (mg/L)	Cu				Cd			
	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr
0 [*]	-	-	-	-	0.04	0.04	0.02	0.04
50 ^{**}	1.15	0.99	0.88	0.59	0.05	0.04	0.06	0.05
100 ^{***}	3.59	1.44	2.66	2.49	0.16	0.04	0.08	0.07
200 ^{****}	3.55	2.37	2.18	0.87	0.08	0.04	0.11	0.02

^{*}treatment I; ^{**}treatment II; ^{***}treatment III; ^{****}treatment IV

이 낮아 갯지렁이의 체내 미량금속 흡수 및 이용 메커니즘에서 영향을 미치는 것으로 보여졌다.

갯지렁이 체내 미량금속 축적률은 구리의 경우 노출시간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으나, 카드뮴은 초기 노출 6 시간에서 높은 값을 보인 후 시간에 따른 뚜렷한 증감이 보이지 않았다(Table 3). 이는 갯지렁이(*Hediste japonica*)를 구리와 카드뮴에 각각 노출시켰을 때 체내 구리 축적률이 카드뮴과 달리 감소하는 경향을 보인 기존의 연구 결과와 유사하였다(Sun and Zhou, 2007).

이매패류 및 복족류(굴, 진주담치 및 총알고둥)를 이용한 연구 결과에서도 다양한 미량금속에 동시 노출시켰을 때 체내 미량금속의 축적기작의 간섭효과로 인해 특정 미량금속의 체내 축적이 증가되거나 저해된다고 보고된 바 있다(Elliott *et al.*, 1986; Engel, 1999; 한 등, 2001). 본 연구에서 나타난 구리와 카드뮴의 갯지렁이 체내 축적 농도 감소 및 체내 축적률 저해는 낮은 구리 농도(Cu 100 µg/L)에서는 구리의 흡수와 배출의 조절 기작을 가지고 있으나, 높은 구리 농도(Cu 200 µg/L)에서는 구리의 독성으로 인해 갯지렁이의 체내 구리 흡수가 저해된 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 카드뮴과 구리에 노출된 얼룩말 홍합(*Dreissena polymorpha*)의 경우에서도 보인 바 있으며 카드뮴이 구리의 축적에 큰 영향을 미치지 않았으나, 구리로 인한 여과속도의 감소가 카드뮴의 축적을 조절한다고 보고된 바 있다(Lecoeur *et al.*, 2004). Kraak *et al.*(1992) 역시 카드뮴과 구리의 축적으로 인한 *D. polymorpha*의 생리학적 변화(여과속도 등)의 영향을 보인바 있으며, Marcano *et al.*(1996)은 구리와 아연에 동시 노출된 갯지렁이(*Eurythoe complanatu*)가 각각의 금속에 노출되었을 때보다 낮은 체내 금속 농도를 보인 결과에 대해 두 금속간의 작용이 갯지렁이 체내에서 균형이 유지되던 금속의 축적과 독성을 변화시켰기 때문이라고 언급하였다. 본 연구에서도 높은 구리의 농도(Cu 200 µg/L)에 48시간 노출된 갯지렁이 *P. nuntia*는 체내 미량 금속의 흡

수와 배출에 대한 조절 기작이 달라졌음을 보여주며, 그 결과 증가하던 카드뮴과 구리의 생체축적률이 감소하고 체내 농도 또한 감소한 것으로 사료된다.

3.2 생체지표 변화

카드뮴과 구리를 동시에 노출시킨 갯지렁이 체내 MTLPs는 초기에 637.9(±53.0) µg MT/g wet wt를 보인 반면 노출 후 6 시간째 가장 높은 농도를 보였으며($p < 0.05$), 이후에는 그 농도가 급격히 감소하여 초기 농도보다 낮은 값을 보였다(Fig. 2). 일부 농도에서 48 시간째 초기 농도와 유사한 체내 MTLP 농도를 보였으며 MTLPs의 농도가 12 시간째 감소 후 유의한 변화가 없던 실험군 I과 II의 경우 체내 항산화효소 GST의 함량은 유의한 증가 경향을 보였다(Fig. 3). 노출 12 시간째와 48 시간째 구리의 체내 생물농축계수(BCF)와 MTLPs가 양의 상관관계를 보여($r > 0.8$; $p < 0.05$)

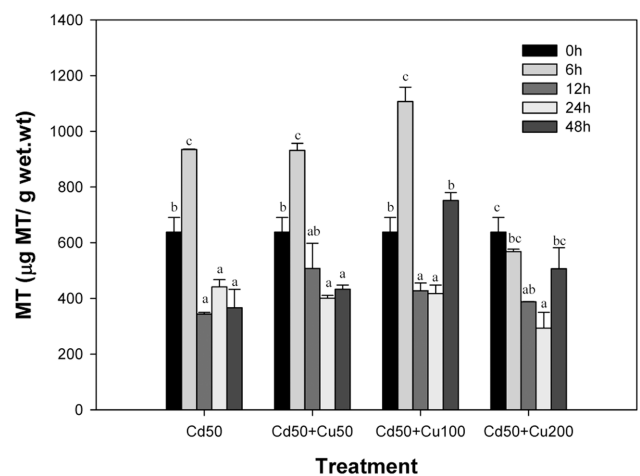


Fig. 2. Metallothionein-like protein in *P. nuntia* (µg MT/g wet wt). Values (mean ± SD) with different letters (a and b) indicate significant differences over initial values at same treatment, $n=3$, $p < 0.05$.

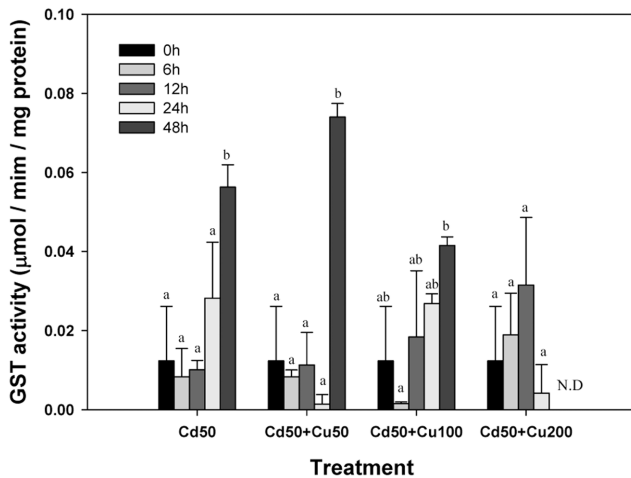


Fig. 3. Glutathione S-transferase in *P. nuntia* (μmol/min/mg protein). Values (mean ± SD) with different letters (a and b) indicate significant differences at the same treatment (n=3, p<0.05), N.D. indicates not detected.

앞서 언급한 바와 같이 해수로부터 체내에 축적한 구리 농도가 갯지렁이 체내 MTLPs의 증감에 영향을 주고 있음을 보였다(Fig. 2). 하지만 각각의 처리군에서의 시간에 따른 MTLPs는 유의한 증가는 보이지 않았으며($p>0.05$), 동일 시간대에서 해수 중 미량금속의 농도에 따른 MTLPs 역시 유의한 변화가 보이지 않았다($p>0.05$).

구리와 카드뮴에 단독 노출을 실시한 선행연구에서도 *P. nuntia*의 체내 MTLPs는 일부 농도범위를 제외하고 노출시킨 미량금속의 농도와 뚜렷한 상관관계를 보이지 않았으며, MTLPs의 감소가 보여진 농도 범위 이상에서는 치사하는 개체가 증가하였다(Won *et al.*, 2008). 이는 체내 축적된 미량금속에 대한 또 다른 방어기작으로 인한 MTLPs의 생성속도의 감소와 함께 세포 내 축적된 금속 이온(Cu^{2+})에 의해 형성된 hydroxyl radicals(OH $\cdot$) 이온의 세포벽, 단백질, 그리고 DNA를 손상시키는 강력한 산화능력으로 인한 대사 조절 및 해독 기작의 손상 때문으로 사료된다(Posthuma and van Straalen, 1993; Suzuki *et al.*, 1996).

갯지렁이 체내 GST의 경우 일부 농도에서 시간에 따라 증가하는 경향을 보이고 있으며, 실험군 IV(Cd50 + Cu200)을 제외한 모든 실험군에서 48 시간 노출에서 가장 높은 activity를 보여 체내 축적된 미량금속에 의한 세포 산화에 대한 방어기작으로써의 갯지렁이 *P. nuntia* 체내 GST의 활성을 확인하였다(Fig. 3). 특히 카드뮴 단독 노출의 경우, GST는 체내 축적된 카드뮴 농도 및 체내 축적물과 높은 상관관계를 보여 체내 축적되는 카드뮴의 농도가 체내 GST와 유의한 상관성을 나타냈다($r=0.9$, $p<0.05$; $r=0.8$, $p<0.05$). 실험군 II(Cd50 + Cu50)와 실험군 III(Cd50 + Cu100)에서도 GST는 체내 축적된 카드뮴과 구리 농도 및 생물농축계수와 높은 양의 상관관계를 보여($r>0.6$, $p<0.05$) 체내 축적된 미량 금속이 야기하는 산화스트레스에 대한 방어기작으로써 GST activity의 증가를 확인하였다. 또한 노출 후 48 시간째 MTLPs의 농도의 유의한 차이가 없는 실험군 I과 II는 MTLPs의 농도가 유의하게

증가하는 실험군 III과 IV와 유의하게 증가한 GST의 함량을 보여 MTLPs와 GST의 동시적인 금속독성 조절 기능을 예상할 수 있었다. 구리농도가 높은 실험군(Cd50 + Cu200)에서는 노출 6시간째와 12 시간째 다른 실험군에 비해 높은 GST농도를 보였지만 24시간 이후에는 그 값이 감소하여 시간 및 노출농도와 유의한 상관성을 보이지 않았다(Fig. 3).

갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)를 이용한 연구에서 구리와 원유기원의 탄화수소(Petroleum Hydrocarbons)에 각각 노출시켰을 때 시간에 대한 항산화 물질 superoxide dismutase(SOD) activity의 유의성이 보여진 반면, 두 오염물질에 동시 노출시켰을 때에는 유의한 관계가 보이지 않았다(Sun *et al.*, 2009). 이러한 차이는 혼합된 오염물질의 종류 및 농도에 따라서도 다른 경향이 나타나며, 단독 노출과 여러 가지 오염물질이 동시에 존재할 때 또 다른 항산화 효소가 활성화 될 수 있음을 보여주고 있다. Freedman *et al.*(1989)은 체내 흡수된 미량금속이 metallothionein(MT)보다 thiol-화합물(-SH compound)과 일차적으로 결합한다고 보고하였으며, Ferreira *et al.*(1993) 또한 체내 흡수된 구리가 GSH에서 MT로 이동함을 보여 생물체 내에서 MT 이외의 금속 결합 물질로 인한 금속의 우선적인 결합이 이루어지고 있음을 보였다. 또한 갯지렁이 생체지표(MTLPs and GST)의 개체 별 큰 편차와 시간 및 노출 농도에 따른 낮은 유의성은 GST와 MTLPs(혹은 MT)의 다양한 isoform의 발현 정도의 차이 때문으로 사료된다.

본 연구는 카드뮴과 구리의 동시 노출 시 갯지렁이 *P. nuntia*에 대해 생물농축 및 체내 흡수율 등의 생물 이용성과 생체지표의 반응에 대한 결과를 보여주며, 이는 다양한 오염물질이 존재하는 실제 환경에서의 이용에 제약이 있기 때문에 향후 다양한 오염물질(미량금속 및 유기오염물질)에 대한 동시 노출에 대해 연구가 필요하다. 아울러 환경 내 미량금속은 실제 급성 독성 실험 시 이용되는 농도에 비해 미량으로 존재하기 때문에 실제 해양환경(수환경 및 퇴적물) 및 해양생물 내 오염물질 축적에 따른 생물체 내 영향을 평가하기 위해서는 장기간에 걸친 모니터링이 요구된다. 또한 다양한 생체지표의 생성기작을 이해하고 조기오염경보지표로써 이를 활용한다면, 오염된 환경에서 서식하는 해양생물들의 생체지표가 환경 평가에 있어 유용할 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 카드뮴과 구리에 동시에 노출시킨 *P. nuntia* 체내 미량금속 농도 및 생체지표를 분석하였다. 카드뮴에 단독 노출시켰을 때보다 구리와 함께 노출 시킨 경우, 체내 축적물이 증가하였으며 구리의 농도가 200 μg/L 이상일 때에는 카드뮴과 구리의 체내 축적물이 모두 감소하는 결과를 보였다. Metallothionein-like protein의 경우, 6 시간째 가장 높은 농도를 보였다. GST는 시간과 농도에 따라 증가하는 경향을 보였으며 높은 구리 농도에서 감소하는 경향을 보여 금속으로 인한 체내 항산화효소의 발현을 확인하였다. 실제 환경에서는 다양한 오염물질이 존재하고 그 농도

또한 실내 실험에 비해 낮기 때문에 다양한 추후 연구가 필요하다, 생물 체내 미량금속 농도 분석과 더불어 생체지표 연구가 오염된 환경에서 오염물질이 생물에 미치는 영향을 조기에 진단하는데 활용 될 수 있음을 보여주고 있다.

사 사

갯지렁이를 제공해주신 “갯마을 사람들” 최황영 대표님께 감사드립니다. 본 연구는 2007년도 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행되었습니다(KRF-2007-314-C00309).

참고문헌

- [1] 한수정, 이인숙, 2001, “총알고등에서 카드뮴과 아연의 축적과 제거”, 한국생태학회지, Vol.24, 35-43.
- [2] Ait, A., Mouneyrac, C., Durou, C., Moukrim, A. and Pellerin, J., 2006, “Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco)”, Comp. Biochem and Physiol., Vol.143, 23-29.
- [3] Bradford, M.M., 1976, “A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding”, Anal. Biochem., Vol.72, 248-254.
- [4] Brown, C.L. and Luoma, S.N., 1995, “Use of the euryhaline bivalves *Potamocorbula amurens* as a biosentinel species to assess trace metal concentration in San Francisco Bay”, Mar. Ecol. Prog. Ser., Vol.12, 129-142.
- [5] Cousins, R.J., 1985, “Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin”, Physiol. Rev., Vol.65, 238-309.
- [6] Elliott, N.G., Swain, R. and Rits, D.A., 1986, “Metal interaction during accumulation by the mussel *Mytilus edulis planulatus*”, Mar. Biol., Vol.93, 395-399.
- [7] Engel, D.W., 1999, “Accumulation and cytosolic partitioning of metals in the American oyster *Crassostrea virginica*”, Mar. Environ. Res., Vol.47, 89-102.
- [8] Freedman, J.H., Ciriolo, M.R. and Peisach, J., 1989, “The role of glutathione in copper metabolism and toxicity”, J. Biol. Chem., Vol.264, 5598-5605.
- [9] Ferreira, A.M., Ciriolo, M.R., Marcocci, L. and Rotilio, G., 1993, “Copper (I) transfer into metallothionein mediated by glutathione”, Biochem. J., Vol.292, 673-676.
- [10] Gnanidi, K., and Tobschall, H.J., 1999, “The pollution of marine sediments by trace elements in the coastal region of Togo caused by dumping of cadmium-rich phosphorite tailing in to the sea”, Environ. Geol., Vol.38, 13-24.
- [11] Hopkin, S.P., 1989, Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates, Pollution Monitoring Series; Mellanby, K., Ed.; Elsevier Applied Science: New York.
- [12] Kraak, M.H.S., Lavy, D., Peeters, W.H.M. and Davids, C. 1992, “Chronic ecotoxicity of copper and cadmium to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*”, Arch. Environ. Contam. Toxicol., Vol.23, 363-369.
- [13] Langston, W.J., Bebianno, M.J. and Burt, G.R., 1998, Metabolic pathways in marine invertebrates. In Langston, W.J. and Bebianno, M.J. (eds), Metal Metabolism in the Aquatic Environment, Chapman and Hall, London U.K., pp.219-248.
- [14] Lecoeur, S., Videmann, B. and Berny, Ph., 2004, “Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*”, Environ. Res., Vol.94, 184-191.
- [15] Lotufo, G.R., Farrar, J.D., Inouye, L.S., Bridges, T.S. and Ringelberg, D.B., 2001, “Toxicity of sediment-associated nitroaromatic and cyclonitramine compounds to benthic invertebrates”, Environ. Toxicol. Chem., Vol.20, 1762-1771.
- [16] Marcano, L., Nusettia, O., Rodríguez-Graub, J. and Vilasb, J., 1996, “Uptake and depuration of copper and zinc in relation to metal-binding protein in the polychaete *Eurythoe complanata*”, Comp. Biochem. Physiol., Vol.114, 179-184.
- [17] Martín-Díaz, M.L., Blasco, J., Sales, D. and Delvalls, T.A., 2007, “Biomarkers study for sediment quality assessment in spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*”, Arch. Environ. Contam. Toxicol., Vol.53, 66-76.
- [18] Mosleh, Y.Y., Paris-Palacois, S. and Biagianti-Risbourg, S., 2006, “Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaete, Tubificidae) exposed to copper”, Chemosphere, Vol.64, 121-128.
- [19] Morillo, J., Usero, J. and Gracia, I., 2004, “Heavy metal distribution in marine sediments from the southwest coast of Spain”, Chemosphere, Vol.55, 431-442.
- [20] Peakall, D.B. and Shugart, L.R., 1993, Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health. Springer-Verlag, Berlin.
- [21] Posthuma, L. and vanStraalen, N.M., 1993, “Heavy metal adaptation in terrestrial invertebrates: a review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences”, Comp. Biochem. Physiol., Vol.100C, 11-38.
- [22] Regoli, F., Nigro, M., Bertoli, E., Principato, G. and Orlando, E., 1997, “Defences against oxidative stress in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* and effects of acute exposure to metals”, Hydrobiologia, Vol.355, 139-144.
- [23] Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N. and Sarker, S., 2006, “Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring”, Ecotoxicology, Vol.15, 333-340.
- [24] Sato, M. and Nakashima, A., 2003, “A review of Asian *Hediste* Species complex (Nereididae, Polychaete) with descriptions of two new species and a redescription of *Hediste japonica* (Izuka, 1908)”, Zool. J. Limn. Soc., Vol.137, 403-445.
- [25] Serafim, M.A., Company, R.M., Bebianno, M.J. and Langston, W.J., 2002, “Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cad-

- mium”, Mar. Environ. Res., Vol.54, 361-365.
- [26] Sorensen, E.M., 1991, Cadmium. In: Metal Poisoning in Fish. CRC Press, Boca Raton, pp.175-234.
- [27] Sun, F. and Zhou, Q., 2007, “Metal accumulation in the polychaete *Hediste japonica* with emphasis on interaction between heavy metals and petroleum hydrocarbon”, Environ. Pollut., Vol.149, 92-98.
- [28] Sun, F., Zhou, Q., Wang, M. and An, J., 2009, “Joint stress of copper and petroleum hydrocarbons on the polychaete *Perinereis aubuhitensis* at biochemical levels”, Ecotoxicol. Environ. Saf., Vol.72, 1887-1892.
- [29] Suzuki, K.T., Rui, M., Ueda, J.I. and Ozawa, T., 1996, “Production of hydroxyl radicals by copper-containing metallothionein: roles as prooxidant”, Toxicol. Appl. Pharmacol., Vol.141, 231-237.
- [30] Vazquez, F.G. and Sharma, V.K., 2004, “Major and trace elements in sediments of the Campeche Sound, southeast Gulf of Mexico”, Mar. Pollut. Bull., Vol.48, 87-90.
- [31] Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F. and Fabbra, R., 1997, “A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic mollusk”, Mar. Environ. Res., Vol.44, 69-84.
- [32] Won, E.J., Raisuddin, S. and Shin, K.H., 2008, “Evaluation of induction of metallothionein-like proteins (MTLPs) in the polychaetes for biomonitoring of heavy metal pollution in marine sediments”, Mar. Pollut. Bull., Vol.57, 544-551.
- [33] Zhou, Q.X., Rainbow, P.S. and Smith, B.D., 2003, “Tolerance and accumulation of the trace metals zinc, copper and cadmium in three populations of the polychaete *Nereis diversicolor*”, J. Mar. Biolog. Assoc. U.K., Vol.83, 65-72.
- [34] Zorita, I., Apraiz, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Cancio, I., Soto, M., Marigómez, I. and Cajaraville, M.P., 2007, “Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms”, Environ. Pollut., Vol.148, 236-250.

2010년 8월 11일 원고접수

2010년 11월 16일 심사완료

2010년 11월 18일 수정본 채택