

남극 삿갓조개(*Nacella concinna*)의 장(intestine)에서 중금속 축적에 관한 연구

이용석 · 조용훈 · 정계현 · 최희선* · 안인영*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부 생물학전공 · *한국해양연구원 극지연구본부

서론

전세계적으로 연안환경에서의 중금속 오염을 모니터링 하는 데에는 Mussel Watch Program을 중심으로 담치류(mussel)와 굴(oyster) 등이 지표종(indicator species)으로 널리 사용되어 왔다(O'Connor et al., 1994). 그러나 남극에는 이 두 종이 서식하고 있지 않으며, 현재까지 연구에 따르면 남극큰띠조개와 남극가리비(*Adamussium colbecki*)가 담치류에 상응하는 유용한 생물지표종으로 사용될 수 있다고 알려져 있다(안 등, 1996, 2001 ; SCAR, 1996 ; Nigro et al., 1992). 이러한 연구의 일환으로 Najle 등(2000)은 원시복족류의 일종인 남극삿갓조개(*Nacella concinna*)를 가지고 Cd에 노출시킨 후 소화선을 관찰 하여 어떠한 변화가 있는지 살펴본 바 있으며, 안 등(2002)은 같은 종에서 성별 및 부위에 따른 중금속 농축 방식의 기초실험을 수행 한 바 있다. 안(1999) 등에 의하면 남극삿갓조개가 중금속을 잘 농축하는 특성을 가지고 있으며, 해양환경 모니터링에 지표종으로 이용 가능함을 이미 발표 한 바 있다.

본 실험에서는 남극지역에서 유용한 생물지표종으로 예상되어지는 남극삿갓조개를 대상으로 하여 Cd에 노출 시킨 후 장(intestine)에서의 미세구조 변화를 살펴보고자 하며, SEM-EDS를 이용하여 중금속의 분포를 알아보아 중금속의 축적 및 해독기작에 대한 기초자료를 얻고자 수행되었다.

재료 및 방법

재료로 사용된 남극삿갓조개는 연체동물문(Mollusca), 복족강(Gastropoda), 전새아강(Prosobranchia), 원시복족목(Archeogastropoda), 삿갓조개과(Patellidae) 에 속하는 남극대륙주변 해역에 널리 분포하는 종으로서 조간대와 조하대의 바위에 부착하여 규조류나 미세조류 등을 먹고 살며(Brethes et al., 1994), 채집이 쉽고 널리 분포하는 장점 때문에 형태학적 또는 생태학적 연구가 많이 이루어 진 종이다. 본 실험에 사용된 시료는 우리 나라 남극기지인 세종기지의 앞 Marine Cove 근방에서 채집하였다.

ㄱ) 정상시료의 준비

미세구조를 보존하기 위하여 채집 직후 karnovsky 용액에 바로 고정하였다. 고정액에 넣은채 4℃를 유지하며 운반하였다.

ㄴ) Cd 노출 실험 시료준비(bioassay)

Cd 노출실험을 위하여 2001년 12월경에 채집한 시료들은 수조에 CdCl₂를 50ppb로 맞춘 여과된 해수에 살아있는 상태의 남극삿갓조개를 넣고 6일 동안 노출시킨 후 0.1M cacodylate 완충용액(pH 7.2)으로 제조한 Karnovsky 고정액에 넣은 후 4℃를 유지하며 운반하였다.

SEM-EDS 표본을 만들기 위하여 일반적인 SEM 표본 제작과정을 시행하였다. 운반되어진 시료를 고정액을 만들 때 사용되었던 것과 같은 조성의 0.1M 인산완충용액(pH 7.4) 및 0.1M cacodylate 완충용액(pH 7.4)에서 24시간동안 수세한 후 적당한 크기로 세절하였다. 그 후 60%, 70%, 80%, 90%, 100%의 순서로 에탄올을 사용하여 탈수한 후 IAA(isoamyl acetate) : 에탄올 비율 1:2, 1:1, 2:1 100% IAA의 순서로 치환작업을 거친 다음 critical point dryer에서 완전히 건조시켰다. 완전히 건조 되어진 표본은 spy ion sputter를 이용하여 200nm두께로 gold coating한 후 EDS(keveex)가 장착된 H-2500C(hitachi)으로 관찰하였다. EDS 측정시 조사 대상이 되어진 원소의 종류는 Al, Si, Cl, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb 11개 원소였다.

미세구조 관찰을 위하여 전자현미경용 초박절편을 제작하였다. 운반되어진 시료는 광학현미경용 표본에서와 마찬가지로 고정액을 만들 때 사용되었던 것과 같은 조성의 0.1M 인산완충용액(pH 7.4) 및 0.1M cacodylate 완충용액(pH 7.4)에서 6시간동안 수세하여 1% 사산화오스뮴산(OsO₄)에서 2시간동안 후고정 하였다. 그 후 다시 동일한 buffer로 5분씩 3회 수세 한 후 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%(2회)의 순서로 에탄올을 사용하여 탈수하였다. 탈수가 끝난 시료는 아세톤 치환과정을 거친 후 spurr mixture를 사용하여 포매 한 후 37℃에서 12시간, 45℃에서 12시간 60℃에서 48시간 동안 열중합 하여 초박절편용 블록을 제작하였다. 제작된 블록은 초박절편기(ultramicrotome)와 다이아몬드 나이프(diatom)을 이용하여 70~80nm의 두께의 초박절편을 만든 다음 200mesh copper grid에 얹은 후 uranyl acetate에서 20분, lead citrate에서 5분간 이중 염색하여 JEM-1010 투과 전자현미경(transmission electron microscope)을 이용하여 관찰하였다.

결과 및 요약

ㄱ) 주사전자현미경 결과 및 SEM-EDS 결과

남극삿조개의 장을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 조직의 표면은 원주세포로 이루어져 있었으며, 조직의 단면을 관찰한 결과 원주세포는 표면에만 위치하며, 하부의 결합조직 및 근육층이 존재하는 부위는 매우 영성한 양상을 보였다. 특히 세포의 상단부 표면을 관찰한 결과 매우 많은 섬모를 관찰할 수 있었다. 섬모의 길이는 약 6~10 μm 정도로 관찰되었다. SEM-EDS를 이용한 중금속 추적결과 원주세포들이 존재하는 조직의 바깥층과 내강을 비교한 결과 Al 과 Si가 서로 반비례 관계의 양상을 보였으며, Cd 노출결과 Al 및 Si는 급격하게 줄어들었으며, 대신 Cl 과 Zn이 상대적으로 매우 증가하는 양상을 볼 수 있다.

ㄴ) 투과전자현미경 관찰결과

남극삿조개의 장을 투과전자현미경으로 관찰한 결과 원주세포로 이루어진 세포의 유리면에는 섬모가 관찰될 뿐 미세융모 등은 관찰되어지지 않았다. 세포 내 많은 분비과립이 존재하고 있었으며, 잘 발달되어진 조면소포체와 골지체를 가지고 있었으며, 미토콘드리아도 많은 수가 발견되었다. 노출 실험결과 핵막이 일부 소실되어지는 현상을 발견 할 수 있었으며, 분비과립 및 분비과립 주변, 핵속의 인과 결합되어진 물질에 Cd로 추정되는 금속성 물질을 다량 관찰 할 수 있었다.

참고문헌

- 이용석, 안인영, 최희선, 정계현. 2001. 중금속이 축적된 남극큰띠조개의 신장에 대한 면역조직학적 및 미세구조적 연구. 남극 세종기지 주변 인간 활동으로 인한 환경변화모니터링 보고서. EC PP 00 001-B2, pp.283-304.
- 최희선, 안인영. 2000. 남극큰띠조개(*Laternula elliptica*) 신장에서의 중금속 해독기작에 관한 연구: Metal binding proteins의 역할. 남극 세종기지 주변 인간 활동으로 인한 환경변화모니터링 보고서. EC PP 00 001-02, pp. 49-64.
- Adams S. M., Shorey C. D. and Byrne M., 1996. An Ultrastructural and Microanalytical Study of Metal-ion Content in Granular Concretions of the Freshwater Mussel *Hyridella depressa*. *Micron*, 28(1) : 1-11
- Ahn I. Y., Kim K. W. and Choi H. J., 2002. A baseline study on metal concentrations in the Antarctic limpet *Nacella concinna*(Gastropoda: Patellidae) on King George Island: variations with sex and body parts. *Marine Pollution Bulletin*, 44 : 421-431.