

TBTO의 노출에 따른 참굴, *Crassostrea gigas*의 hemolymph내 무기성분 및 효소활성의 변화

조규석 · 민은영 · 지정훈 · 김재원* · 안철민** · 강주찬†

부경대학교 수산생명의학과 · *부경대학교 해양생물학과 · **국립수산진흥원 증식부

Changes of Inorganic Matter and Enzyme Activity in the Hemolymph of Oyster, *Crassostrea gigas* Exposed to TBTO

Kyu Seok Cho, Eun Young Min, Jung Hoon Jee, Jae Won Kim,* Chul Min Ahn** and Ju Chan Kang†

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Marine Biology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

**Aquaculture Division, National Fisheries Research and Development Institute, Kijang-gun,
Pusan 626-900, Korea

The purpose of this study is to find out the effects of various bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) on changes of inorganic matter and enzyme activity in the hemolymph of Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. Oyster were exposed to 5, 10, 20, 50, 80 and 100 $\mu\text{g/L}$ of TBTO for 20 days. Survival rate of the oyster was significantly affected by $\geq 80 \mu\text{g/L}$ TBTO concentration at 10 days, while the diminution of survival was found at 20 days with a lower concentration of $\geq 50 \mu\text{g/L}$ TBTO. Calcium concentration in the hemolymph increased significantly after 20 days at the TBTO concentration 20 $\mu\text{g/L}$. However no change of magnesium and inorganic phosphate in the hemolymph was showed. A significant increment of GOT activities in the hemolymph was observed after 20 days at more than 20 $\mu\text{g/L}$ TBTO concentration, without typical changes of GPT activities. These results indicate that oysters can be affected by TBTO in terms of calcium concentration and GOT activity in the hemolymph when they were exposed to the TBTO concentration 20 $\mu\text{g/L}$.

Key words : *Crassostrea gigas*, TBTO, Survival, Hemolymph, GOT, GPT, Calcium

일반적으로 내분비교란물질은 동물의 체내에 들어가서 내분비계의 정상적인 기능을 저해하거나 혼란시키는 화학물질로 정의되며, 추정되는 물질로는 각종 산업용화학물질, 살충제, 제초제 등의 농약류, 유기중금속류 및 소각로에서 발생하는 다이옥신류 등을 들 수 있다. 내분비교란물질은 생체내 호르몬의 합성, 방출, 수송, 수용체와의 결합 및 수용체 결합 후의 신호전달 등 다양한 과정에 관여하여 각종 형태의 교란을 일으킴으로써 생태계에 영향을 발현하며, 차세대에선 성장억제와 생식이상 등을 초래하기도 한다. 특히 내분비교란물질인 tributyltin (TBT)은 각종 플라스틱 첨가제, 산업용촉매제 및 살충제 등으로 널리 사용되고 있으며, 선박

의 외부 및 그물 망 등에 각종 생물의 부착을 방지하기 위한 방오페인트 속에 포함 되는데, TBT는 강한 독성을 지니고 있어(Horiguchi *et al.*, 1994) 많은 국가들은 현재 사용을 금지하고 있는 실정이다.

TBT가 해양생물에 미치는 영향으로는 참굴의 패각 기형, 성장 억제 및 개체군의 감소가 보고되었고(Stephenson *et al.*, 1986; Stephenson, 1991), 홍합의 성장 속도를 저하시키며(Stephenson *et al.*, 1986), 유생의 높은 사망률을 나타낸다(Beaumont and Budd, 1984). 또한 해수 중의 1 ng/L이하의 농도에서 복족류의 imposex가 유발된다는 것을 보고하였고(Bryan *et al.*, 1988), 어류의 생화학적인 변화로는 Cytochrome P450 시스템을 억제시킴으로서 독성

†Corresponding Author

물질의 해독능력 저하와 ATP 합성저해로 인한 생체에너지 대사 방해 등을 유발하는 등 다양한 저해효과를 보인다(Fent and Stegeman, 1991). 일본 및 미국 연안의 퇴적물 중에서는 0.01~1.10 mg/L의 TBT가 검출되었고(Yonezawa *et al.*, 1993; Page *et al.*, 1996), 우리나라의 연안에서도 0.003~0.38 mg/L(서울대, 1996)이 검출되었고, 진해만 연안에서의 참굴에서는 0.25 μg TBT-Sn/g의 농도로 조사(Hwang *et al.*, 1999)된 바 있다.

패류는 어류나 다른 무척추동물에 비해 활동범위가 제한적이며, 특히 굴 종류는 고착성이 강하여 오염물질에 대한 이들의 반응은 연안오염의 감시 수단으로 활용될 수 있으며(Lee *et al.*, 1994), 특히 참굴의 hemolymph는 원생동물의 기생, 중금속 오염 및 여러 가지 환경요인에 의해 그 구성성분이 변동되므로 연안환경의 오염수준을 감시하는 유용한 수단으로 활용되고 있다(Xue and Tristan, 2000; His *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1987). 따라서, 본 연구는 TBTO의 노출에 의한 참굴의 생존율을 바탕으로 hemolymph의 무기성분 및 효소성분의 변동을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

참굴, *Crassostrea gigas*는 남해소재 양식장으로부터 분양 받아 실험실로 운반한 후, 100 ℓ 의 순환여과식 PVC 수조에 적당한 밀도로 수용하여 2주 동안 순화시켰다. 이때 수온, pH, 염분 및 용존산소는 각각 19~21°C, 7.8~8.4, 32~33‰ 및 7.2~8.0 mg/ ℓ 이었다. 먹이는 농축 클로렐라(Algae diet C-5, Coast Seafoods Co., Ltd.)를 2일마다 1회 공급하였고, 실험에는 각각 10.7~13.3 cm인 개체를 사용하였다.

2. 실험과정

실험은 해수를 순환시켜 아크릴 사육수조 (34×24×30 cm)를 사용한 순환식 방법에 의하여 실시하였다. 실험 해수는 2일마다 먹이를 공급한지 5시간 후에 교환하는 것을 원칙으로 하였으나, 수질측정 결과에 따라 수시로 교환하였다. 실험 용액은 TBTO를 acetone에 용해시켜 증류수로 희석하여 stock solution을 조제하였고, 예비실험을 통해

Table 1. Chemical analysis of the seawater used in bioassay

Item	Value
Temperature (°C)	20.1
Salinity (‰)	32.6
pH	8.1
Dissolved oxygen (mg/L)	7.2
NH ⁺ ₄ -N ($\mu\text{g-at N/L}$)	0.037
NO ⁻ ₂ -N ($\mu\text{g-at N/L}$)	0.026
NO ⁻ ₃ -N ($\mu\text{g-at N/L}$)	0.753
PO ³⁻ ₄ -P ($\mu\text{g-at P/L}$)	0.042
COD (mg/L)	1.23
Suspend solid (mg/L)	9.3

5, 10, 20, 50, 80 및 100 $\mu\text{g}/\ell$ 의 농도를 설정하였다. 실험에 사용한 자연해수는 Table 1과 같으며, 대조구는 TBTO를 첨가하지 않은 같은 해수를 사용하였다. 참굴은 실험구별 10개체씩 수용하여 2반복구를 설정하였고, 실험은 20일 동안 실시하였다.

3. Hemolymph 분석

참굴의 hemolymph는 adductor muscle을 잘라서 개각한 후에 heparin-Na (25,000 I.U., 중외제약)를 처리하여 1 ml 주사기로 pericardial cavity에 삽입하여 채취하였다. 채취된 hemolymph는 4°C에서 2시간 동안 방치한 후에 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액은 냉장 보관하면서 8시간 이내에 무기성분인 magnesium, calcium, inorganic phosphate, 효소성분인 GOT와 GPT에 대하여 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 10일 간격으로 측정하였다.

4. 유의성 검정

실험결과의 통계적 처리는 SPSS 통계프로그램 (SPSS Inc.)을 이용하여 AVOVA를 실시한 후 사후 다중 비교는 최소 유의차 검정으로 평균간의 유의성(p<0.05)를 검정하였다.

결 과

1. 실험환경

Table 2. Variation of water quality during experimental period

Item	Value (Mean ± S.D.)
Temperature (°C)	20.8 ± 0.2 (19.8~22.3)
Salinity (‰)	32.2 ± 0.4 (31.9~33.2)
pH	8.2 ± 0.2 (8.0~8.3)
Dissolved oxygen (mg/L)	7.2 ± 0.8 (6.8~7.4)
NH ₄ ⁺ -N (μg-at N/L)	0.035 ± 0.008 (0.028~0.041)
NO ₂ ⁻ -N (μg-at N/L)	0.027 ± 0.002 (0.021~0.032)
NO ₃ ⁻ -N (μg-at N/L)	0.772 ± 0.09 (0.723~0.802)
PO ₄ ³⁻ -P (μg-at P/L)	0.042 ± 0.005 (0.038~0.048)
COD (mg/L)	1.28 ± 0.4 (1.08~1.57)
Suspended solid (mg/L)	9.6 ± 0.7 (8.7~10.5)

실험기간 중의 수질환경 분석결과를 Table 2에 나타냈다. 모든 실험은 항온실에서 실시된 관계로 수온은 1°C 범위 내에서 변동하였으며, 염분은 31.9~32.2% 사이를 유지하였다. pH의 변화 폭은 0.3이었으며, 용존산소는 6.8~7.4 mg/L 사이에서 변동하였다. 그 외 영양염류, COD 및 부유물질도 그다지 큰 변화는 나타내지 않았다.

2 생존율

TBTO의 노출에 의한 참굴의 생존율을 Fig. 1에 나타냈다. 실험 20일 동안 생존율은 TBTO농도 10 μg/L이하에서 90%이상을 나타냈다. 그러나 참굴의 생존율은 TBT농도가 증가함에 따라 감소하기 시작하여 실험 10일째 TBTO농도 80 μg/L이상, 실험 20일째는 50 μg/L이상의 농도에서 유의한 감소가 관찰되었다(P<0.05).

3 Hemolymph 내의 무기성분 및 효소활성 변화

TBTO의 노출에 의한 참굴의 hemolymph의 무기성분의 변화는 calcium, magnesium 및 inorganic phosphate에 대하여 조사하였다. magnesium과 inorganic phosphate의 농도는 상당히 낮은 수준으로 측정되었으며, 일관성 있는 경향을 보이지 않았다. 그러나, calcium 농도는 10일째 대조구를 포함한 TBTO 10 μg/L 이하의 농도에서 1.48~2.10 mg/dL으로 유사한 값을 나타냈으나, 50 μg/L 이상의 TBTO 농도에서는 급격히 증가하여 대조구에 비해

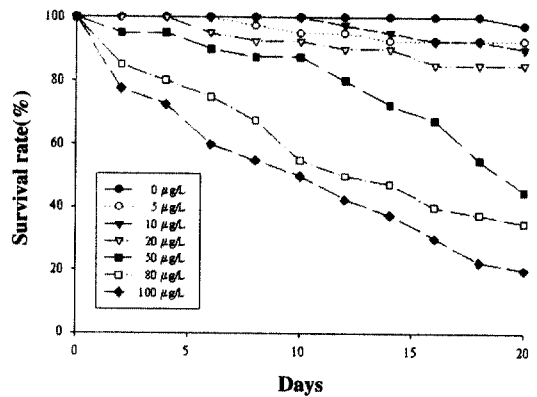


Fig. 1. Survival rate of oyster exposed to various TBTO concentration for 20 days.

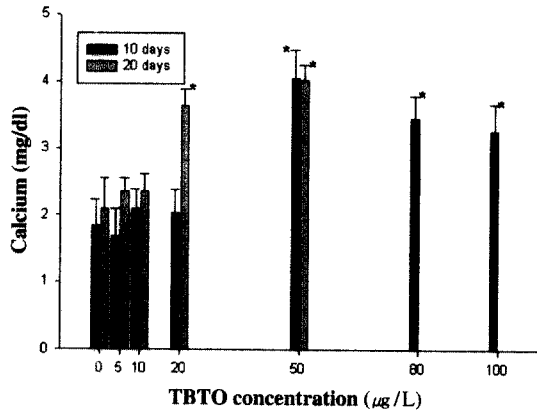


Fig. 2. Change of hemolymph calcium concentration in the oyster exposed to various TBTO concentration for 20 days. *Asterisks indicate significant difference from the control (P<0.05)

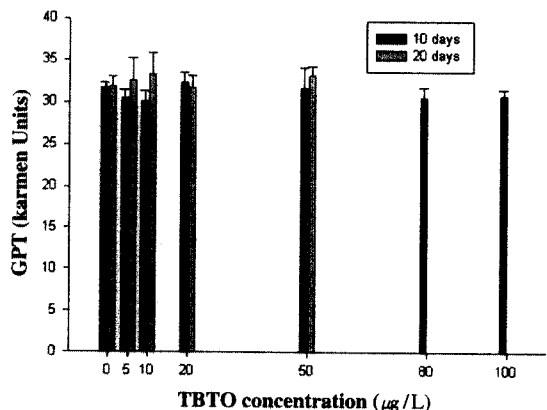


Fig. 3. Change of hemolymph GPT activity in the oyster exposed to various TBTO concentration for 20 days.

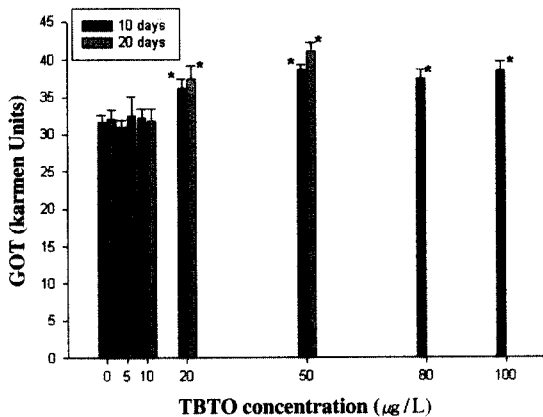


Fig. 4. Change of hemolymph GOT activity in the oyster exposed to various TBTO concentration for 20 days. *Asterisks indicate significant difference from the control ($P < 0.05$)

유의한 증가가 관찰되었다 ($P < 0.05$). 또한 20일째 calcium 농도는 대조구와 비교하여 20 µg/L 이상의 농도에서 유의한 증가를 나타냈다 ($P < 0.05$, Fig. 2).

Hemolymph 내의 GPT와 GOT 활성 변화를 Fig. 3와 4에 나타냈다. 10일째 대조구의 GOT와 GPT 활성은 각각 31.73 및 31.69 Karmen units이 측정되었다. 실험 전 기간을 통해 GPT의 활성은 모든 농도구에서 뚜렷한 변화를 보이지 않았다 (Fig. 3). 그러나, GOT는 실험 10일째 이후의 20 µg/L 이상의 농도에서 유의한 증가를 나타냈다 ($P < 0.05$, Fig. 4).

고 찰

해양의 TBT 존재는 여기에 서식하는 복족류의 imposex 현상을 일으키며, 굴 및 홍합 등의 성장 억제와 패각 기형을 일으키는 등 해양에 서식하는 패류에 많은 악영향을 미친다 (Bryan *et al.*, 1988; Stephenson *et al.*, 1986; Stephenson, 1991; Horiguchi *et al.*, 1994). 실험 20일 동안 생존율은 TBTO 농도 10 µg/L 이하에서 90% 이상을 나타냈다. 그러나 참굴의 생존율은 TBTO 농도가 증가함에 따라 감소하기 시작하여 실험 10일째 TBTO 농도 80 µg/L 이상, 실험 20일째는 50 µg/L 이상의 농도에서 유의한 감소가 관찰되었다.

참굴의 embryo 시기의 TBTO의 24hr-LC50은 7.0 µg/L, 유생시기는 15.0 µg/L, 그리고 치패 시기의

48hr-LC50은 35 µg/L로 성장단계에 따라 2배 이상의 독성차이를 나타냈다 (Horiguchi and Shimizu 1992). 본 실험에서는 이들 단계보다 상대적으로 성숙한 참굴의 성체를 TBTO에 노출시켰을 때, 100 µg/L에서도 48시간 동안 60% 생존율을 보였다. 이 같은 결과는 참굴의 발달단계가 진행됨에 따라 TBTO에 대한 내성이 증가된다는 것을 의미하지만, 성체에 있어서도 현장에 80 µg/L 이상의 농도가 10일 이상, 50 µg/L 이상의 농도가 20일 이상 지속될 경우에는 TBTO에 의한 참굴의 사망은 증가될 것으로 추정된다.

TBTO의 노출에 의한 참굴의 hemolymph의 calcium 농도는 10일째 대조구를 포함한 TBTO 10 µg/L 이하의 농도에서 1.48~2.10 mg/dL로 유사한 값을 나타냈으나, 50 µg/L 이상의 TBTO 농도에서는 급격히 증가하여 대조구에 비해 유의한 증가가 관찰되었다. 또한 20일째 calcium 농도는 10일째 보다 전반적으로 증가하였으며, 대조구와 비교하여 20 µg/L 이상의 농도에서 유의한 증가를 나타냈다. 이 같이 TBTO 노출하에서 calcium 농도가 증가된 것은 배설기관의 재흡수기능 및 소화기관의 흡수기능의 변화로 인한 생리적인 불균형이 일어나기 때문으로 추정된다 (Jiro and Yasuo, 1977).

TBTO의 노출에 의한 참굴의 hemolymph 내의 GPT의 활성은 전 실험기간을 통해 모든 농도구에서 뚜렷한 변화를 보이지 않았다. 그러나, GOT는 실험 10일 이후 20 µg/L 이상의 농도에서 유의한 증가를 나타냈다. GOT와 GPT의 활성은 환경오염의 원인이 되는 조직 손상을 인지하는 진단에 이용되고 있으며, 일반적으로 오염물질에 의해 변화한다 (Sakamoto and Yone, 1978; Casillas and Ames, 1982). 그리고, 오염물질에 대한 패류의 효소활성에 대한 자료는 극히 한정되어 있으나, TBTO와 관련한 패류를 장기간 노출시켰을 때 hemolymph 내의 protein 농도는 증가하며, 그 이유는 조직장애로 인한 일탈의 결과라고 추측하고 있다 (Pickwell and Steinert, 1988). 따라서, 참굴의 hemolymph 내의 GOT의 증가는 각 조직의 장애를 받아 hemolymph로 일탈하는 것으로 추측된다. 이상의 결과와 논의로부터 TBTO에 노출된 참굴 hemolymph의 calcium 농도 및 GOT 활성은 적어도 10 µg/L 이상에서는 20일 이내에 변동할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 20일 동안 TBTO 노출에 의한 참굴의 생존율 및 hemolymph 내의 무기성분과 효소활성의 변동을 조사하였다. TBTO 노출에 의한 참굴의 생존율은 실험 20일 동안 10 µg/L 이하의 농도에서 90% 이상을 나타냈다. 그러나 참굴의 생존율은 TBT 농도가 증가함에 따라 감소하기 시작하여 실험 10 일째 TBT 농도 80 µg/L 이상, 실험 20 일째는 50 µg/L 이상의 농도에서 유의한 감소가 관찰되었고, 100 µg/L에서는 실험 16 일째 전 개체가 사망하였다. 참굴의 hemolymph의 calcium 농도는 10 일째 대조구를 포함한 TBTO 5~10 µg/L 농도에서 유사한 값을 나타냈으나, 50 µg/L 이상의 TBTO 농도에서는 급격히 증가하여 대조구에 비해 유의한 증가가 관찰되었다. 또한 20 일째 calcium 농도는 10 일째 보다 전반적으로 증가하였으며, 대조구와 비교하여 20 µg/L 이상의 농도에서 유의한 증가를 나타냈다. GPT 활성은 실험 전 기간을 통해 모든 농도구에서 뚜렷한 변화를 보이지 않았다. 그러나, GOT는 실험 10 일째 이상의 20 µg/L 이상의 농도에서 유의한 증가를 나타냈다.

참고 문헌

- Beaumont A. R. and Budd, M. D.: High mortality of the larvae of the common mussel at low concentrations of tributyltin. *Mar. Poll. Bull.*, 15: 402-405, 1984.
- Bryan G. W., Gibbs, P. E. and Burt, G. R.: A comparison of the effectiveness of tri-n-butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dog-whelk, *Nucella lapillus*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 68(4): 733-744, 1988.
- Casillas E., J. Sundquist and Ames, W. E.: Optimization of assay conditions for, and the selected tissue distribution of, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase of English sole, *Parophrys vetulus* Girard. *J. Fish. Biol.*, 21(2): 197-204, 1982.
- Fent K. and Stegeman, J. J.: Effects of tributyltin chloride in vitro on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. *Aquat. Toxicol.*, 20: 159-168, 1991.
- Fisher W. S., Michel, A. and Balouet, G.: Response of European flat oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature change. *Aquaculture*, 76: 179-190, 1987.
- His R. B., Seaman, M. N., Pagano, G. and Trieff, N. M.: Sublethal and lethal toxicity of aluminum, industry effluents to early developmental stages of the *Crassostrea gigas* oyster. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 30: 335-339, 1996.
- Horiguchi T. and Shimizu, M.: In "Organotin pollution and its effects on aquatic organism" (Satomi Y. and M. Shimizu ed.), Koseishm-Koseikaku, Tokyo, 99-135, 1992.
- Horiguchi T., Hiroaki, S., Makoto, S., Sunao, Y. and Masatoshi, M.: Organotin compounds and their effects on aquatic organisms, focusing on imposex in gastropods. *Main Group Metal Chemistry*, 17(1-4): 81-100, 1994.
- Hwang H. M., Oh, J. R., Kahng, S. H. and Lee, K. W.: Tributyltin compounds in mussels, oysters and sediments of Chinhae Bay, Korea. *Mar. Environ. Res.* 47: 61-70, 1999.
- Jiro K. and Yasuo, I.: Effects of oral administration of cadmium on fish. I. Analytical results of the blood and bones. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 43(5): 523-526, 1977.
- Lee S. M., Lee, J. Y. and Hur, S. B.: Essentiality of dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *J. Korean Fish. Soc.*, 27: 721-736, 1994.
- Page D. S., Ozbal, C. C. and Lanphear, M. E.: Concentration of butyltin species in sediments associated with shipyard activity. *Environ. Pollut.*, 91(2): 237-243, 1996.
- Pickwell G. V. and Steinert, S. A.: Accumulation and effects of organotin compounds in oysters and mussels: Correlation with serum biochemical and cytological factors and tissue burdens. *Mar. Environ. Res.*, 24: 215-218, 1988.
- Sakamoto S. and Yone, Y.: Effect of starvation on hematological characteristics, and the contents of chemical components and activities of enzymes in blood serum of red sea bream. *J. Fac. Agric., Kyushu Univ.*, 23(1-2): 63-69, 1978.
- Stephenson M. D., Smith, D. R., Goetzl, J., Ichikawa, G. and Martin, M.: Growth abnormalities in mussels and oysters from areas with high levels of tributyltin in San Diego Bay. *Oceans '86 Conference Record: Science-Engineering-Adventure. Organotin Symposium 4*: 1246-1251, 1986.
- Stephenson M.: A field bioassay approach to determining tributyltin toxicity to oysters in California. *Mar. Environ. Res.*, 32(1-4): 51-59, 1991.
- Xue Q. and Tristan, R.: Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76: 155-163, 2000.
- Yonezawa Y., Nakata, K., Miyakozawa, Y., Ochi, A.,

Kowata, T., Fukawa, H., Sato, Y., Masunaga, S. and Urushigawa, Y.: Distributions of butyltins in the surface sediment of Ise Bay, Japan. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12(7): 1175-1184, 1993.

서울대학교: TBT 오염실태 조사 및 대책수립 연구. 농림수산부 연구보고서. 133pp, 1996.