Journal of Korean Society on Water Quality
Vol. 18 No. 4, pp. 395-400, 2002

한국물환경학회지, 논문
18권 4호, pp. 395-400, 2002

수서생태계 납오염에 대한 생체지표로서 *Maceobrachium nipponnese*내 Na^+/K^+ATPase의 활용

Use of Na^+/K^+ATPase in *Maceobrachium nipponnese* as a biomaker of lead pollution in aquatic ecosystem.

정명규 · 김학희*

Myung-Kiu Chung · Hak-Hee Kim*

선문대학교 공과대학 환경공학과, 화학공학부*

Department of Environmental Engineering, Sunmoon University
*Division of Chemical Engineering, Sunmoon University

Abstract

Lead is one of the most toxic metal and is detectable in practically all phases of environment and in all biological system. Transport, industrial and domestic waste products are the main sources of this pollutant. Ingested lead is rapidly absorbed and widely distributed throughout the body, causing extensive tissue damage. In this study, we chose the freshwater decapods *Maceobrachium nipponnese* as a sensitive indicator organism for environmental pollution. In order to investigate the possibility in use of Na^+/K^+ATPase activity as a biomarker of lead pollution, we tested the acute toxicity of lead to *Maceobrachium nipponnese*.

The LC_{50}(96hr) value for lead in *Maceobrachium nipponnese* was found to be 446μg/L with the 95% confidence limits. The lead exposure group at LC_{50} showed a significant Na^+/K^+ATPase inhibition, depending on the exposure time. Comparision of several concentrations of lead revealed that the Na^+/K^+ATPase activity in *Maceobrachium nipponnese* was significantly decreased in a concentration dependent manner.

These results suggest that Na^+/K^+ATPase activity in *Maceobrachium nipponnese* may possibly be used as a biomarker of lead pollution in aquatic ecosystem.

Keywords : *Maceobrachium nipponnese*, Lead, Biomarker, Na^+/K^+ATPase activity, Aquatic ecosystem.

1.서 론

납은 수서 환경으로 유입되는 수많은 중금속 오염물질 가운데 독성학적인 측면에서 매우 중요하게 취급되고 있다. 왜냐하면 납은 다른 중금속과는 달리 노출 즉시 나타나는 임상적 증상이 없기 때문에 생체에 상당량 축적된 다음에 비로소 노출 여부를 판정할 수 있다는 점에서 오염 여부를 조기에 판정하기 어렵기 때문이다.

납은 자동차 배기가스, 공장 굴뚝으로 배출되는 연기, 생활 폐기물, 그리고 페인트 등과 같은 배출원에서 대기 중으로 유입된 다음 강우와 함께 수

Journal of Korean Society on Water Quality
Vol. 18 No. 4, pp. 395-400, 2002

계로 이동한다[1-2]. 따라서 납은 대기오염물질인 동시에 수질오염물질인 것이다. 환경매체를 통하여 인체로 유입된 납은 단기적으로는 주로 적혈구에 저장되며 장기적으로는 뼈에 축적되며 주된 배설경로는 신장이다[3-4]. 납의 독성으로는 porphyrin의 합성을 방해하여 빈혈의 유발, 신경조직의 외부자극에 대한 반응성을 저하시키거나 근위세뇨관의 기능저하 등을 유발하는 것으로 보고되고 있다[5-6]. 뿐만 아니라 정자수의 감소와 자연 유산 등과 같은 생식계 독성도 보고되고 있다[7].

최근 수계로 유입되는 납으로부터 수서생물의 안전성과 생태계의 건전성 확보를 위하여 오염물질의 유입을 조기에 발견할 수 있는 다양한 방법에 대한 연구가 활발하게 시도되고 있다. 이러한 시도들 가운데는 수서 생태계에 서식하는 다양한 생물을 이용하여 미량의 오염물질의 유입을 감지할 수 있는 지표생물을 활용하는 방법이 응용되고 있으나 대부분 오염여부의 판정 지표로서 치사율, 성장저하, 생식율 저하 등과 같은 종말점을 선정하고 있는 관계로 오염물질의 유입을 즉시에 감지하기에는 미흡한 수준이다. 따라서 수서 생태계내로 유입되는 오염물질을 초기에 판정할 수 있는 생체내 반응 지표에 대한 연구가 필요한 실정이다[8-9].

본 연구에서는 수계 중금속 오염에 대한 민감성이 높은 생물로 알려진 갑각류 중 한국에 널리 서식하는 십각목의 징거미새우(학명 : *Maceobrachium nipponnese*)를 대상으로 조직내 Na^+/K^+ATPase 활성변화에 미치는 납의 영향을 살펴봄으로써 수서 생태계 납오염에 대한 생체지표로서의 응용 가능성을 알아보고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에 사용된 *Maceobrachium nipponnese*는 한국민물고기 연구소로부터 공급받아 납노출 시험에 사용하기 전에 실험실내 수조에서 적어도 일주간 순응시켰다. 순응기간이 끝난 다음 실험수조내에서 활동이 정상적인 길이 10-12mm 범위의 개체만을 선별하여 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 모든 시약은 Sigma사로부터 구입하였으며 모든 실험은 3배수로 실시하였다.

2.2. 실험방법

실험용 수조는 순환수 시스템과 자동 산소공급장치를 장착하였으며 인공 조명에 의하여 조명 시간을 아침 7:00 부터 저녁 7:00 까지 12시간으로 조절하였으며, 실내 온도는 15 ± 2 °C로 유지하였다.

납은 초산납을 증류수에 녹여 수조내에 주입하여 실험에 필요한 다양한 농도로 조절한 다음 노출시켰다. 실험동물군으로는 정상군(NC)과 납노출군(LT)으로 분류하였으며 마리수는 군 당 10마리를 기본으로 하였다. 또한 납의 급성독성지표인 LC_{50}(반치사농도)을 구하기 위하여 납농도를 8가지(10μg/L-1280μg/L)로 조제한 다음 96시간 동안 계속하여 노출시킨 후 각 농도에서의 치사율을 측정하였다.

수서 생태계로 유입되는 납에 대한 생체지표로서는 *Maceobrachium nipponnese* 조직내 Na^+/K^+ATPase의 활성변화를 선정하여 Kimelberg H.K. 등의 방법을 이용하여 측정하였다[10]. 요약하면 실험동물의 조직 0.5g정도를 0.25M-sucrose, 1mM의 $MgCl_2$가 들어있는 5mM-Tris-HCl(pH7.4)용액으로 빙욕상에서 테프론 조직 분쇄기를 이용하여 균질화 한 다음 600g에서 10분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 분리하였다. 상등액 20μl를 반응 시액 혼합물(100mM-NaCl, 10mM-KCl, 2.5mM -$MgCl_2$, 1mM-Tris-ATP, 1mM -tri(cyclohexylammonium) phosphoenol pyruvate, 30mM-imidazole-HCl -buffer (pH 7.3), 0.15mM-NADH, 50μg lactate dehydro -genase, 30μg의 pyruvate kinase) 1ml가 들어있는 시험관에 넣고 37°C에서 45분 동안 반응을 시켜 340nm에서 흡광도를 측정하여 NADH가 산화되는 양으로부터 ATPase의 활성을 계산하였다.

실험 결과는 평균±표준편차로 표시하였으며 실험에 사용한 각 동물군간의 유의성을 검증하기 위하여 Anova test와 Duncan's multiple range test를 실시하였으며 P값이 0.05이하인 경우에만 유의성이 있는 것으로 간주하였다[11].

3. 결과 및 고찰

3.1. 납에 대한 LC50의 결정

수서 생태계에 미치는 납오염의 영향을 파악하

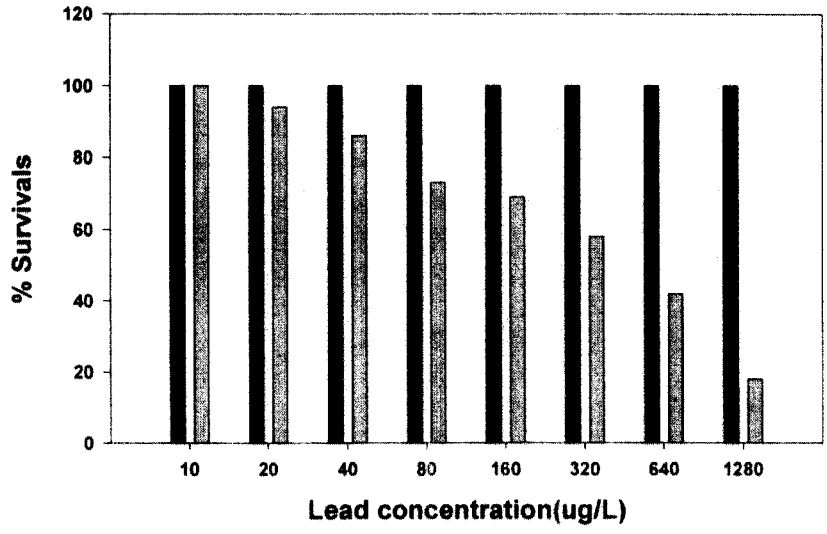

Fig. 1. Survival data for *Maceobrachium nipponnese* exposed to several lead concentrations. Lead solutions were prepared by dissolving lead acetate in distilled water. For the determination of LC_{50}, groups of 10 animals were exposed to eight different lead acetate concentrations for 96hrs. Black bar; normal control group, Gray bar; lead-treated group.

기 위해서는 우선적으로 납에 대한 지표생물의 급성독성을 파악하는 일이 필요하다. 따라서 *Maceobrachium nipponnese*에 대한 납의 LC_{50}을 결정하기 위한 실험 결과로서 노출농도에 따른 96시간 후의 치사율(%)을 Fig. 1에 제시하였다.

Fig. 1의 자료를 대상으로 *Maceobrachium nipponnese*의 납에 대한 LC_{50}을 계산한 결과 446μg/L인 것으로 밝혀졌다. 이러한 실험결과는 민물에 서식하는 다른 갑각류의 LC50과 비교하면 (*Ceriodaphnia dubia* : 240μg/L, *.Hyalella aztecta* : 210μg/L) 상당히 높은 것으로 나타났다. 물론 이러한 차이는 근본적으로 갑각류간 생물종 차이에 기인한 것으로 추정되지만, *Maceobrachium nipponnese*가 동일 생태계내의 다른 갑각류에 비하여 납에 대한 저항성이 상당히 강하며, 오염에 대한 생존력 역시 큰 것으로 해석될 수 있다[12].

또한 저농도 범위(10-160μg/L)에서의 치사율 변동을 살펴보면, 납농도의 증가폭에 비하여 현저하게 작은 것으로 미루어 지금까지 수서 생태계에 대한 오염지표생물로서 갑각류를 활용해온 점은 정성분석학적인 측면에서는 유효하지만 정량분석학적인 측면에서는 다소 미흡하다는 것을 알 수가 있다.

따라서 *Maceobrachium nipponnese*을 수서 생태계 납오염에 관한 오염지표생물로서는 활용하되, 오염의 정도를 정량화 할 수 있는 생체지표를 탐색하기 위하여 조직내 Na^+/K^+ ATPase 효소를 대상으로 LC_{50} 농도에서 노출시간에 따른 활성 변화를 살펴보았다.

3.2. LC50농도에서 노출시간에 따른 Na+/K+ATPase 활성변화

Fig. 2은 LC_{50}에서 노출시간에 따른 Na^+/K^+ATPase 활성변화를 측정한 실험 결과로서 조직내 Na^+/K^+ATPase 활성이 11시간만에 정상활성의 55%까지 감소하는 것으로 밝혀졌다. 또한 48시간 이후의 활성은 거의 변화가 없는 것으로 분석되었는데 이는 *Maceobrachium nipponnese* 조직내에 Na^+/K^+ATPase 활성이 납에 의하여 억제될 수 있는 최대 한계치까지 도달한 것으로 사료된다. 이상의 실험 결과는 수서 생태계의 납유입에 대한 오염지표로서 *Maceobrachium nipponnese*를 대상으로 조직내에 Na^+/K^+ATPase 활성변화를 이용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다고 볼 수 있다.

Journal of Korean Society on Water Quality
Vol. 18 No. 4, pp. 395-400, 2002

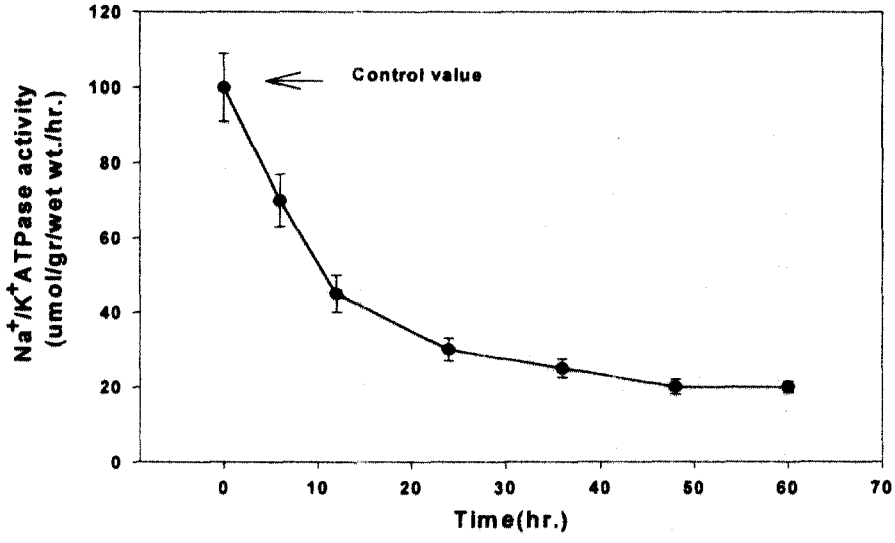

Fig. 2. Relationship between the reduction of Na^+/K^+ATPase activity and exposure time at LC_{50} concentration for *Maceobrachium nipponnese*. Each value is mean±SE for 20 animals.

3.3. 노출농도에 따른 Na^+/K^+ATPase 활성변화

본 생물을 대상으로 실제적으로 수서 생태계로 유입되는 현장 농도 범위에서 Na^+/K^+ ATPase 활성변화에 미치는 영향을 예측하기 위하여 LC_{50}의 1/10농도와 1/100 농도에서 96시간동안 노출시킨 다음 얻은 실험결과를 Fig. 3에 표시하였다.

Fig. 3에 나타난 바와 같이 정상군에 비하여 납에 노출된 군의 Na^+/K^+ATPase 활성은 두 농도 모두에서 유의성 있게 억제되는 것을 관찰할 수가 있으며 억제정도는 농도에 비례하는 것으로 밝혀졌다. 특히 Fig. 1의 치사율 실험의 경우, 가장 낮은 농도인 10μg/L에서의 치사율이 정상군과 별다른 차이가 없다는 점과 Fig. 2의 효소활성억제 실험의 경우, LC50의 1/100농도인 4.5μg/L에서도 Na^+/K^+ATPase 활성 저하가 관찰되었다는 점 등을 통하여 현재 수서 생태계 오염을 감지하는 지표생물 활용법보다는 생체지표 활용법이 바람직하다는 사실을 알 수가 있다. 다시 말하면 기존의 오염지표인 치사율은 Na^+/K^+ATPase 활성변화에 비하여 오염에 대한 민감도가 상당히 낮기 때문에 실제적으로 수서 생태계내로 납의 유입이 시작되었음에도 불구하고 오염은 감지되지 않는 오류가 발생할 수 있다는 점을 알 수가 있다.

지금까지의 실험 결과를 통하여 얻을 수 있는 고찰은 다음과 같다.

첫째는 수계로 유입되는 납오염에 대하여 *Maceobrachium nipponnese*은 저항성이 큰 관계로 오염에 대한 민감도는 다소 떨어지지만 고농도까지 치사하지 않기 때문에 납오염에 대한 생체지표를 찾는 대상생물이 될 수있다는 점이다.

둘째는 광범위한 농도의 납오염에 대한 보다 민감한 생체지표로서 *Maceobrachium nipponnese*의 조직내에 Na^+/K^+ ATPase의 활성 변화를 측정함으로써 수서 생태계로 유입되는 납농도와의 상관성을 구할 수 있는 정량적인 분석 방안으로 활용될 수 있다는 점이다.

즉 *Maceobrachium nipponnese*내 Na^+/K^+ ATPase 활성변화는 수서 생태계의 저농도의 납오염에 대한 초기 생체지표로서 훌륭한 수단이 될 수 있다는 점을 시사하고 있다.

일반적으로 중금속의 오염에 대한 생체지표로 설치류를 대상으로 Na^+/K^+ATPase 활성변화를 측정하는 연구 결과는 다소 있지만 수서 생태계의 중금속 오염을 측정하기 위하여 갑각류의 조직내 Na^+/K^+ATPase 활성변화를 이용한 경우는 거의 전무한 실정이다[13].

본 실험에서 얻은 Na^+/K^+ATPase 활성변화에 대한 연구결과와 기존의 설치류를 대상으로 한 연

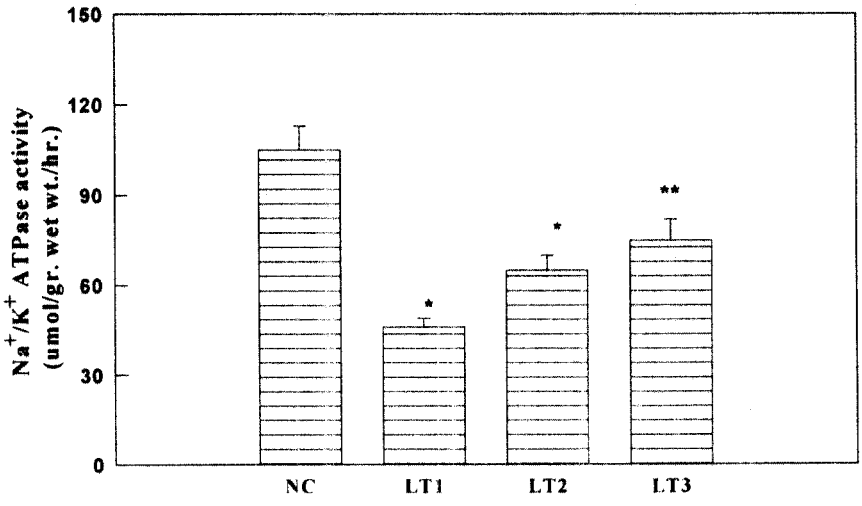

Fig. 3. Effects of lead on Na^+/K^+ATPase activity in *Maceobrachium nipponnese*. NC; normal control group, LT1; lead-treated group(LC_{50}), LT2 ; lead-treated group(LC_{50}/10), LT3; lead-treated group(LC_{50}/100). Each value is mean±SE for 20 exposed and 10 control animals. Significantly different from normal control group at $p<0.001^*$, $p<0.05^{**}$. Animals were exposed to three different lead acetate concentrations for 96hrs.

구결과를 비교한 결과 갑각류가 설치류에 비하여 훨씬 납에 대하여 민감성이 큰 것으로 나타났다. 이러한 실험결과는 납오염에 대한 생체지표로서 Na^+/K^+ATPase 활성변화가 수서 생태계뿐만 아니라 다양한 환경매체에 적용될 수 있음을 시사하고 있다.

본 연구 결과를 통하여 수서 생물의 납에 대한 민감성과 수서 생태계에 대한 위해성평가는 물론 실험결과를 인간에 대하여 외삽함으로써 납중독으로 인한 발생 가능한 건강위해성의 예측 등이 가능한 만큼 향후 납오염으로 인한 *Maceobrachium nipponnese*의 Na^+/K^+ATPase 활성변화에 대한 생화학적인 특성 연구 및 억제 메커니즘에 대한 지속적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

4. 결 론

수서 생태계에 유입되는 납에 대한 오염정도를 조기에 발견하기 위한 생체지표로서 한국의 민물에 서식하는 갑각류인 십각목의 *Maceobrachium nipponnese*내 Na^+/K^+ATPase 활성변화에 대한 실험 결과를 종합하면 다음과 같다.

1. *Maceobrachium nipponnese*의 납에 대한 LC_{50}는 446μg/L로 밝혀졌다.

2. LC_{50}의 납농도에서 *Maceobrachium nipponnese* 내 Na^+/K^+ATPase 활성은 11시간 만에 55% 정도 감소하였으며 48시간이후에는 80%정도까지 억제를 보이는 것으로 나타났다

3. Na^+/K^+ATPase 활성은 납에 대하여 매우 민감하게 억제되며 억제되는 정도는 농도 의존적인 것으로 밝혀졌다.

4. *Maceobrachium nipponnese*내 Na^+/K^+-ATPase 활성변화는 수서 생태계가 납에 오염되는 초기에 감지할 수 있는 생체지표로서 활용될 수 있는 것으로 밝혀졌다.

5. 참 고 문 헌

1. NRC, *Lead in the human environment*, National research council, National academy of sciences, Washington, DC, (1984).
2. EPA, *Air quality criteria for lead*, EPA60/8-81/023. Washington, DC. : US environmental protection agency, (1981).
3. Goyer, R.A., Lead toxicity; from overt to subclinical to subtle health effects, *Environ. Health Prospect*, Vol. 86, 177-181 (1990).
4. Freeman G.B., and Jhonson J.D., Absolute

Journal of Korean Society on Water Quality
Vol. 18 No. 4, pp. 395-400, 2002

bioavalability of lead acetate an mining waste rats, *Toxicology*, Vol. 91, 151-163 (1994).

5. Steeland K., Selevan S., The mortality of leadmelter worker, *Am. J. Pub. Health*, Vol. 81, 1641-1644 (1992).
6. Astrin K.H., and Bishop, D.F., Delta-aminolevulinic acid dehydratase isoenzyme and lead toxicity, *An. NY Acad Sci*, Vol. 514, 23-29 (1987).
7. Rodamilans M., and Martinez-Osaba M.J., Lead toxicity on endocurine tescular function in an occupationally exposed population, *Hum Toxicol* Vol 7, 125-128 (1988).
8. Kuhn K., and Streit B., Detecting sublethal effects of organophsphates by measuring acetylcholinesterase activity in Gammaraus, *Bull. Envirion. Contam. Toxicol.* Vol. 53, 398-404 (1994).
9. Vanegas C., and Espina S., Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in white shrimp penaeus, *Bull. Envirion. Contam. Toxicol.* Vol. 58, 87-92 (1997).
10. Kimelberg H.K., and Papahadjiopoulos D., Phospholipid requirements for Na^+/K^+ATPase activity: Head-group specificity and fatty acid fluidity, *Biochim. Biophys Acta* Vol. 282, 277-292 (1972).
11. Jerry, L. H., *Number, Cruuncher, Statistical system*, Kaysville Uta (1987).
12. Mary K., and Joseph R., pH-dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn to Ceriodephinia dubia, Pimephales promelas, Hyalella azecta and Lumbriculus variegatus., *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 12, 1261-1266 (1993).
13. Myung-Kiu Chung, Effects of lead on ATPase activity in the sciatic nerve of Spraque-Dawley rat, *Kor. J. Environ. Toxicol.*,