

## PC1) 영산강, 금강의 수질과 붕어와 황소개구리에 대한 내분비계장애 특성 연구

정징운, 박흥재\*

인제대학교 환경공학부

### 1. 서 론

오늘날 우리 인간이 살아가고 있는 주위환경에서 수많은 화학물질이 존재하고 있다. 최근에 내분비계 장애물질 즉 환경호르몬 (Endocrine disruptor)이라 불리는 물질이 생식과 생육이라고 하는 생물생존의 기본적 조건에 영향을 미친다는 사실이 밝혀지면서 새로운 환경문제로 대두되어 세계적인 관심의 초점이 되고 있는 실정이다.

1977년 국제자연보존연맹(International Union Conservation)의 보고에 의하면 현재 지구상에서 약 3천여 종류의 동물과 약 1만5천8백 종류의 식물이 멸종위기에 직면해 있다고 한다.

최근에 미국, 유럽 등에서 발표되어 주목을 받고 있는 내분비계 장애물질은 인간 및 동물의 생체 내에서 작용하여 수컷의 정자 수를 감소시키거나 수컷의 암컷화하여 다음세대의 성장억제 등을 초래하는 것으로 알려져 있어 지구상에서 생명체의 멸종에 큰 영향을 미치는 한 요인으로 인식되기 시작하였다.

내분비계 장애물질에는 광범위한 합성화학물질, 의약품 및 일부 천연물질이 포함하는 것으로 거론되며, 이러한 물질들은 생체 내의 섬세한 hormone계에 영향을 주기 때문에 극미량으로도 생식기능에 이상을 가져 올 수도 있고 급·만성 독성과는 달리 다음 세대에 영향을 발현 할 수 있다는 특성이 있다. 또한 유기 염소계 살충제 및 PCBs와 같이 잔류성이 큰 물질일 경우 자연의 먹이사슬을 통해 동물이나 사람의 체내에 축적되어 야생동물이나 인간에게 생식기능 저하와 기형을 유발하는 것으로 알려져 있다.

따라서 향후 내분비계 장애물질을 검색·선정하여 규제하기 위해서는 우선 적합한 시험법 개발이 이루어져야 하고 환경 중 실태조사, 용량-반응 평가, 노출량 산정 및 위해도 평가 등이 이루어져야 할 것이다.

그래서 본 연구는 vitellogenin(Vtg)과 수질을 통하여 어류와 양서류에 대한 내분비계 장애물질 인 환경호르몬이 미치는 영향에 관한 상관관계를 나타내고자 한다. 수질이 오염 정도에 따라 환경호르몬이 수중생물에 영향을 주는 상관성을 측정하고자 한다.

### 2. 실험방법

#### 2.1. 붕어(Carp, *Carassius auratus*)

낙동강 유역, 남강, 하동지역 그리고 주남저수지에 있는 강이나 호소수에서 2004년 6~8월까지 각 지역마다 성적으로 성숙한 붕어 20마리씩 채집하여서 혈액을 채취하였다. 붕어

의 산란기는 5~7월경이며, 산란성기 조건의 수온은 18~22℃이다. 붕어는 수컷이 암컷보다 매우 적은 편이므로 20마리 중에서 수컷 붕어는 2~6마리 정도이며, 정자형성이 활발한 붕어를 선택하였다. 실험용 붕어의 몸무게는 약 300~400g이다.

## 2.2. 황소개구리(Bullfrog, *Rana catesiveiana* Shaw)

암·수컷의 상단부 뒤쪽에는 작은 돌기가 있다. 등쪽의 체색은 옅은 녹색 또는 갈색을 나타내며 뒷발 등쪽에는 검은 반점이 있다. 수컷은 배쪽이 어두운 흰색이고 앞발과 목 부분, 배 가장자리는 황금색을 띠며, 암컷의 배 부분도 어두운 흰색을 나타내고 가장자리는 갈색무늬가 분포되어있다. 눈 뒤에는 수컷이 암컷보다 2배 크기의 고막이 있다. 그리고 수컷의 앞발 첫 번째에 발가락에 흑색의 용기 돌기를 볼 수 있다. 활동기인 4~10월까지 서식지 환경 조건은 수온이 14~29℃이며, 유속이 5~10cm/sec 정도로 매우 느리고 수심이 30~50cm 정도의 저수지, 늪에 서식한다. 강이나 호소수에서 2004년 6~8월까지 각 지역마다 성숙한 황소개구리 20마리를 채집하여 혈액을 채취하였다. 실험용 황소개구리의 몸 무게는 약 300~400g이며, 길이는 12~20cm이다.

## 2.3. Vitellogenin의 정제(Purification)와 유도(Induction)

성숙한 황소개구리를 1주일에 1회 17β-estradiol(1ml/100g body weight) 주사하였다(Lomax *et al.*, 1998 ; Parks *et al.*, 1999 ; Borin *et al.*, 2000). 붕어도 동일 한 방법으로 17β-estradiol(1:2000 sigma)을 주사했다(Tyler *et al.*, 1996). 상온에서 황소개구리는 심장을 찢어서 혈액을 모으고, 붕어는 아가미와 배를 갈라서 혈액을 모아서 원심분리기를 3,000 xg로 2℃에서 10min간 돌려서 혈청(serum)을 얻었다. 황소개구리와 붕어의 혈청 500μl을 0℃에서 35%의 포화 ammonium sulfate((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)용액을 넣어 50,000 xg로 원심분리 하였다(Marcelro Montorzi *et al.*, 1994). 상등액을 25mM HEPES(N-(2-

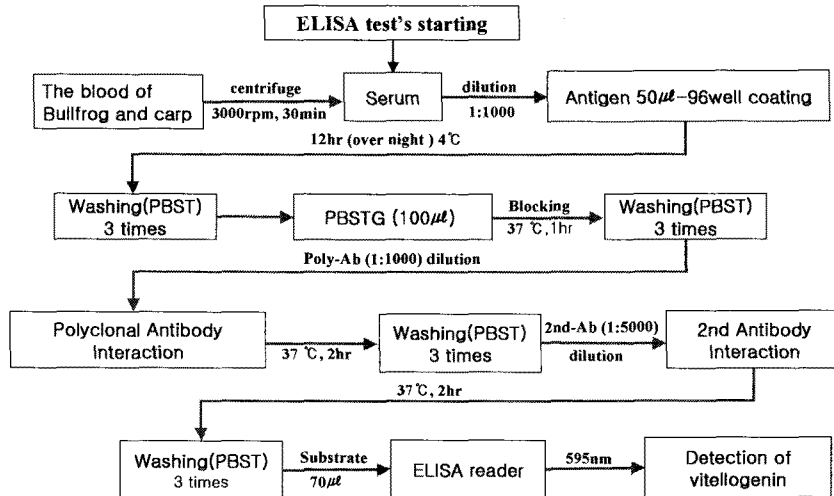
Hydroxylethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)), pH 7.5에 20시간이상 투석시켰다. Ammonium sulfate ppt는 혈액 속에 vitellogenin을 제외한 나머지 불필요한 단백질을 제거하는 일반적인 방법이다.

혈액 속에 염의 농도가 높으면 불필요한 단백질을 응집 침전시킨다. 혈청 700μl에 25mM HEPES의 300μl를 첨가하여 Mono-Q column이 장착된 HPLC로 정제한다. 정제하기 전에 Mono-Q(anion exchange) column, HR 5/5(Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 22℃에 1mM PMSF, 1μM leupeptin 완충용액으로 깨끗이 씻어 낸 후 25mM HEPES(pH7.5)에 평형을 잡는다. 시료를 pH 7.5인 25mM HEPES 완충용액에 0.5M NaCl을 직선 기울기로 용출시킨다. 흡광도가 254nm에서 유속율이 2ml/min로 수집한다(Marcelro Montorzi *et al.*, 1994).

## 2.4. 정제한 Vitellogenin로 항원 생성

Vitellogenin(VTG)은 각 시료 100μl의 VTG를 8%의 stacking gel과 12% resolving gel로 SDS-PAGE시켰다. 이때 전류는 40mA이고, coomassi blue로 staining하고 destaining buffer로 rinsing하여 황소개구리와 붕어에 대한 reducing gel로부터 추정된 고 분자량

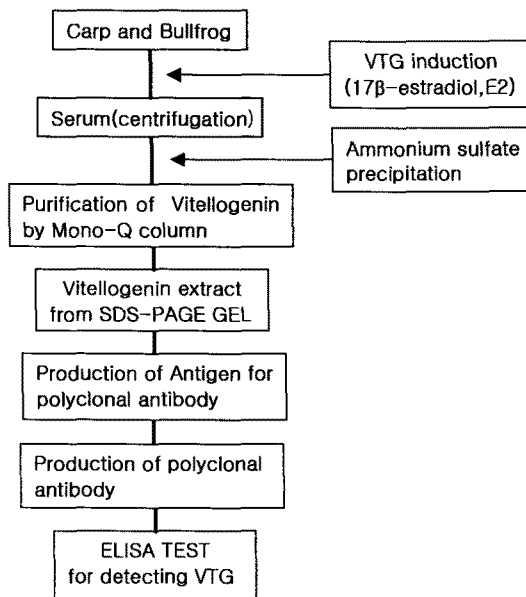
VTG 단백질 띠를 절개하여 만들었다. 황소개구리는 220kDa의 고분자량 band이고(M. Watts *et al.*, 2003) 붕어는 160 kDa의 고분자량 band가 나타났다(Jean M. W. Smeets *et al.*, 1999).



Scheme 1. The detection of VTG in blood by ELISA.

### 2.5. Carp와 bullfrog 시료에 anti-carp와 anti- bullfrog PAb의 응용

낙동강(왜관, 고령, 을숙도, 물금), 남강, 하동(섬진강) 그리고 주남저수지(Junam reservoir)에 서식하는 성적으로 성숙한 붕어(*Carassius auratus*)와 황소개구리(*Rana catesbeiana* Shaw) 20마리의 혈액을 채취하여 anti-carp와 anti- bullfrog PAb로 ELISA test 하였다(Scheme 2).



### 3. 결과 및 고찰

나주지역에는 수컷 붕어의 VTG 농도가 0.1 $\mu$ g/ml 이하로 나타났으며, 담양지역의 수컷 붕어의 VTG 농도도 0.1 $\mu$ g/ml 이하로 ELISA test로 검출되었다.

나주에는 pH농도가 기준치 범위 내에 존재하며, DO는 기준치 5 $\mu$ g/ml이상보다 1.5~2.4배로 높게 나타났고, BOD는 3월에 8.9 $\mu$ g/ml이고, 5월은 7.6 $\mu$ g/ml으로 기준치 보다 높게 나왔고, COD는 기준치 6 $\mu$ g/ml이하보다 1.13~1.8배로 다소 높다. SS도 기준치 25 $\mu$ g/ml이하인데 6월에 27.7 $\mu$ g/ml로 기준치 보다 조금 높게 나타났다. T-N는 기준치가 0.6 $\mu$ g/ml이하인데 7.3~16.4배로 매우 높게 나타났으며, T-P도 기준치 0.05 $\mu$ g/ml이하에 비하여 1.8~19.8배로 대단히 높게 검출되었다.

담양도 pH농도가 기준치 범위 내에 존재하며, DO는 기준치 5 $\mu$ g/ml이상의 1.6~2.4배이며, BOD와 COD도 6 $\mu$ g/ml이하를 나타내며, SS도 기준치 25 $\mu$ g/ml이하에 존재한다. T-N의 경우 기준치 0.6 $\mu$ g/ml이하의 3.5~7.2배 높게 나타났으며, T-P는 기준치 0.05 $\mu$ g/ml이하의 1.2~3.7배로 상당히 높게 나타났다.

나주지역이 담양지역보다 전체적으로 수질의 오염도가 크게 나타내고 있다.

#### 3.1. 무안, 명촌의 붕어 ELISA test와 수질

무안에서 수컷 붕어의 VTG 농도는 0.1 $\mu$ g/ml이하를 나타내며, 명촌은 7마리의 수컷 붕어의 VTG 농도가 0.1 $\mu$ g/ml이하이나, 그중 세 마리가 53.8, 125.5, 185.7 $\mu$ g/ml로 매우 높게 검출되었다.

무안 수질환경에서 pH농도가 기준치 내에 존재하고, DO는 기준치 5 $\mu$ g/ml이상에서 나타내며, BOD는 6 $\mu$ g/ml이하의 수치를 나타내고 있으나, COD는 기준치 6 $\mu$ g/ml이하보다 전반적으로 높게 나타났고, SS는 기준치 25 $\mu$ g/ml이하에 적합하며, T-N은 기준치 0.6 $\mu$ g/ml이하의 6.6~17.5배로 매우 높은 수치를 보이며, T-P는 기준치 0.05 $\mu$ g/ml이하의 2.6~11.3배로 높게 나타났다.

명촌 수질에서 pH농도가 기준치 범위 내에 있으며, DO가 6월, 8월에 조금 낮으며, BOD는 기준치 6 $\mu$ g/ml이하에서 나타내며, COD도 대부분 기준치 이하이나 1~2월에 다소 높게 나타났다. SS는 전체적으로 기준치 이하를 보이고 있으며, T-N은 기준치 0.6 $\mu$ g/ml이하의 3.0~6.5배로 높게 나타내며, T-P는 기준치 0.05 $\mu$ g/ml이하의 1.3~4.9배로 검출되었다.

명촌이 부유물질량(SS)이 무안천보다 높고, DO가 낮아 유기물 분해가 잘 일어나지 않는다. 그래서 수컷 붕어 세 마리의 VTG농도가 높게 검출되어졌다.

#### 3.2. 온천, 명촌의 황소개구리 ELISA test와 수질

온천에서 수컷 황소개구리의 VTG 농도가 0.1~156.3 $\mu$ g/ml이며, 명촌에서는 수컷 황소개구리의 VTG 농도가 0.1~114.5 $\mu$ g/ml로 나타났다.

온천의 수질을 보면 pH농도는 기준치에 적합하며, DO도 대부분이 기준치 5 $\mu$ g/ml이상이나 3~4월, 7월에 기준치이하의 농도를 나타내며, BOD가 기준치 6 $\mu$ g/ml이하의 1.05~

3.4배로 다소 높은 농도로 나타나내고 있다. COD도 기준치보다 2~7.8배로 큰 농도로 나타났다. SS는 1월, 2월, 4~9월 사이에 매우 낮은 농도이었으나, 3월에 부유물질량이 급증하였다. T-N은 기준치 0.6 $\mu$ g/ml이하보다 4.4~15.8배 크게 나타나고, T-P도 기준치 0.05 $\mu$ g/ml이하에 비하여 2.4~19.9배로 높게 나타났다.

명촌도 pH농도가 기준치 범위 내에 있으며, DO가 6월, 8월에는 기준치 5 $\mu$ g/ml이상보다 조금 낮은 농도를 나타내며, BOD는 1~9월까지 기준치 6 $\mu$ g/ml이하의 농도에서 존재하며, COD도 대부분 기준치이하이나 1~2월에 다소 높게 나타났다. SS는 전체적으로 기준치이하의 농도를 나타내고, T-N은 기준치 0.6 $\mu$ g/ml이하의 3.0~6.5배로 매우 높은 농도를 나타내며, T-P는 기준치 0.05 $\mu$ g/ml이하의 1.3~4.9배의 농도로 검출되었다.

명촌천의 붕어, 황소개구리는 수질에서 T-N과 T-P가 매우 높은 농도이므로 VTG농도가 높게 검출되었다.

온천의 황소개구리는 수질에서 BOD와 COD의 농도가 상당히 높고, T-N과 T-P의 농도가 매우 높으므로 VTG농도가 높게 검출되었다.

### 3.3. 담양, 무안의 황소개구리 ELISA test와 수질

담양댐에서 수컷 황소개구리의 VTG 농도가 0.1~183.1 $\mu$ g/ml으로 나타났으며, 무안에서 수컷 황소개구리의 VTG 농도가 0.1~91.4 $\mu$ g/ml로 나왔다.

담양댐 수질에서 T-N의 경우 기준치 0.6 $\mu$ g/ml이하의 3.5~7.2배 매우 높은 농도를 나타냈으며, T-P는 기준치 0.05 $\mu$ g/ml이하의 1.2~3.7배로 상당히 높은 농도로 나타났다.

무안에서 수질환경은 COD는 기준치 6 $\mu$ g/ml이하보다 전반적으로 높은 농도로 나타났고, T-N은 기준치 0.6 $\mu$ g/ml이하의 6.6~17.5배로 매우 높은 수치를 보이며, T-P는 기준치 0.05 $\mu$ g/ml이하의 2.6~11.3배로 높은 농도로 나타났다.

담양댐과 무안에서의 황소개구리는 수질의 COD, T-N과 T-P가 기준치보다 높은 농도를 나타내므로 황소개구리의 VTG 농도가 매우 높게 검출되었다.

### 3.4. 고산, 대청댐의 황소개구리 ELISA test와 수질

고산지역에서 수컷 황소개구리의 VTG 농도가 0.1~34 $\mu$ g/ml로 나타났고, 대청댐에서는 수컷 황소개구리의 VTG 농도가 0.1~72.8 $\mu$ g/ml로 나타났다.

고산의 수질환경을 살펴보면 pH농도는 기준치 6.5~8.5에 적합하고, DO도 기준치 5 $\mu$ g/ml이상의 농도를 나타내며, BOD와 COD도 기준치 6 $\mu$ g/ml이하로 나왔다. SS는 기준치 25 $\mu$ g/ml이하로 나왔고, T-N은 기준치 0.6 $\mu$ g/ml이하 보다 1.5~5.4배 높은 수치의 농도를 나타내며, T-P은 기준치 0.05 $\mu$ g/ml이하로 나타났으나, 7월과 9월에 다소 초과하였다.

대청댐에서는 pH농도가 기준치 범위 내에 존재하고, DO도 기준치 이상의 농도로 나타났다. BOD와 COD는 기준치 이하의 수치로 나왔고, SS도 기준치 25 $\mu$ g/ml이하의 농도이다. T-N은 기준치 0.6 $\mu$ g/ml이하 보다 1.8~3.3배의 농도를 나타내며, T-P은 기준치 0.05 $\mu$ g/ml이하의 농도로 나타났다.

고산과 대청댐은 BOD, COD와 SS가 기준치이하의 농도를 나타내며, T-N과 T-P도 기

준치 농도以内に 존재하므로 황소개구리의 VTG농도가 타 지역보다 낮게 검출되었다.

#### 4. 결 론

붕어의 VTG 농도로 나타낸 Pearson의 상관계수이다. 미호천, 고령, 나주, 담양댐, 무안 등에서는 붕어의 VTG 농도가 0.1 $\mu$ g/ml이하 이므로 상관계수를 나타 낼 수가 없었다. 명촌 경우에는 수온과 붕어의 VTG 농도사이 상관성은  $P < 0.05$ 이고, 상관계수는 0.718로 나타낸다. 그 외 지역에서도 수질 인자들과 붕어 VTG 농도사이에 상관계수를 보여준다.

황소개구리의 VTG 농도와 수질과의 Pearson 상관계수이다. 명촌 지역의 황소개구리 VTG 농도의 상관계수는 0.689이며, 상관성은  $P < 0.05$ 이다. 대청댐의 황소개구리의 VTG 농도와 수온과의 상관계수는 0.753이고, 상관성은  $P < 0.05$ 이다. T-P와 SS의 상관계수는 0.967과 0.998이며, 상관성은  $P < 0.01$ 이다. 담양댐에서의 황소개구리 VTG 농도와 수온과의 상관계수는 0.755이고 상관성은  $P < 0.05$ 이다. 황소개구리 VTG 농도와 pH, DO 그리고 SS의 상관계수는 - 0.859, - 0.812, 0.933이고, 상관성은  $P < 0.01$ 이다.

고산천은 T-P와의 상관계수는 0.716이고, 상관성은  $P < 0.05$ 이다. 수온, DO 그리고 SS와의 상관계수는 0.825, - 0.829, 0.815이며, 상관성은  $P < 0.01$ 이다. 온천천은 상관계수가 비교적 낮게 나타났다.

나주는 SS의 상관계수가 0.669이며, 상관성은  $P < 0.05$ 이다. 무안은 수온과의 상관계수는 0.813으로 상관성이  $P < 0.01$ 이다. DO인 경우 - 0.682이고, 상관성은  $P < 0.05$ 이다.

#### 참 고 문 헌

- G. H. Monteverdi., R. T, Di Giulio., 1999, An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocyte cultures from the channel catfish(*Ictalurus punctatus*), *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 62-69.
- Jean M. W. S., Tanja R. R., Krista M. N., Hans K., Norbert E., John P. G., Martin van den berg., 1999, *In Vitro* vitellogenin production by carp(*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti)estrogenic activity of xenobiotics, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 157, 68-76.
- Per-Erik O., Peter K., Charlotta P., Christer S., 1995, Interaction of cadmium and oestradiol-17 $\beta$  on metallothionein and vitellogenin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Biochem. J.* 307, 197-203.
- Helge K. J., Helge T., Nils P. W., Arne M. A., 1999, Arctic charr(*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 124, 355-362.
- A. Goulas., E. L. Triplett., G. Taborsky., 1996, Isolation and characterization of a vitellogenin cDNA from rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) and the complete sequence of a phosvitin coding segment, *DNA and CELL BIOLOGY*, 15, 605-616.