

농약의 협력작용으로 인한 잉어의 해독효소 활성의 변화

김인선 · 이강봉 · 심재한 · 서용택

전남대학교 농과대학 농화학과

초록 : 참잉어에 대한 해독효소 활성을 협력작용을 갖는 농약을 공시하여 조사하였고 잉어의 각 조직별 효소활성도 조사하였다. 협력작용을 갖는 약제의 독성증가에 따른 효소활성은 carboxylesterase와 GST 모두 준치사 농도에서는 활성의 증가를 보였으나 독성이 증가함에 따라 활성이 감소하였다. Carboxylesterase의 활성은 IBP와 isoprothiolane과의 협력작용으로 인해 현저한 감소를 보였으며 GST 활성 또한 isoprothiolane의 IBP, cartap과의 협력작용으로 인해 감소를 나타냈다. 한편 각 조직별 효소활성의 경우, carboxylesterase는 단일약제 처리시 공시어의 간(肝)에서, 혼합약제 처리시 장(腸)에서 그 활성이 높았으며 GST의 조직별 활성은 약제의 처리양상과는 관계없이 다양한 효과를 보였다. HPLC 방법에 의한 LDH의 활성은 isoprothiolane 단일처리구에서 활성이 가장 높았고 isoprothiolane + cartap 혼합처리구와 cartap 단일처리구에서는 가장 낮았다(1993년 1월 6일 접수, 1993년 2월 16일 수리).

농약으로 인한 수질 오염은 약제의 잔류성에 따라 정도의 차이는 있으나 그 잔류성은 수질중에 서식하고 있는 수생생물에 영향을 끼칠 가능성이 있다. 현재 생물계에서 농약으로 치사되는 어류가 전체 치사어류의 8% 정도를 차지하고 있다는 보고¹⁾나 어류 양식업에 대한 경제적인 측면에서의 막대한 피해에 대한 보고²⁾는 농약에 의한 수생생물의 이러한 피해를 말해주고 있다.

어류의 체내에서는 농약에 의해 glycogen 함량이나 hemoglobin의 함량이 급격히 감소되고^{3,4)} 유기인제와 유기염소계 농약의 혼합처리시에는 pyruvate, glucose와 lactate의 함량이 감소된다고⁵⁾ 알려져 있다. 이러한 피해외에도 수질 유입 약제가 2종이상 된다면 상호협력작용이 발생할 수 있어 어류에 미치는 영향은 더욱 증대된다고 생각된다.

이에 본 실험에서는 이미 협력작용(synergism)이 있는 것으로 밝혀진 약제⁶⁾ isoprothiolane과 caratp, S-benzyl-diisopropyl phosphorothiolate(이하 'IBP'로 표시)가 잉어의 생체내 해독효소인 carboxylesterase, glutathione S-transferase, lactate dehydrogenase의 활성에 미치는 영향을 조사하고 효소활성 측정을 위한 최적조건을 밝히고자 하였다. 또한, 농도에 따른 효소활성의 변화 및 잉어의 조직별 해독효소 활성을 조사하여 농약의 수질

유입에 따른 잉어의 해독활성을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

공시약제 및 시약

IBP, isoprothiolane, cartap은 농촌진흥청 농약연구소에서 분양받은 표준품을 사용하였으며 화학명은 Table 1과 같다. 시약은 bovine serum albumin(BSA), Folin-phenol reagent, glutathione, D,L-lactate, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), α -naphthol, α -naphthylacetate(α -NA), *p*-hydroxymercuribenzoate(PHMB), eserine, *o*-dianisidine tetrazotized, 18-crown-6-ether(1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecane), DBAP(α -P-dibromoacetophenone), lauryl sulfate 등을 사용하였다.

공시어류

본 실험에 사용한 어류는 참잉어로 전라북도 내수면 개발시험장에서 분양받아 실험실 조건으로 2주 이상 순화시킨 후 공시하였다. 공시어류의 순화기간 중에는 양등⁷⁾과 동일한 조건으로 잉어치어용 사료를 체중당 2~4%/일로 공급하였고 실험실 조건은 온도 23±1°C, 일조 시간은 12시간으로 유지하였다. 공시어는 실험 24시간

Table 1. Chemical names of pesticides used

Common name (purity)	Chemical name	Classification
IBP(90.06%)	S-benzyl <i>O,O</i> -diisopropyl phosphorothiolate	Organophosphorus
Isoprothiolane(96.50%)	Diisopropyl 1,3-dithiolan-2-ylidenemalonate	Organosulfur
Cartap(98.20%)	S,S'-(2-dimethylaminotrimethylene) bis(thiocarbamate)	Thiocarbamate

전에 절식시켜 공시하였다.

공시용액의 LC₁₀, LC₂₅

공시용액과 희석수, 준 치사농도와 치사농도는 양 등⁶⁾의 방법과 동일한 조건으로 시험하여 계산하였다. 효소 활성을 조사하기 위한 시험은 가로 45 cm×세로 45 cm×높이 45 cm 유리수조의 희석수 20l에 공시약제인 isoprothiolane, IBP, cartap을 LC₁₀과 LC₂₅ 농도로 분산제인 Triton X-100과 함께 처리한 후 공시어 20마리를 넣었다.

해독효소의 활성

효소의 활성측정은 공시어를 각 농약의 처리농도에 48시간 노출시킨 후 각 조직의 일정량을 취해 완충용액과 함께 glass homogenizer로 마쇄한 것을 효소액으로 사용하였으며 각 효소활성 측정은 3반복을 실시하였으며 다음과 같다.

1) Carboxylesterase 활성

Carboxylesterase 활성측정은 Van Asperen⁷⁾ 방법에 준하여 공시어를 각 농약의 준 치사농도와 치사농도(LC₁₀, LC₂₅)로 48시간 노출시킨 후 이중 5마리에 대해 4°C에서 간을 채취하여 0.1 M 인산나트륨 완충용액(pH 7.0)으로 세척하고 이를 완충용액 20 ml를 이용하여 glass homogenizer로 30초간 마쇄하여 균질화시켰다. 균질액은 이중가제로 여과한 후 105,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 그 상등액을 효소액으로 사용하였다. 또한 어류의 조직인 머리, 장에서의 활성 측정을 위해서도 상기의 방법으로 얻어진 효소액을 사용하였다. 활성 측정은 얻어진 효소액 1 ml와 3×10⁻⁴ M α-NA 기질 용액 0.5 ml를 시험관에 넣고 eserine(10⁻⁴ M) 0.5 ml와 PHMB(10⁻⁴ M) 0.2 ml를 각각 효소액에 첨가한 후 27°C 수조에서 30분간 배양하여 cholinesterase(ChE)와 arylesterase의 활성을 제거하였다. 배양 후 효소액에 diazoblu-sodium lauryl-sulfate(DBLS)용액 0.1 ml를 가하여 발색시킨 후 cuvette에 옮겨 600 nm에서 활성을 측정하였다.

2) Glutathione S-transferase(GST)활성

GST활성은 상기와 같이 노출시킨 공시어 5마리를 4°C에서 간을 채취하여 인산나트륨 완충용액(pH 8.2)으로

씻은 후 상기 완충용액 15 ml를 이용하여 glass homogenizer로 30초간 완전히 마쇄하여 균질화시켰다. 균질액을 이중가제로 여과하여 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 다시 상등액을 초고속원심분리기에서 105,000×g로 60분간 원심분리하여 상등액을 효소원으로 하였다. 잉어의 각 조직별 효소활성의 경우도 상기 방법으로 효소액을 얻었다. GST 활성 측정은 Habig 등⁸⁾의 방법에 준하여 효소액 2 ml와 5 ml glutathione 1 ml를 시험관에 넣고 20°C 수조에서 1분간 반응시킨 다음 cuvette에 옮기고 150 mM CDNB 0.02 ml를 가한 뒤 cuvette 뚜껑을 막아 30초간 흔들어 준 후 흡광도의 변화를 파장 344 nm에서 5분간 30초 간격으로 측정하여 활성의 변화를 조사하였다. Carboxylesterase와 GST의 단백질 정량은 BSA를 표준품으로 하여 Lowry의 방법⁹⁾에 따라 실시하였다.

3) Lactate dehydrogenase(LDH)의 활성

LDH의 활성 조사는 HPLC에 의한 Simonides 등¹⁰⁾의 방법에 준하여 공시어 15마리의 간을 4°C에서 채취하여 100 mM DBAP가 함유된 50 mM KOH 용액 5 ml를 넣어 glass homogenizer로 30초간 마쇄하여 균질화시켰다. 균질액은 이중가제로 여과한 후 12,000×g로 10분간 원심분리하고 그 상등액에 50 mM 18-crown-16-ether을 가하여 80°C 수조에서 20분간 가볍게 흔들어 주면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액의 일정량을 기기에 주입하여 분석하였다. 분석기기 조건은 다음과 같다.

Instrument, High Performance Liquid Chromatograph; Pump, Waters model 510; UV detector, Waters Model 486 tunable absorbance detector; Analytical Column, 3.9 m(i.d.)×300 mm, μ-Bondapak C-18 Column; Absorbance, 254 nm; Mobile phase, degassed 30% CH₃CN in water; Flow rate, 1.5 ml/min.

결과 및 고찰

협력작용을 갖는 공시약제에 대한 준 치사농도 및 각 치사농도는 Table 2와 같으며 이들의 독성변화에 따른 해독 효소활성은 다음과 같다.

1) Carboxylesterase의 활성

Carboxylesterase 활성을 조사하기 위한 최적조건은 기질농도 150 μM에서 활성이 가장 높았으며 그 이상의 기질 농도에서는 점차 감소하는 경향을 보였다. 또한, carboxylesterase에 대한 K_m 값은 Fig. 1에서처럼 0.2×10^{-5} M로서 Fig. 4에 나타난 GST의 K_m 값 4×10^{-3} μM과 비교하였을 때 carboxylesterase는 V_{max} 에 도달하는 시간이 많이 소요됨을 알 수 있었다. 이는 반응 시간별 효소 활성의 변화를 조사하여 보아도 일치하였다. 한편 ChE와 arylesterase의 활성을 제거하기 위해 투여한 eserine과 PHMB가 carboxylesterase의 효소 활성에 미치는 영향은 Fig. 2에서 제시한 바와 같이 PHMB의 경우 20 μM에서 eserine의 경우 50 μM에서 기질활성이 가장 높게 나타났다. 효소액의 농도에 따른 활성은 농도가 증가할수록 그 활성 또한 증가되는 비례관계를 보였으며, 반응온도에 따른 활성은 30°C 이상부터 온도가 증가할수록 그 활성은 감소되었고 최적반응의 pH는 7.2이었다. 독성의 변화에 따른 carboxylesterase의 활성은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 독성이 증가할수록 감소하였으며 특히 유기인계 약제인 IBP는 isoprothiolane과 협력반응을 통해 IBP 단일약제 처리보다 효소활성의 감소 정도가 현저함을 알 수 있었다. Carboxylesterase의 각 조직별 활성은 Table 3에서 처럼 단일약제 처리의 경우 간에서 가장 높은 활성을 보였으며, 혼합 약제 처리의 경우 장에서 가장 높은 활성을 보였는데 이는 Wood¹¹⁾의 보고처럼 약제 물리적인 특성에 따른 어류체내에서 투과성의 차이에 의하여 약제 해독작용의 차이가 나타난 것으로 생각되었다.

2) Glutathion S-transferase의 활성

GST의 활성을 조사하기 위한 최적조건은 기질인 glutathione 농도 10 μM에서 가장 높은 활성을 보였으며 그에 대한 K_m 값이 4×10^{-3} μM(Fig. 4)로서 carboxylesterase에 비해 매우 낮은 값을 보였는데 이는 어류의 간에서 GST는 기질의 친화성이 매우 높아 쉽게 반응속도 V_{max} 에 도달한다는 것을 암시해주고 있다. 또한 이는 반응 시간별 효소활성 측정에서도 반응시간이 짧을수록 높게 나타났는데, 반응시간 15분 이후 부터는 그 활성이 급격히 감소됨을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 GST가 초기 해독작용에 관여하여 초기 반응이 매우 빠르게 진행되었기 때문에 K_m 값이 상대적으로 낮게 나타난 것으로 생각되었다. 한편 활성조사를 위한 최적 pH는 8.2로 나타났다. 공시약제의 독성변화에 따른 GST 활성은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 독성이 증가할수록 감소하였으며 단일 약제 처리구보다 혼합약제 처리구에서 독성농도간의 차이가 현저하게 나타났다. 특히 isoprothiolane은 단일약제 처리의 경우보다 cartap이나 IBP와의 협력작용으로 1.6~2.0배의 감소를 보였다. IBP처리구의 경우 Fukami 등¹²⁾이 보고한 것처럼 GST가 유기인계 약제에 저항성이 있어서 다른 처리구에 비해 활성의 감소가 두드러지지 않았던 것으로 생각되었다.

Table 2. Variable toxicities of used pesticides to carp

Chemicals ^{a)}	Toxicity (ppm)		
	LC _{0.5}	LC ₁₀	LC ₂₅
IBP	2.98	7.55	20
Isoprothiolane	3.66	4.14	4.30
Cartap	0.15	0.45	0.50
Isoprothiolane + IBP ^{b)}	2.34	4.91	4.50
Isoprothiolane + Cartap ^{c)}	0.10	0.26	0.30

^{a)} Mean ± SE of triplicates.

^{b)} The mixture consisted of isoprothiolane and IBP in concentrations of LC_{0.5}, LC₁₀ and LC₂₅ as ratio of 1 : 1, respectively.

^{c)} The mixture consisted of isoprothiolane and cartap in concentration of LC_{0.5}, LC₁₀ and LC₂₅ as ratio of 1 : 1, respectively.

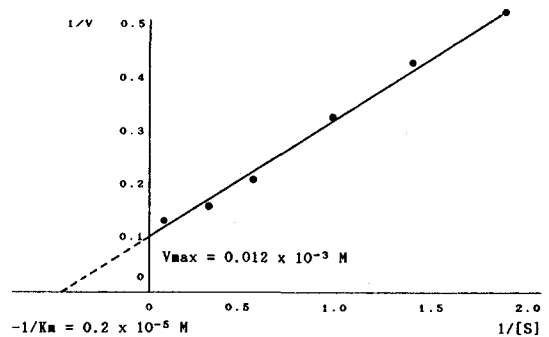


Fig. 1. The K_m value of substrate (α -NA) against carboxylesterase in the carp liver.

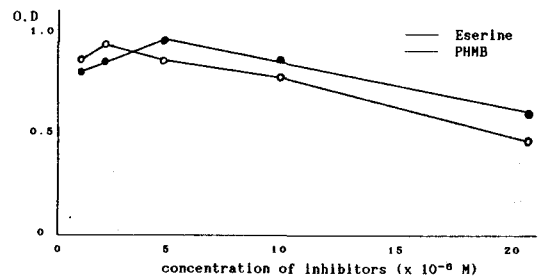


Fig. 2. Inhibition of carboxylesterase activity by the inhibitor in the carp liver.

잉어의 조직별 GST 활성은 각각 다양한 활성을 보였는데 (Table 4), Ding 등¹³⁾의 보고처럼 GST에 대한 서로 다른 기질 특이성이 각 조직에서 존재하여 각각의 약제가 GST의 동위효소 수준을 증가시킨 것으로 생각되었다. 하지만 이 결과에서는 약제간의 협력작용에 의한 효소활성의 차이는 두드러지지 않았고 단지 간 조직에서 isoprothiolane과 IBP의 혼합처리시 현저한 활성증가를 보였으며 또한 공시어의 머리에서는 IBP나 isoprothiolane의 단일 약제 처리보다 혼합약제 처리시 그 활성이 훨씬 감소됨을 볼 수 있었다. 단백질 함량이 GST의 활성에 미치는 영향은 Fig. 6에 나타난 것처럼 표준품으로 사용된 BSA의 함량이

높을수록 GST의 활성은 감소되었는데 이는 Terriere 등¹⁴⁾의 보고처럼 GST 활성의 저해물질이 단백질로 인해 유도되어 GST와 복합체를 형성하였기 때문으로 생각되었다. 본 시험의 결과에서는 isoprothiolane처리 공시어가 가장 높은 단백질 함량을 보였는데 그 결과 GST 활성의 감소가 다른 처리구에 비해 뚜렷하였다.

3) Lactate dehydrogenase의 활성

HPLC 정량법에 의한 LDH 활성은 Table 5와 Fig. 7에서 보는 바와 같이 단일약제 처리시 isoprothiolane 처리

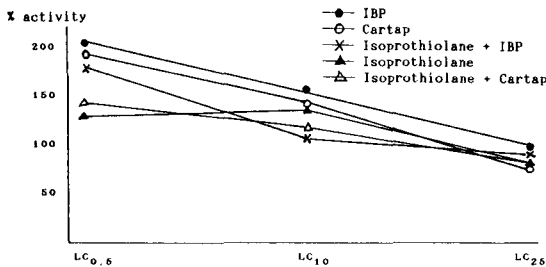


Fig. 3. Effects of increasing toxicity on the carboxylesterase in the carp liver.

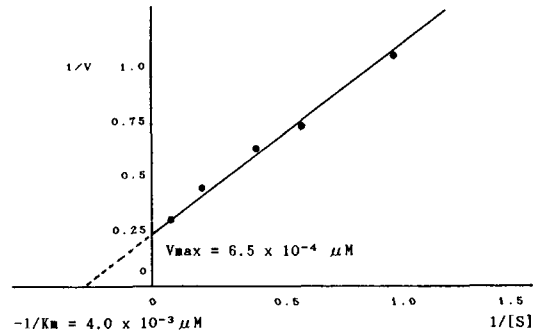


Fig. 4. The Km value of substrate (glutathione) against glutathione S-transferase in the carp liver.

Table 3. Effects of sublethal concentration (LC_{0.5}) on the carboxylesterase activity in the carp tissues

Chemicals	% of specific activity/control activity(nmole/mg protein/min) ^{a,b)}		
	Liver	Gut	Head
Isoprothiolane	131.30 ± 0.23	32.52 ± 0.42	94.70 ± 2.40
IBP	194.28 ± 0.13	20.58 ± 0.27	72.20 ± 3.12
Cartap	179.35 ± 1.14	25.80 ± 0.24	84.41 ± 1.50
Isoprothiolane + IBP	164.77 ± 0.47	255.82 ± 3.24	67.26 ± 2.70
Isoprothiolane + cartap	135.16 ± 0.15	284.49 ± 2.87	74.13 ± 1.21

^{a)} Mean ± SE of triplicates

^{b)} Enzyme activities of control liver: 70.37, gut: 21.16, Head: 41.18

Table 4. Effects of sublethal concentration (LC_{0.5}) the glutathione S-transferase activity in the carp tissues

Chemicals	% of specific activity/control activity(nmole/mg protein/min) ^{a,b)}		
	Liver	Gut	Head
Isoprothiolane	135.38 ± 3.98	131.91 ± 2.04	154.89 ± 7.20
IBP	121.80 ± 10.32	75.53 ± 3.20	114.79 ± 3.70
Cartap	107.01 ± 16.31	43.83 ± 0.27	11.17 ± 0.43
Isoprothiolane + IBP	144.06 ± 10.45	63.87 ± 3.20	61.81 ± 4.37
Isoprothiolane + cartap	106.39 ± 2.22	90.15 ± 1.52	40.68 ± 0.52

^{a)} Mean ± SE of triplicates

^{b)} Enzyme activities of control liver: 49.90, gut: 10.56, Head: 4.19

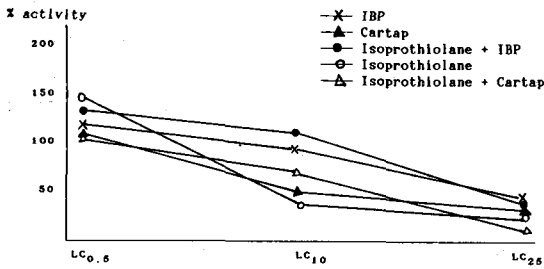


Fig. 5. Effects of increasing toxicity on the glutathione S-transferase in the carp liver.

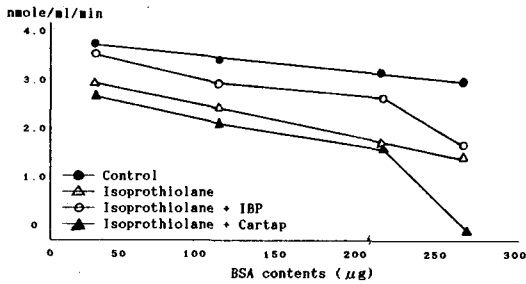


Fig. 6. The influence of BSA contents on the glutathione S-transferase in the carp liver. Protein contents of control, 0.23 mg; isoprothiolane, 1.56 mg; isoprothiolane+IBP, 1.30 mg; isoprothiolane+cartap, 0.38 mg.

공시어에서 가장 낮은 활성을 보였으며 혼합처리시에는 cartap과의 협력작용에 의해서 단일약제 처리보다 약 1.6배 정도 활성의 감소를 보였다. 즉 isoprothiolane은 단일이나 cartap과의 혼합약제 처리에서 해당과정의 저해를 통한 pyruvate의 생성을 감소시킴으로써 LDH에 의한 lactate의 생성량을 감소시키는 것으로 생각되었다. 이 결과는 Dragomikescu 등¹⁵⁾의 보고처럼 효소와 저해물질간의 복합체 형성으로 인한 결과로 추정되었다.

이상의 결과를 요약해서 참잉어에 대해 협력작용을 갖는 공시약제인 isoprothiolane, cartap, IBP에 대하여 각각의 준 치사농도와 치사농도를 구하고 이들 약제의 단일처리와 혼합처리시 독성 증가에 따른 해독효소 활성의 변화와 공시어의 각 조직에서 효소활성을 조사하였다. Carboxylesterase와 glutathione S-transferase 모두 공시약제의 준 치사 농도에 대해 활성의 증가를 보였으며 독성의 증가에 따른 활성의 정도는 carboxylesterase의 경우, IBP와 isoprothiolane과의 협력작용으로 활성의 감소가 현저함을 보였다. Glutathione S-transferase의 경우도 마찬가지로 isoprothiolane의 IBP, cartap과의 협력작용으로 현저한 활성의 감소를 보였다. 잉어의 각 조직별 효소활성은 carbox-

Table 5. Effects of sublethal concentration(LC_{0.5}) on the lactate dehydrogenase activity in the carp liver

Chemicals	% of specific activity/control activity ^{a,b)}
Isoprothiolane	171.30± 13.4
IBP	71.43± 1.23
Cartap	114.28± 22.8
Isoprothiolane+IBP	42.85± 7.80
Isoprothiolane+cartap	214.30± 17.5

^{a)} Mean± SE of triplicates

^{b)} Enzyme activity of control liver: 63.63 nmole/mg protein

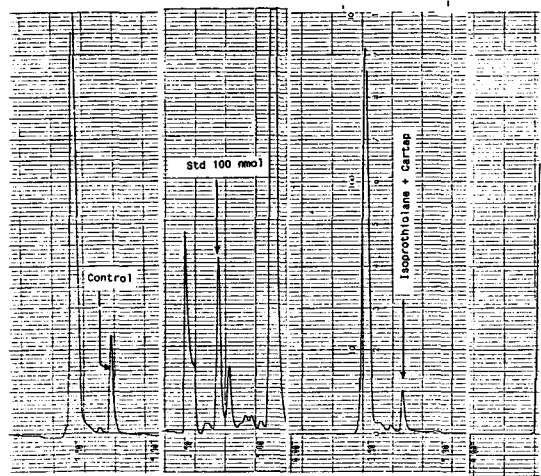


Fig. 7. Typical chromatograms of lactate quantification test as lactate dehydrogenase activity.

ylesterase의 경우 단일약제 처리시 간에서, 혼합약제 처리시 장에서 높은 활성을 보면, GST의 활성은 각 조직에서 다양할 활성을 보였다. 또한 GST의 활성은 단백질 함량이 증가할수록 활성의 감소를 보였는데 특히 isoprothiolane 처리시 가장 낮은 활성을 보였다. LDH 활성의 경우 HPLC 방법에 준한 결과 isoprothiolane과 cartap의 혼합처리시 가장 낮은 활성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원(KOSEF 901-1502-034-2)으로 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Shim, C. C., Lee, S. K. and Roh, J. K.: Korean

- J. Environ. Agric., 4 : 118(1985)
2. Bartik, M. and Piskac, A.: In "Vertinary toxicology, general part", Elsevier Scientific Publ. Co., N.Y., (1981)
 3. Virendra, M., Vinoid, K. and Viswanathan, P. N.: Arch. Environ. Contamin. Toxicol., 21 : 514(1991)
 4. Narendra, N. S. and Anil, K. S.: Pestic. Biochem. and Physiol., 15 : 257(1981)
 5. Lay, M. M. and Menn, J. J.: Pestic. Biochem. and Physiol., 28 : 149(1987)
 6. Yang, K. R., Shim, J. H. and Suh, Y. T.: Korean J. Agric. Chem., 35 : 367(1992)
 7. Van Asperen, K.: J. Insect Physiol., 8 : 401(1962)
 8. Habig, W. H., Pabist, M. J. and Jacoby, W. B.: J. Biol. Chem., 249 : 7130(1987)
 9. Lowry, O. H. and Rosebrough, N. J.: J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)
 10. Simonides, W. S., Zarrema, R. and Vander Laarse, W. J.: Anal. Biochem., 169 : 268(1988)
 11. Wood, E. J. and De Villar, M. I. P.: Pestic. Biochem. Physiol., 26 : 170(1986)
 12. Fukami, J.: Phar. Exp. Ther., 10 : 473(1980)
 13. Ding, V. D. H. and Pickett, C. B.: Arch. Biochem. Biophys., 240 : 553(1985)
 14. Terriere, L. C. and Rose, H. A.: Pestic. Biochem. Physiol., 13 : 274(1980)
 15. Dragomikescu, A., Raileanu, L. and Ababe, L.: Water Res., 9 : 397(1979)

Synergistic effects of pesticides on detoxifying enzyme activity of carp(*Cyprinus carpio* L.)

In-Seon Kim, Kang-Bong Lee, Jae-Han Shim and Yong-Tack Suh(Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Kwangju 550-757, Korea)

Abstract : This study was performed to investigate detoxifying enzyme activities of carboxylesterase(CE), glutathione S-transferase(GST) and lactate dehydrogenase(LDH) at variable toxicity levels in fresh water fish, carp(*Cyprinus carpio* L.). The carp was exposed to single and combined pesticides of IBP, isoprothiolane and cartap for 48 hr at sublethal doses, LC₁₀ and LC₂₆. The detoxifying enzyme activities were assayed for the liver, head and gut of the carp. The enzyme activities we discovered were as follows: Both activities of CE and GST were increased at the sublethal doses but were declined by increasing doses. In the gut, we found that the CE activity had high levels in the treatment groups of isoprothiolane+IBP and isoprothiolane+cartap. In the head, the CE activity had high levels in the treatment groups of cartap, IBP and isoprothiolane. However, the GST activities were inconsistent in the head and gut of the fish. Also, the GST activity was declined by increasing protein contents. The highest LDH activity was shown in the isoprothiolane treated fish, while the lowest activity was observed in the isoprothiolane+cartap treatment.