

연안 조류에서 Cd와 Zn 독성의 반대 작용 분석

이 봉 현* · 김 정 호** · 정 성 옥 · 김 성 미*** · 박 흥 재
*부산대학교 화학과 · **경산대학교 환경학부 · ***마산대 임상병리과 · 인제대학교 환경시스템학부
(2002년 9월 12일 접수; 2002년 10월 19일 채택)

Analysis of Opposite Interaction between Cd and Zn Toxicity in Coastal Algae

Bong-Hun Lee*, Jung-Ho Kim**, Seong-Ug Jeong, Seong-Mi Kim*** and Heung-Jai Park

*Department of Chemistry, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

**Department of Environmental Science, Kyungsan University, Kyungsan 712-715, Korea

***Department of Clinical Pathology, Masan College, Masan 100, Korea

School of Environmental Science and Engineering, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

(Manuscript received 12 September, 2002; accepted 19 October, 2002)

The growth and heavy metal experiments revealed opposite interactions between toxic metals(Zn and Cd) and Mn when the coastal diatom *T. pseudonana* were used. Cd and Zn inhibited the algal growth rate only at low Mn ion concentrations and this effect could be accounted for an inhibition of cellular Mn take by the toxic metals. Mn and Zn inhibited cellular Cd take and this indicated a reciprocal effects among the metals with respect to metal take. Saturation kinetics modeling of the take data was consistent with two metals competing with each other for binding to the Mn take system and with both Cd and Mn being transported into the cell by that system. Mathematical modeling of Mn and Cd take data revealed evidence for a Cd efflux system.

Key words : Mn, Cd, Zn, Opposite interactions, Coastal diatom

1. 서 론

구리, 아연 및 카드뮴의 고농도 현상은 해양의 식물성 플랑크톤에 유독하다.¹⁾ 반면에 망간은 광합성할 때 물의 산화와 superoxide radical의 해독에 필수적인 영양분이다.²⁾ 이전의 실험들은 조류에 대한 구리의 독성이 세포성 망간의 저해와 같은 망간 영양화의 반대 현상과 관련 있다. 망간의 구리 저해에 대한 정확한 메커니즘이 알려져 있지 않지만 그것은 막 흡착 부위나 망간 항상성에 관계되는 내부 부위에 대한 결합에 있어서 구리와 망간이 경쟁하는 것에 의한 것 같다.^{3,4)} Cd와 Zn을 포함하는 다른 중금속들 또한 망간 영양화와 반대된다는 증거가 존재한다. 예를 들면 식물성 플랑크톤에의 Zn의 독성이 Mn 첨가에 의해 감소된다.⁵⁾ 또한 Cd는

Mn 흡착을 경쟁적으로 억제하며 Mn 포획 system에 의해 세포로 수송되게 한다. 그러나 Mn 영양화나 Cd 독성에 미치는 이러한 경쟁의 영향은 조사되어 있지 않다. 이에 본 연구에서는 *T. pseudonana*의 배양 실험을 실시하여 영양분 금속 Mn과 함께 Cd와 Zn의 반대적 상호작용을 알아보려 한다. 정류 상태에서 세포 포획 속도와 Mn과 Cd의 농도에 미치는 이들 상호작용과 그 결과 성장 속도에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 이외에도 Mn과 Cd 포획 실험을 실시하여 Mn과 Cd 포획 속도에 미치는 독성 금속과 Mn의 상호작용의 메커니즘적 영향에 대하여 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

연안 조류 *T. pseudonana*로 실험을 수행하였고 실험할 때 까지 멸균 기술을 이용하여 f/8 배지에서 배양하였다. 금속 포획, 성장 실험 및 속도론 실험

Corresponding Author : Bong-Hun Lee, Department of Chemistry, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Phone : +82-51-331-4017
E-mail : bh3266@hanmail.net

힘은 이전의 Mn, Zn, Co 및 Fe의 실험에서 사용하였던 것과 비슷한 방법으로 수행하였다.⁶⁾ 36% 해수 배지 250mL를 포함하는 450mL polycarbonate 병에 20°C, pH 8.2에서 세포를 성장시켰다. 미량 금속 이온 buffer를 포함하는 자연 해수에서 실험을 실시하였다. 실험 해수는 수영만에서 peristaltic pump로 채수하여 사용 전까지 어두운 곳에서 보관하였다. 해수를 0.4 μm pore의 filter에 통과시킨 후 32 μM NaNO₃, 2 μM Na₂HPO₄, 40 μM Na₂SiO₃, 10nM Na₂SeO₄, 0.1 μg liter⁻¹ thiamine을 가하여 배지를 만들었다.

2.2. 조류 성장과 포획 실험

EDTA buffer에서 성장 실험을 실시하였다. 실험을 시작하기 위하여 f/8 배지에서 실험 배지로 세포를 옮겨 금속의 최저 실험 농도를 실제 실험에서 변화시켰다. 세포를 4~7일 동안 배양한 후 배지 liter당 0.1~0.2 μmol cell의 양으로 배지에 접종하였다. 조류를 성장 지수상 말까지 12~13세대 성장시켰다. 이 시간 동안 전체 세포 수는 Coulter counter로 측정하였다. 지수 성장기 동안 세포 부피 대 시간의 함수로 성장 속도를 컴퓨터로 계산하였다. Mn과 Cd의 세포 농도를 접종 후 9~10 세대 세포 분열된 지수적인 성장기의 배양액으로 측정하였다.⁷⁾ 세포를 1~3 μm pore의 filter로 분리하고 두 번째 set의 filter에 통과시켜 blank를 만들었다. 실험군과 대조군을 해수로 세척한 다음 분광기로 Mn과 Cd 방출을 측정하였다. 세포 분율에 전체 금속 농도를 곱한 다음 전체 세포 부피로 나누어 세포 금속 농도를 얻었다(단위는 liter cell vol⁻¹). 이를 세포 C:vol 비(14mol liter⁻¹)로 나누어 molar metal:C 비로 변환시켰다. 이 값에 성장 속도를 곱하여 정류 상태의 Mn과 Cd 포획 속도(mol(molC)⁻¹d⁻¹)를 계산하였다.

2.3. 금속 포획 속도 실험

Mn과 Cd 속도론 사이의 관계를 알아내기 위하여 Mn과 Cd의 포획 속도에 미치는 Cd와 Mn 이온의 농도 증가의 영향을 조사하였다. 무독성에서 아주 저해적인 범위까지의 Cd와 Zn 이온 농도에서 5회 실험하였다. 저농도에서 중간 정도의 Zn과 Cd 이온 농도에서 행한 실험에서 Mn 이온의 농도는 10^{-8.5}M로 유지하였다. 아주 저해적인 [Cd²⁺] (10^{-8.0}M)과 [Zn²⁺] (10^{-7.2}M)에서 행한 마지막 두 실험에서 세포들을 적절한 조류 성장을 확증하기 위해 고농도의 [Mn²⁺] (10^{-8.0}M)에 노출시켰다. 속성을 위해서 세포를 EDTA-금속 이온 buffer 배지에서 6~10세대 동안 성장시켰다. 세포를 3 μm pore의

Nuclepore filter로 여과하고 10^{-8.5}M [Mn²⁺]의 포획 배지로 세척한 후 10^{-8.5}~10^{-6.5}M 범위의 [Mn²⁺] 포획 배지에 재현탁하였다. 포획 배지는 숙성 배지로 Zn, Cd, Co와 Cu 이온의 0.5mM NTA buffer system과 Mn, Cd를 포함한다. 세포를 4시간에 걸쳐 Nuclepore filter에 통과시키고 해수로 세척함으로써 시간에 따라 Mn과 Cd의 포획을 측정하였다. 이 시간 동안 포획 배양에서 전체 세포 부피는 Coulter counter로 측정하였다. 각 시료 채취 시간에서의 세포에 의한 Mn과 Cd 포획 농도는 금속 포획 실험에서와 같은 방법으로 측정하였다.

2.4. 배지의 금속 이온 조성

EDTA(또는 NTA)와 무기 이온에 의한 금속 착체 정도와 전체 금속 농도로부터 실험 배지에서의 Zn, Co, Cd, Mn 및 Cu의 이온 농도를 계산하였다. 첨가한 금속염의 농도, 해수에서의 평가 농도, stock solution으로 첨가한 금속의 측정 농도로 전체 금속 농도를 계산하였다. Blank의 Zn, Co, Cd 및 Mn 농도는 0.9, 0.1, 0.1 및 2nM이었다. 여러 가지 stock solution에서 금속의 농도는 원자 흡수 분광기로 분석하였다. 금속 착체 정도는 EDTA 및 NTA-금속 이온 buffer에서의 조류 연구에서와 같은 평형 계산으로 결정하였다. Chelation 정도를 감소시키고 그에 따라 세포에 의한 Mn과 Cd의 분율을 증가시킴으로써 포획 배지에서의 금속 이온의 농도를 측정하는 데 EDTA보다는 NTA를 사용하였다.⁶⁾

3. 결과 및 고찰

3.1. 성장 실험 결과

초기 실험에서 Zn, Mn 그리고 Cd와 Mn 이온 농도를 체계적으로 변화시켰다. 이들 실험에서 [Mn²⁺]는 10^{-9.5}M에서 10^{-7.0}M로 하였다. 이 실험 결과 두 독성 금속과 Mn 사이에는 확실히 반대 관계가 나타났다(Fig. 1). 가장 높은 [Mn²⁺] (10^{-7.0}M)에서 Zn 또는 Cd에 의한 성장 속도 저해는 관찰되지 않았다. 그러나 [Mn²⁺]가 성장 제한값까지 내려감에 따라 두 금속에 의한 억제는 증가하였다. Zn 또는 Cd 억제가 없을 경우에 성장 속도는 10^{-8.0}M 이하의 [Mn²⁺]에서 Mn에 의해 제한받았다. 무독성과 유독성 [Cd²⁺]에서 행한 Cd-Mn 실험에서 Cd는 낮은 값의 [Mn²⁺]에서만 성장 속도를 억제하였다(Fig. 2). 이러한 억제는 세포성 Mn 포획의 억제와 Mn 결핍 세포의 생성으로 설명할 수 있다. 세포성 Cd는 Mn 이온 농도가 증가함에 따라 감소하였는데 특히, 낮은 Cd 이온 농도에서 Mn 이온 농도가 10^{-9.5}에서 10^{-6.0}M로 증가하였을 때 80배 감소되었

연안 조류에서 Cd와 Zn 독성의 반대 작용 분석

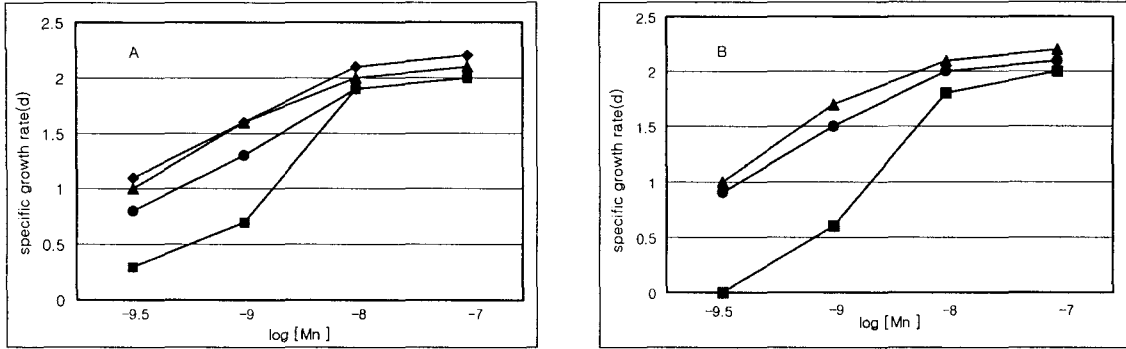


Fig. 1. Specific growth rate as functions of $\log[Mn^{2+}]$ (A) at $[Zn^{2+}]$ values of 10^{-10} (\blacktriangle), 10^{-9} (\blacklozenge), 10^{-8} (\bullet), $10^{-7.5}M$ (\blacksquare) and (B) at $[Cd^{2+}]$ values of 10^{-13} (\blacktriangle), 10^{-10} (\bullet), $10^{-8.5}M$ (\blacksquare).

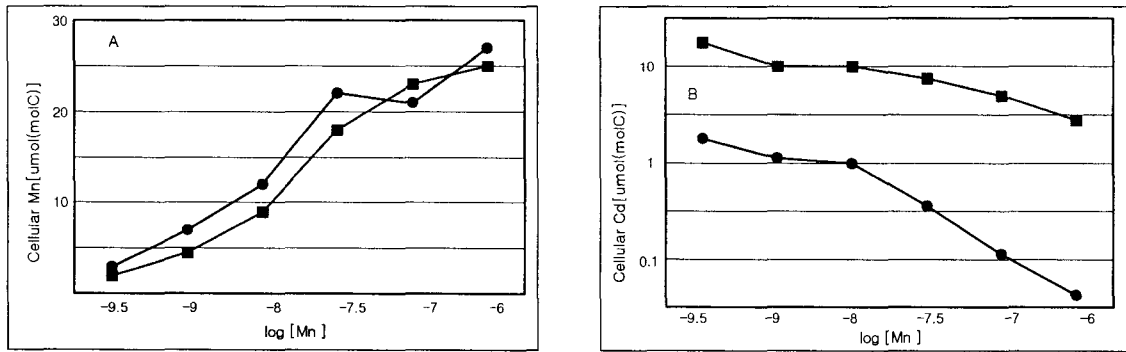


Fig. 2. (A) Cellular Mn and (B) cellular Cd as functions of $\log[Mn^{2+}]$ at $[Cd^{2+}]$ values of 10^{-10} (\bullet) and $10^{-8.5}M$ (\blacksquare).

다. 다른 경향이 높은 Cd 이온 농도에서 관찰되었는데 이때 세포성 Cd 농도는 Mn 이온 농도가 $10^{7.5}M$ 까지는 거의 일정하였고 그 이상에서 Cd 성장 저해가 관찰되었다. Mn 이온 농도가 $10^{7.5}$ 에서 10^6M 까지 증가하였을 때 세포 Cd 농도는 3배 감소하였다.

3.2. 포획 실험 결과

Zn과 Cd에 의한 Mn 포획의 억제 는 무독성에서 저해적 수준까지의 Zn과 Cd 이온에서 숙성시킨 세포로 포획 실험을 수행하였다. 이들 실험에서 세포는 낮은 $[Mn^{2+}]$ ($10^{8.5}$ 에서 $10^{8.0}M$ 까지)에서 성장시켰고 Mn과 Cd로 된 배지로 옮겼다. $[Mn^{2+}]$ 에 대한 초기 Mn 포획 속도를 plot하면 고전적인 경쟁적 포화 상태의 포획 모델에 맞아 떨어진다(Fig. 3). 이 결과는 증가된 Zn과 Cd 이온 농도에서의 Mn 포획 속도 억제의 대부분은 V_{max} Mn의 감소 때문이고 일부분은 포획 부분에서의 결합에 대한 금속간의 직접적 경쟁에 연유한다는 것을 나타내준다. 예를 들면 최고 농도의 실험적 $[Zn^{2+}]$ ($10^{7.5}M$)와 $[Cd^{2+}]$ ($10^{8.0}M$)은 최저 $[Mn^{2+}]$ 에서 Mn 포획 속도

를 15~28배 감소시켰다. 포획 배지에서 Mn 이온 농도를 증가시켰을 때 세포 Cd 포획 속도가 억제되었다. 저 및 고농도의 Cd 이온에서 Cd 포획 속도에는 현저한 차이가 있다. 저농도의 Cd 이온($10^{12}M$)에서 0.1~0.2시간 동안의 Cd 포획 속도는 Mn을 수송하는 같은 부위에 의한 Cd 포획에 대한 경쟁적 포화식에 적합하다(Fig. 4). Cd 포획 자료를 맞추는데 있어서 같은 금속 이온 결합 상수와 Mn 수송에 대한 Mn 포획으로부터 얻은 V_{max} 값을 사용하였다. 그래서 Mn 포획 속도의 Zn과 Cd 억제와 Cd 포획 속도의 Mn과 Zn 억제를 모델화하는데 동일한 결합 상수와 V_{max} 값을 사용할 수 있다. 이러한 발견은 Mn 포획 체계에 결합하는데 있어서 Mn, Cd 및 Zn이 서로 경쟁하며 Cd와 Mn이 그 system에 의해 포획된다는 가설을 지지해준다. Zn도 그 체계에 의하여 수송될 지 모른다.

3.3. 고찰

본 연구에서 밝힌 *T. pseudonana*의 성장 속도에 대한 Zn과 Cd의 반대적 상호작용과 Mn의 한계성은 그전의 같은 종에 대한 Cu와 Mn의 작용과 비

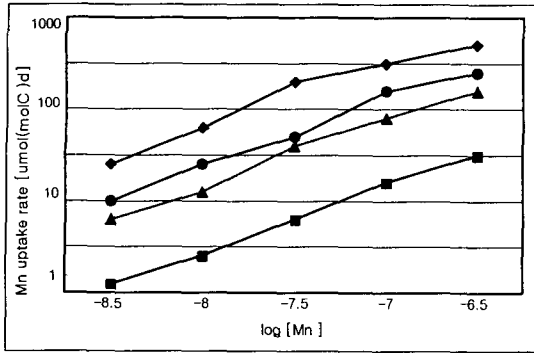


Fig. 3. Initial Mn uptake rates as functions of $\log[Mn^{2+}]$ at $[Zn^{2+}]=10^{-10}M$ and $[Cd^{2+}]=10^{-12}M$ (◆), $[Zn^{2+}]=10^{-7.5}M$ (▲), $[Cd^{2+}]=[Zn^{2+}]=10^{-8.5}M$ (●), and $[Cd^{2+}]=10^{-8.0}M$ (■).

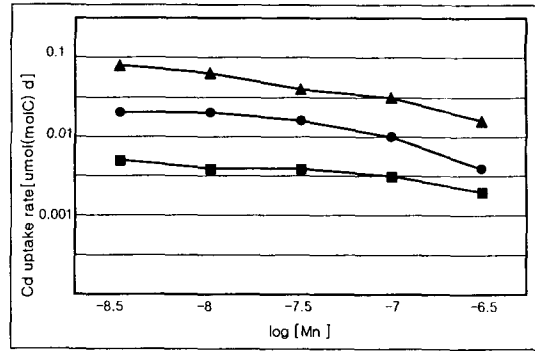


Fig. 4. Initial rates of Cd uptake as functions of $\log[Mn^{2+}]$ in uptake media for cells acclimated at $[Zn^{2+}]$ values of 10^{-10} (▲), 10^{-8} (●), and $10^{-7}M$ (■).

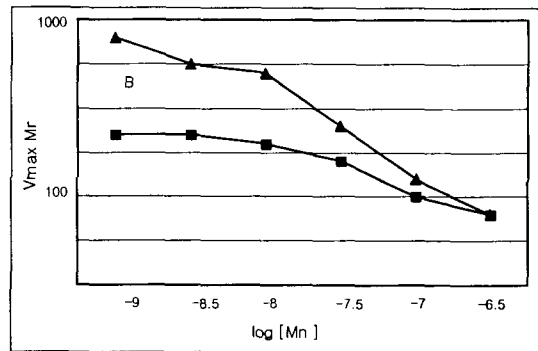
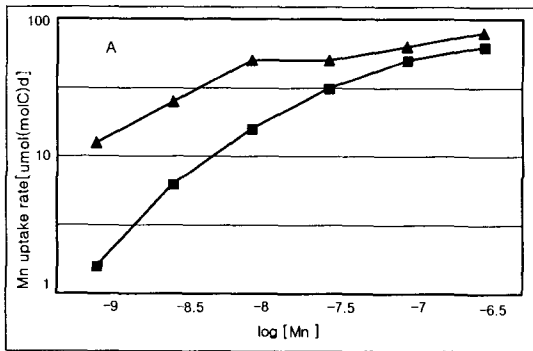


Fig. 5. Steady-state Mn uptake rate and V_{max} for Mn as functions of $\log[Mn^{2+}]$ at $[Cd^{2+}]$ values of 10^{-10} (▲) and $10^{-8}M$ (■).

숫하다.³⁾ 세 금속(Zn, Cd 및 Cu)에 대한 독성은 Mn 포획 억제와 Mn 결핍 세포 생성과 관련있다. 그래서 독성 금속에 의한 성장 속도의 억제를 이해하기 위해서는 세포성 Mn 포획과 이들 금속의 포획의 영향을 조절하는 메커니즘을 알아야 한다.

이번 연구에서와 같이 Mn 포획 속도를 포화 속도론 방정식에 맞춘다는 것은 막 수송 체계에 의하여 Mn이 세포로 포획된다는 것을 나타내준다. 본 연구 결과들은 Cd, Zn 및 Mn이 Mn 포획 체계에 결합할 때 서로 경쟁한다는 것을 의미한다. Cd와 Mn 결합에 대한 친화도 상수는 $10^{8.1}$ 과 $10^{7.5}M^{-1}$ 로 Mn에 대한 상수보다 10~25배 더 크다. 이것은 Mn 포획 체계가 Mn 보다는 Cd와 Zn에 더 강하게 결합한다는 것을 의미하므로 흥미롭다. 이러한 모순된 결과가 나온 이유는 아마도 Zn과 Cd의 반응성에 비교해볼 때 유기 리간드에 대한 Mn의 반응성이 적기 때문인 것 같다.⁸⁾ 중금속 저해가 없는 경우 *T. pseudonana*에서 정류 상태의 Mn 포획 속

도사이의 관계는 이전의 결과와 거의 일치한다(Fig. 5). $10^{9.0} \sim 10^{6.5}M$ 의 Mn 이온 농도에서 세포는 일정한 세포성 Mn과 Mn 포획 속도를 유지하며 낮은 Mn 이온 농도에서 속도는 Mn 이온 농도에 비례하여 감소한다. 포획과 세포성 Mn 농도를 일정하게 유지하기 위하여 Mn 이온 농도가 감소함에 따라 V_{max} 가 증가된다. 수송에 대한 그와 같은 negative feedback 조절은 세포가 일정한 포획 속도를 가지고 다양한 영양분 이용면에서 필수적인 일정한 세포 농도를 유지하는 대표적인 방법이다.

포획 site에의 Mn 결합을 방해하는 것뿐만 아니라 좀더 중요한 Mn 수송의 negative feedback 조절에 대한 세포의 능력을 간접함으로써 Cd와 Zn은 Mn 포획을 저해한다. 예를 들어 Mn 포획능을 조절하는 세포내 feedback site에 결합할 때 세포내 Cd와 Zn이 Mn과 경쟁하면 이러한 간섭이 생길 수 있다. 대표적인 negative feedback 조절하에서 그와 같은 control site에의 Mn 또는 Mn 착체의 결합은

활성 막 수송 site 수를 감소시킴으로써 V_{max} 를 억제하며 Mn의 해리는 그 site를 억제시켜 포획 체계의 용량을 증가시킨다. 다른 생물학적 결합 site들과 같이 조절 site들은 단일 금속에 대하여 전적으로 특이적일 수는 없다. Cd 또는 Zn과 같은 화학적으로 비슷한 경쟁 금속들이 그 site에 결합하여 억제한다면 그것은 Mn 이온 농도가 감소함에 따라 Mn 포획 능력에 있어서 negative feedback 증가를 방해할 것이다. Zn과 Cd가 세포성 Mn 포획을 억제할 뿐만 아니라 Mn과 Zn도 Cd 포획을 억제한다. Mn-Cd 포획 체계의 용량은 높은 세포성 Cd 준위에 의해 감소하며 Mn에 대한 것과 유사한 Cd 수송에 대한 negative feedback을 구성한다. 일반적으로 Mn 포획 체계는 화학적으로 비슷한 금속들(Mn, Cd와 Zn, Cu)에 결합하여 수송하는 것 같고 이런 종류의 금속들에 의해 negative feedback 조절에 있게 된다. 그래서 모든 금속의 세포성 조절은 연결되어 있고 다른 것들에 미치는 영향 없이 어떤 금속만을 조절하는 것은 불가능해진다.

속도론 실험에서 Mn과 Cd 포획 속도의 잠시동안의 변화는 세포로부터의 Cd 유출과 일치한다. 세포를 성장 배지에서 같은 금속 이온 조성을 가지는 포획 배지로 옮겼을 때 Mn 이온 농도값과 $10^{-12}M$ 에서의 Cd 속도에서의 Mn 포획 속도는 0.1~4 시간 동안 일정한데 이는 세포내 금속의 유출 없이 세포가 그들의 금속 이온 환경에 순응하는 것으로 생각된다. 고농도의 Cd 이온 농도에서 수행한 실험에서 모든 Mn 이온 처리시 시간에 따라 관찰된 Cd 포획 속도는 감소하였다. 물론 이때 Mn 포획 속도는 일정하다. 이것은 Cd 유출이 있을 때 예상되는 양식이다. 그러나 시간에 따라 세포가 축적될 때 Cd 유출 속도는 점진적으로 증가할 것이다. 즉, 결과적으로 정류 상태쪽으로 갈수록 순 포획 속도는 감소할 것이다. 낮은 Mn 이온 농도에서 숙성시킨 세포를 높은 Mn 농도의 포획 배지에 옮겼을 때 Mn과 Cd 포획 속도에서 시간 의존성 감소가 생기며 최저 농도의 Cd와 Zn에서 숙성시킨 세포에서 최대 효과가 나타난다. 이러한 시간 의존성 변화는 세포가 그들의 새로운 고농도의 Mn 환경에 순응하기 위해 생기는 수송 체계중의 V_{max} 에서 negative feedback 변화에 기인한다.

4. 결 론

본 연구 결과는 저농도의 Mn 이온에서 Cd 및 Zn의 독성은 필수적으로 Mn의 포획과 대사 작용에 연관된다는 것을 나타내준다. 이러한 연결은 첫째, Mn 포획 능력에 대한 세포내 feedback 조절을

간접하고 막 포획 부위에서의 Mn 결합을 경쟁적으로 방해함으로써 독성 금속들은 Mn 포획을 저해한다. 둘째, Cd와 같은 독성 금속들이 Mn 포획 체계를 점유하여 세포로 수송되어 저농도의 Mn 이온에서 포획 능력에 있어서 negative feedback 증가와 포획 site에서의 결합에 대한 Mn 경쟁력이 저하되는 효과가 있다. 이들 두가지 효과는 저농도의 Mn 이온에서 높은 세포내 Cd:Mn 비율을 초래하며 이것은 나아가 Mn 영양 site에서의 Cd의 경쟁적 결합에 기인한 Mn 제한을 악화시킨다. 그와 같은 문제를 완화시키기 위하여 세포는 Cd와 sulfhydryl ligand에 결합하는 금속을 포함하는 다른 중금속들에 의한 독성화로부터 보호하고 세포로부터의 금속을 유출시키는 세포성 메커니즘을 발전시켜 왔다. 해독 메커니즘이 특히 효과적인 경우에 독성 금속의 주된 유해성은 Mn 포획 저해와 Mn 결핍 세포의 생성과 관련있을 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Brand, L. E., W. G. Sunda, and R. L. Guillard, 1986, Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 96, 225-250.
- 2) Burnell, J. N., 1988, The biochemistry of manganese in plants, R. G. Graham, et. al., Manganese in soils and plants, Kluwer, 125-137pp.
- 3) Sunda, W. G. and S. A. Huntsman, 1983, Effect of competitive interactions between manganese and copper on cellular manganese and growth in estuarine and oceanic species of the diatom *Thalassiosira*, Limnol. Oceanogr., 28, 924-934.
- 4) Sunda, W. G., 1988, Trace metal interactions with marine phytoplankton, Biol. Oceanogr., 6, 411-442.
- 5) Sunda, W. G., 1987, Neritic-oceanic trends in trace-metal toxicity to phytoplankton communities, J. M. Capuzzo and D. R. Rester, Oceanic processes in marine pollution, V. I. Krieger, 19-22pp.
- 6) Sunda, W. G. and S. A. Huntsman, 1992, Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater, Limnol. Oceanogr., 37, 25-40.
- 7) Sunda, W. G. and S. A. Huntsman, 1995, Cobalt and zinc interreplacement in marine

이 봉 현 · 김 정 호 · 정 성 욱 · 김 성 미 · 박 흥 재

phytoplankton, Biological and geochemical implications, *Limnol. Oceanogr.*, 40, 1404-1417.

biological chemistry of the elements, Clarendon.

8) Da Silva, J. F. and R. P. Williams, 1991, The