

## Glucose-6-phosphate dehydrogenase를 이용한 *Moina macrocopa*의 중금속 독성 검정

박용석, 이상구, 이승진, 문성경, 최은주, 이기태\*

경희대학교 생물학과

## Heavy Metal Toxicity Test in *Moina macrocopa* with Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity

Yong-seok Park, Sang-goo Lee, Seung-jin Lee, Sung-kyung Moon,  
Eun-joo Choi and Ki-tae Rhie\*

Department of Biology, Kyung-Hee University

### ABSTRACT

A rapid, inexpensive enzymatic method is proposed for indirect water quality testing in terms of heavy metal toxicity. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase was applied for heavy metal toxicity test as an effective criterion in water quality.

The toxicity of Pb (lead) and Cd (cadmium) for water flea, *Moina macrocopa*, were evaluated for 2~8 days with variables of mobilization ability. And the reproduction impairment of *Moina macrocopa* were investigated as the parameter of chronic toxicity test for Pb and Cd. As a result, the EC<sub>50</sub> for immobilization of *Moina macrocopa* were Pb and Cd were 1.6749 and 0.4683, respectively. The values of reproductive impairment to *Moina macrocopa* for Pb and Cd were 9.5938 and 8.3264 in EC<sub>50</sub>.

A significant alteration of G6PDH (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) activity of *Moina macrocopa* was observed when Cd and Pb were treated in media. The results obtained indicate that G6PDH activity of *Moina macrocopa* can be used as an indicative parameter in aquatic toxicity tests for heavy metals.

**Key words** : Cd, Pb, toxicity, *Moina macrocopa*, glucose-6 phosphate dehydrogenase

### 서 론

생체의 다변적인 요인에 의한 중금속의 폐해를 이해하기에는 기기분석에 의한 물리 화학적인 지표표를 가지고는 부족하다. 따라서 생체에 대한 1차적 독성 및 축적독성 그리고 돌연변이 유발성 등

을 파악하는 생리적 접근방법이 필요하다. 현재 많은 국가에서 중금속 독성평가의 지표로 수계의 화학적 분석과 더불어 생물검정을 보완하여 사용하거나, 오히려 생물검정에 더 많은 가중치를 두기도 한다(Pandey, 2002).

수계 내 독성물질은 서로 상승적, 길항적, 상가작용을 보이므로, 단순한 화학적 분석만으로 수계의 독성을 측정하기에는 많은 어려움이 있다. 이러한 단점을 보완한 생물검정은 독성물질들에 대한 잠

\* To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-2-961-0603, E-mail: rhiekt@khu.ac.kr

재적인 독성을 측정할 수 있다. 특히 담수의 금속 독성 생물검정에는 미국 EPA에서 추천하고 있는 물벼룩인 *Daphnia magna*를 많이 사용하고 있는데, 수계 내에서의 물벼룩은 개체크기가 작고, 배양이 쉽고 생활사가 짧으며, 높은 번식력과 중금속에 대한 민감한 내성 등의 장점으로 인해 수계 내 중금속 독성을 연구하는 수중생물로 오랜 기간동안 이용되어져왔다(Leblanc, 1982) 그러나 *Daphnia magna* 종은 국내에서 생태학적 연구에서 기록된 바 있으나 분류학적으로는 검증되지 않아 국내에는 서식하지 않는 것으로 보고되어 있다(최, 2003). 단일종에 의한 독성검정에 있어서는 실험종의 서식지가 달라도 독성결과에는 크게 영향을 주지 않으나 Food Web과 관련되어진 하나의 수계를 대상으로 한 독성실험에 있어서는 그 지역에 서식하고 있는 종을 이용하는 것이 바람직 할 것이다.

본 연구에서는 중금속 노출과 관련하여 생체 내 방어기작과 관련된 효소의 활성도를 포함하여 생체인식지표를 찾기 위하여 우리나라 전역에 고루 서식하는 물벼룩인 *Moina macrocopa*를 이용하였다. 카드뮴, 납독성에 대해 *Moina macrocopa*의 민감도를 알아보기 위해 국제적인 표준 시험법인 OECD표준시험법에(1982)을 변형하여 급성유영저해실험과 번식저해실험을 수행하였다. 중금속인 납과 카드뮴에 의한 EC<sub>50</sub> 등 우리나라 고유종의 독성지표를 확인하고, 카드뮴과 납에 의하여 발생하는 세포내 활성산소에 대한 방어기작으로서 GSSG → GSH에 필요한 NADH를 생성하기 위한 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성도를 분석함으로써 우리나라 수계에서 효소의 활성도를 활용한 카드뮴과 납에 대한 생물검정을 평가하는데 방법과 기초자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### Culture

강릉대학교에서 1년이상 계대배양해 온 물벼룩(*Moina macrocopa*)을 받아 본 대학 실험실에서 미환경청 표준사육수(EPA medium; Anonymous, 1985)를 변형하여 조성한 인공담수에 한달 이상 순응하여 사용하였다(Table 1). 사육수의 pH는 8.0

**Table 1.** Composition of artificial fresh water for *Moina macrocopa* culture

Composition	Concentration (mg/l)
NaHCO <sub>3</sub>	192.0
CaSO <sub>4</sub>	120.0
MgSO <sub>4</sub>	120.0
KCl	8.0

그리고 사육실의 온도는 22±1°C를 유지하였고, 광도는 45 μmol photon · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>로 12시간 light, 12시간 dark의 조건을 유지하였다. 배양액을 주기적으로 교환하지 않으면 배설물이나 탈피한 표피가 축적되어 물벼룩에 악영향을 주거나 교배란이 발생되므로 48h마다 새로 교환해 주는 반 지수식을 사용하였고, 먹이는 사육수를 교환 할 때마다 *Chlorella vulgaris* 4 × 10<sup>6</sup> cells · ml<sup>-1</sup>를 사육수 1l 당 조류액 10ml로 공급하였다.

### Heavy Metal Toxicity Test

납(Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)과 카드뮴(CdCl<sub>2</sub>)은 ANAPEX (주)사에서 구입하여 농도별로 사육수로 희석하였다. 일반적으로 급성독성검정에서는 오염물질 노출시간을 24, 48, 96시간으로 구분하고 있는데, 본 실험 조건에서는 Cd와 Pb에 대한 EC<sub>50</sub>와 NOEC 및 glucose-6-phosphatase의 활성도 변화를 분석한 예비실험을 통하여 물벼룩에 대한 적정 오염물질 노출시간을 2, 4, 6, 8일로 정하였다(Bailieul, 1997). 대표적인 독성지표로서 치사농도 및 유영저해율 등을 적용하였다(Wim, 1997; Wiwattanapatapee, 2002).

유영저해검정(Immobilization Test)을 하기 위하여 Cd와 Pb는 각각 0, 0.01, 0.1 및 0.5 mg/l와 0, 0.1, 1, 2 mg/l의 농도구를 설정하였다. 납과 카드뮴은 농도구별로 3개씩 멸균된 100 ml 유리 비이커에 넣은 뒤 사육수 50 ml을 더하였다. 각 비이커에 5개체 씩의 물벼룩을 넣은 뒤 2, 4, 6, 8일이 지난 후 유영 저해수를 관찰하였다. 유영저해는 시험용기를 천천히 움직여(50 rpm) 15초간의 시간으로 판정하였다. 시험환경조건은 측정시에는 먹이를 제한하고 사육환경조건과 동일하게 유지시켜 주었으며, 시험의 전, 후에 시험액과 대조구의 pH를 측정하여 간섭요인으로서 중금속에 의한 pH변화를 검사하였다. 결과의 신뢰성을 위해 독성물질마다 3회 동일

시험을 실시하였으며, 그 평균치로서 결과를 나타내었다.

번식저해검정 (Reproduction Impairment Test)을 위하여 급성유영 저해시험의 EC<sub>50</sub> 값의 1/100농도를 최저농도로 하여, Cd는 5, 10 및 20 µg/l로, 납은 10, 100 및 200 µg/l로 조성한 100 ml 비이커에 배양액을 넣어준 뒤 생 후 24시간 이내의 어린 물벼룩을 각 비이커에 5개체씩 넣은 후, 12일부터 24일째까지의 비이커내 물벼룩의 생존 및 번식상태를 관찰하였다. 시간 경과에 따른 물벼룩의 번식저해율은 SGR (Specific Growth Rate)를 구하여 두 관측일에 확인된 물벼룩의 수를 12일 후 비교하였다 (SGR = lnN<sub>2</sub> - lnN<sub>1</sub> / T<sub>2</sub> - T<sub>1</sub> T: 시간, N: 물벼룩수). 배양액은 48시간마다 교환해 주었으며 먹이는 사육조건과 동일하게 공급하였다. 시험결과는 시험 시작일로부터 종료일까지 물벼룩의 개체수를 48시간마다 기록하였고 결과의 신뢰성을 위해 동일 실험을 3회 반복하여 그 평균치로서 분석결과를 산출하였다.

**Enzyme assay**

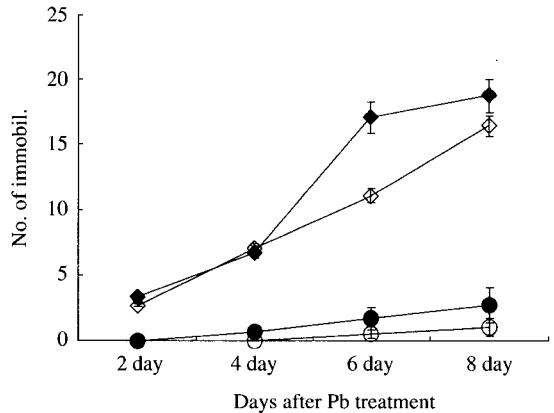
G6PDH (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, EC 1.1.1.49) 활성도는 Berg Meyer (1974)의 방법을 변형하여 사용하였다. 12시간, 24시간동안 납과 카드뮴에 노출시킨 물벼룩 0.5 g을 2 ml homogenization buffer (80 mM Tris, 6 mM EDTA, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl)에 넣은뒤 Teflon potter를 이용하여 균질화 한 후 11,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상등액 100 µl을 취하여 reaction mixture (50 mM 800 µl Tris-HCl pH 8.0, 7.4 mM 12 µl Glucose-6-phosphate, 0.07 mM 16 µl NADP, 7.4 mM 67 µl MgCl<sub>2</sub>)와 혼합한 후, 340 nm의 흡광도를 3회 반복 측정하였다. absorbance 값에 의한 활성도 환산은 다음과 같다.

$$\text{Units/mg} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{6.22 \times \text{mg protein/ml reaction}}$$

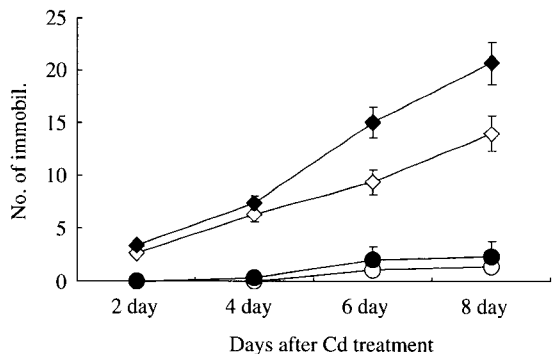
**결 과**

**1. 유영저해 검정 (Immobilization Test)**

납과 카드뮴에 노출된 *Moina macrocopa* 모두 중



**Fig. 1.** Changes in immobilized numbers of water flea, *Moina macrocopa*, for immobilization test with time courses under various concentrations of lead (Pb) treatment to media (○-0, ●-0.1, ◇-1.0, ◆-2.0 mg/l) Bars indicate S.D.



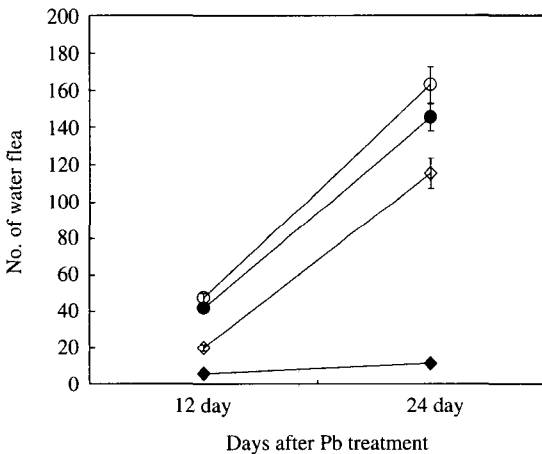
**Fig. 2.** Changes in immobilized numbers of water flea, *Moina macrocopa*, for immobilization test with time courses under various concentrations of Cadmium (Cd) treatment to media (○-0, ●-0.01, ◇-0.1, ◆-0.5 mg/l) Bars indicate S.D.

금속 농도가 높아질수록 유영저해율이 증가하였다 (Figs. 1 and 2). 납에 의한 6 day-EC<sub>50</sub>은 1.68 mg/l (95% confidence limit = 1.37-2.15 mg/l) 그리고 카드뮴에 의한 6 day-EC<sub>50</sub>은 0.28 mg/l (95% confidence limit = 0.19-0.43 mg/l)로 *M. macrocopa*의 유영저해에 대한 독성은 Pb 보다는 Cd에서 더 민감하게 산정되었으며 이 결과는 *Daphnia magna*를 대상으로 한 유사한 연구 (Warnick, 1969) 보고와 일치하였다.

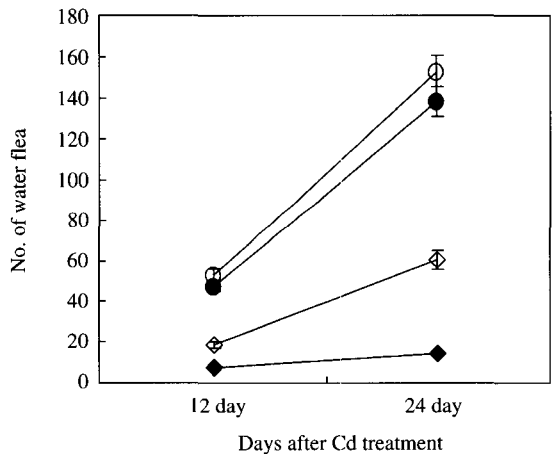
**2. 번식저해 검정  
(Reproduction Impairment Test)**

납에 노출된 후 농도별 평균개체수는 고도로 유의한 차이를 보여 (ANOVA, 12일 후  $F=123.35$ ,  $p<0.001$ ; 24일 후  $F=379.19$ ,  $p<0.001$ ), 납이 이들 번식저해에 미친 영향은 뚜렷하였다 (Fig. 3). 사후검정을 통하여 처리 후 12일의 평균 개체수에서 대조구 (47개체)와 10  $\mu\text{g/l}$  처리구 (42개체)간에는 유의한 차이를 보이지 않았으나 (Duncan's Multiple Range Test,  $\alpha=0.05$ ), 24일에는 유의한 차이를 보여 10  $\mu\text{g/l}$ 의 농도는 후기에 번식저해효과가 유의한 것으로 나타났다. 한편 납처리 12~24일간의 번식저해율 (specific reduction rate)도 유의한 차이를 보였는데 ( $F=16.9$ ,  $p<0.001$ ), 100  $\mu\text{g/l}$ 를 처리한 경

우 평균 0.15/day로 가장 높아, 초기의 영향이 크지 않았지만 후기에 들어 급속한 영향을 받은 것으로 판단된다. 카드뮴에 노출된 후 농도별 평균개체수는 고도로 유의한 차이를 보여 (ANOVA, 12일 후  $F=87.1$ ,  $p<0.001$ ; 24일 후  $F=185.49$ ,  $p<0.001$ ), 카드뮴이 이들 번식저해에 미친 영향은 뚜렷하였다 (Fig. 4). 그러나 사후검정을 통하여 처리 후 12일과 24일의 평균 개체수에서 대조구와 5  $\mu\text{g/l}$  처리구간에는 유의한 차이를 보이지 않아 납의 경우와는 차이를 보였으며 카드뮴처리 12~24일간의 번식저해율도 20  $\mu\text{g/l}$ 를 제외하고는 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 2). 납에 의한 24 day- $EC_{50}$ 은 9.59  $\mu\text{g/l}$  (95% 신뢰구간은 7.10~12.61  $\mu\text{g/l}$ ), 카드뮴에 의한 24 day- $EC_{50}$ 은 8.33  $\mu\text{g/l}$  (95% 신뢰구간



**Fig. 3.** Changes in individual numbers of water flea, *Moina macrocopa*, for reproduction impairment test with time courses under various concentrations of lead treatment to media (○-0, ●-10, ◇-100, ◆-200  $\mu\text{g/l}$ ) Bars indicate S.D



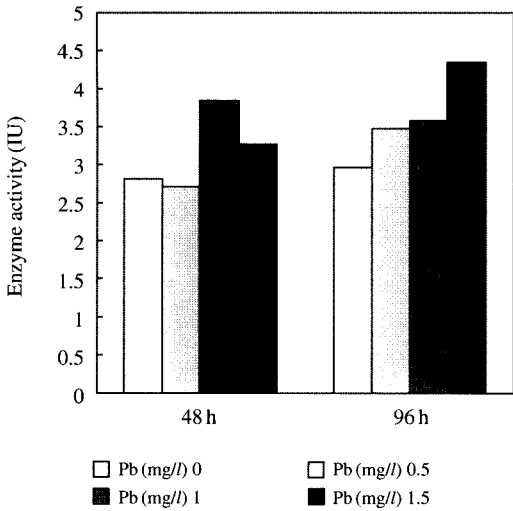
**Fig. 4.** Changes in individual numbers of water flea, *Moina macrocopa*, for reproduction impairment test with time courses under various concentrations of cadmium treatment to media (○-0, ●-1, ◇-10, ◆-20  $\mu\text{g/l}$ ) Bars indicate S.D

**Table 2.** Specific reduction rates obtained from 12 and 24d-Reproduction Impairment Tests of Pb, Cd metals for *Moina macrocopa*.

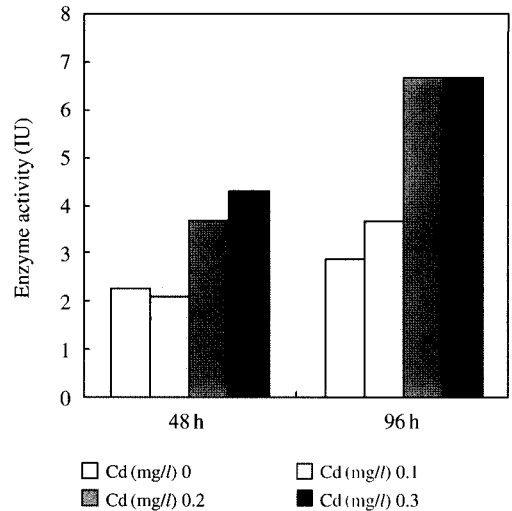
Pb ( $\mu\text{g/l}$ )	DAT <sup>1)</sup> 12	DAT24	Cd ( $\mu\text{g/l}$ )	DAT12	DAT24
0	3.85 ± 0.10	5.09 ± 0.02	0	3.97 ± 0.09	5.02 ± 0.07
10	3.74 ± 0.06	4.98 ± 0.05	5	3.84 ± 0.14	4.92 ± 0.05
100	3.00 ± 0.13*	4.74 ± 0.09	10	2.92 ± 0.08*	4.08 ± 0.19*
200	1.83 ± 0.19*	2.42 ± 0.13*	20	1.96 ± 0.31*	2.59 ± 0.11*

<sup>1)</sup>DAT=Days after metal treatment.

<sup>2)</sup>\* =  $p<0.05$



**Fig. 5.** Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of water flea, *Moina macrocopa* after 48 h and 96 h exposure of various concentrations of lead (Pb).



**Fig. 6.** Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of water flea, *Moina macrocopa* after 48 h and 96 h exposure of various concentrations of cadmium (Cd).

은 3.00~11.3 μg/l)이었다.

### 3. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) 활성도

중금속에 대한 생체내 지표로서 G6PDH는 ROS-dependant damage에 의한 pentose phosphate pathway 초기 단계에서 항산화효소의 환원력을 제공하는 효소로서 물벼룩을 이용한 독성실험의 중요한 지표가 되고 있다(De Coen, 2001). 납에 0.5 mg/l의 농도로 노출된 *Moina macrocopa*에서는 48시간 이내에서는 납을 처리하지 않은 대조구의 개체에 비교하여 G6PDH의 활성도가 증가되어(Fig. 5), 독성 방어기작에 민감히 반응하는 것으로 판단된다. 카드뮴에 노출된 개체에 대하여 48h후의 평균 G6PDH 활성도와 96 h 후의 활성도를 농도별로 비교한 경우 모두 유의한 차이를 보였으며, 0.3 mg/l의 농도에서 가장 큰 차이를 보였다. 한편 G6PDH의 평균 활성도는 노출한 납의 농도와 비례하여, 유영저해와 유사한 결과로 판단할 수 있다. 이 결과로부터 물벼룩이 흡수한 카드뮴에 대한 방어기작으로서 glutathione이 관여하며, 산화된 glutathione을 환원하기 위하여 G6PDH의 활성도가 높아졌음을 알 수 있다. 반면 0.2 mg/l의 카드뮴에 노출된 개체에

서는 48 h에는 납에 비교하여 상대적으로 민감한 반응을 보이지는 않았지만 오히려 96 h에는 0.3 mg/l의 고농도 경우와 같은 활성도를 보여 이 정도의 농도에서는 카드뮴에 대한 방어기작이 더욱 활발하다는 것을 알 수 있다(Fig. 6). G6PDH는 생체내 모든 세포에 존재하며, 이 효소의 가장 중요한 기능은 NADP로부터 NADPH로 재생성에 관여하여 산화된 glutathione을 환원형으로 전환시켜주므로 산화적 세포손상에 대한 방어를 가능케 해준다. 따라서 중금속을 포함한 활성산소종을 유발시키는 독성물질에 대한 지표로서 G6PDH의 활성도가 많이 이용된다(Michael Kaplan, 2002). 이와같은 결과로 중금속 해독기작 중 *M. macrocopa*가 납보다는 카드뮴에 의한 방어기작으로 glutathione의 환원력이 더 필요한 것으로 판단할 수 있다.

### 고찰

우리나라 수계에 널리 서식하고 있는 물벼룩인 *Moina macrocopa*를 이용하여, 독성실험을 수행하였다. 일반적으로 EC<sub>50</sub>은 24~48 h으로 산출되어지나, 본 실험에서는 생물농축실험의 기초자료를 위하여 EC<sub>50</sub>을 day로 나타내었다. 유영저해 검정

(Immobilization Test) 결과 납에 의한 6 day-EC<sub>50</sub>은 1.67 mg/l (95% confidence limit = 1.37~2.15 mg/l) 그리고 카드뮴에 의한 6 day-EC<sub>50</sub>은 0.28 mg/l (95% confidence limit=0.19~0.43 mg/l)로 *M. macrocopa*의 유영저해에 대한 독성은 Pb 보다는 Cd에서 더 민감하게 산정되었는데, 국내에서 *Daphnia magna*를 재료한 독성실험과도 일치 하였다(정재원, 2000). 한편 번식저해 검정 (Reproduction Impairment Test) 결과 납에 의한 24 day-EC<sub>50</sub>은 9.59 µg/l (95% 신뢰구간은 7.10~12.6 µg/l), 카드뮴에 의한 24 day-EC<sub>50</sub>은 8.34 µg/l (95% 신뢰구간은 3.00~11.3 µg/l)이었다. *M. macrocopa*에 납을 100 µg/l로 노출한 후 12~24일간 번식저해율(specific reduction rate)은, 12일에는 영향을 받지 않았지만 24일에 들어 유의한 영향을 받았다. 카드뮴에 노출된 경우 12일과 24일의 평균 개체수에서 대조구와 5 µg/l 처리구간에는 유의한 차이를 보이지 않아 납의 경우와는 차이를 보였으며 카드뮴처리 12~24일간의 번식저해율도 20 µg/l를 제외하고는 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 중금속에 민감한 생리 지표로서 Glucose-6-Phosphate dehydrogenase (G6PD)를 선택하여 효소 활성도를 측정하였다. 이 효소의 가장 중요한 기능은 NADP로부터 NADPH로 재생성에 관여하여 산화된 glutathione을 환원형으로 전환시켜주므로 산화적 세포손상에 대한 방어를 가능케 해준다(WHO Working Group. 1989). 납에 0.5mg/l의 농도로 노출된 *Moina macrocopa*에서는 48시간 이내에서는 납을 처리하지 않은 대조구의 개체에 비교하여 G6PDH의 활성도가 증가되어, 독성 방어기작에 민감히 반응하는 것으로 판단된다.

*Moina macrocopa*를 대상으로 한 본 실험과 마찬가지로 생물농축현상을 보다 안정적으로 연구를 하기 위하여 급성독성에 관한 결과도출의 기간은 8일정도 독성물질의 노출기간이 필요한 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

- 최성현. 배양조건에 따른 물벼룩의 개체생산 특성, Korean J. Limnol. 2003; 36(2): 208-214.
- 정재원. 물벼룩(*Daphnia magna*)을 이용한 중금속의 급성 및 만성 독성 시험에 관한 연구, 한국환경과학회 2000; 10(4): 293-298.
- Baillieul M. Analysis of the swimming velocity of cadmium-stressed *Daphnia magna*, Aquatic Toxicology, 1997; 44: 245-254.
- Bergmeyer HU. (Editor). Methods for determination of metabolites. In: *Methods in Enzymatic Analysis*. New York: Academic, pp. 1196, 1201, 1974,
- De Coen W.M. The Use of Biomarkers in *Daphnia magna* Toxicity Testing V. In Vivo Alterations in the Carbohydrate Metabolism of *Daphnia magna* Exposed to Sublethal Concentrations of Mercury and Lindane, Ecotoxicology and Environmental Safety 2001; 48: 223-234.
- Kaplan M and Hammerman C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a potential source of severe neonatal hyperbilirubinaemia and kernicterus, Semin Neonatol 2002; 7: 121-128.
- Leblanc GA. Laboratory investigation in to the development of resistance of *Daphnia magna* to environmental pollutants, Environ. Poll. A 1982; 27: 309-322.
- Michael Kaplan and Cathy Hammerman. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a potential source of severe neonatal hyperbilirubinaemia and kernicterus, Semin Neonatol 2002; 7: 121-128
- Pandey S. Biomarkers of oxidative stress : a comparative study of river Warnick, s. l., H.L. Bell., 1969, The Acute toxicity of some heavymetals to different species of aquatic insects, J. Water Poll. Contr. Fed. 2002; 41: 280-284.
- WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, Bulletin of The World Health Organization 1989; 67: 601-611.
- Wiwattanapatapee R. Water flea *Moina macrocopa* as a novel biocarrier, Yamuna fish Wallago attu, The Scice of the Total environment 2002; 309: 105-115.