

일부 중금속과 제초제에 대한 저서규조류 *Nitzschia* sp.의 광합성 반응

강은주¹ · 최태섭² · 김광용^{1*}

(¹전남대학교 해양학과, ²(주)네오엔비즈 환경안전연구소)

Photosynthetic Responses of the Benthic Diatom *Nitzschia* sp. to Selected Heavy Metals and Herbicides

Eun Ju Kang¹, Tae Seob Choi² and Kwang Young Kim^{1*}

¹Department of Oceanography, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Neoenbiz Co., Institute of Environmental Protection and Safety, Seoul 153-783, Korea

This study was conducted with using chlorophyll a fluorescence (indicated as photosynthetic activity) to examine the toxic effect of 96 h exposure of heavy metals and herbicides on the benthic diatom *Nitzschia* sp. which was isolated from pristine sediment in Pamquat Harbour, Nova Scotia, Canada. Samples of benthic diatom were exposed to 0, 0.01, 0.1 and 1 mg L⁻¹ of copper, 0, 1, 10 and 100 mg L⁻¹ of chrome (VI), 0, 2.45, 24.5 and 245 mg L⁻¹ of paraquat dichloride, and 0, 4.37, 43.7 and 437 mg L⁻¹ of alachlor during 96 hours. The effective quantum yield of photochemistry ($\Delta F/F_m'$) was evaluated by subjecting light acclimated samples to saturating pulses of light using a pulse amplitude modulated (PAM) fluorometer. The impact of heavy metals on *Nitzschia* sp. photosynthesis was not severe in < 1 mg L⁻¹ but in the high concentrations (> 1 mg L⁻¹) clearly increased toxic stress during 96 h. Herbicides had a limited impact during the exposure period but clearly increased stress on the benthic diatom with increasing concentrations. Acute response of *Nitzschia* sp. to selected heavy metals and herbicides was characterized, and the capacity of a benthic diatom to tolerate and recover from toxic stress was assessed.

Key Words: effective quantum yield, heavy metals, herbicides, *Nitzschia* sp. toxic stress

서 론

중금속이나 농약 같은 유해물질은 강, 해양운송, 대기 등 다양한 경로를 통해 해양으로 유입된다. 특히 연안해양은 강이나 해안도시, 공단으로부터 직접적으로 유입된 다양한 유해물질을 저장하기 때문에 이들 유해물질에 의한 광범위한 생물 독성영향에 대한 관심이 증가되고 있다. 연안해양에서 흔히 검출되는 유해물질은 수은, 납, 구리, 카드뮴 등과 같은 중금속을 비롯하여 난분해성 유기 화합물, 제초제, 유기 주석 화합물 등 매우 다양하다(Clark 2001). 구리나 아연 같은 생물체 내에 필수 요소인 것은 물론이고 대부분의 금속들은 자연에 미량으로 존재한다(Lyngby and Brix 1982; Lobban and Harrison 1997). 하지만 생체 필수 금속이라도 다른 미

량 금속과 같이 각각 일정 농도 이상에 노출이 되면 독성이 발현되는 것으로 알려져 있다(Rainbow *et al.* 1990).

제초제는 식물의 광합성 또는 생육과 관련된 기능을 저해하여 식물이 성장하지 못하고 결국 죽게 만드는 물질이다(Delorenzo *et al.* 2001). 육상환경에서 투여된 제초제는 결국 수중 생태계로 유입되어 예상하지 못한 수중 생태계의 기능적 특성 변화를 가져오게 된다. 또한 학문적 또는 산업적으로 별 관심이 없었던 해양생물에게도 광범위한 독성효과를 발휘하기 때문에 제초제 사용에 대한 관심이 더욱 커지고 있다(Van der Brink and Ter Braak 1999). Bipyridinium 계열의 제초제인 파라쿼트(Paraquat)는 결합형 페레독신과 NADP⁺ 사이의 전자전달을 가로막고, 산소분자를 환원시켜 슈퍼옥시드(superoxide, O₂⁻)를 형성한다(Iturbe-Ormaetxe *et al.* 1998). 이 슈퍼옥시드는 엽록체에서 다양한 분자와 비특이적으로 반응하는 자유라디칼이고, 엽록체 활성을 빨리 잃게 하며, 세포막의 지질분자에 특히 민감하게 작용한다

*Corresponding author (kykim@chonnam.ac.kr)

(Iturbe-Ormaetxe *et al.* 1998). 알라클로(Alachlor)는 옥수수, 감자, 콩 등을 경작할 때 많이 사용되는 제초제로서, 지방산(fatty acid)의 합성을 교란시켜 결과적으로 세포분열의 저해를 초래한다(Couderchet and Boger 1993). 또한 이들이 토양으로 유출되면 광분해와 미생물에 의한 분해가 진행되며 토양 중에서 6주 내지 10주 정도 잔류한다(Bahena and Martínez 2006). 일반적으로 제초제를 포함한 농약 종류가 연안해양에 유입되면 해조류와 해산현화식물의 생육에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또 다른 제초제인 디우론(Diuron)에 노출된 갈피(*Zostera marina* L.)의 경우 노출시간이 경과함에 따라 유효양자수율이 감소하는 것으로 보고되어 있다(Haynes *et al.* 2000). 한편 식물플랑크톤의 경우에는 제초제나 살충제에 노출되었을 때 탄소 동화율이나 산소 발생량, 성장율이 크게 감소 하는 것으로 알려져 있다(Delorenzo *et al.* 2001).

본 연구는 중금속이나 제초제에 노출된 경험이 없는 해양 저서규조류 *Nitzschia* sp.를 분리 배양하여 Cu, Cr(VI), Paraquat, Alachlor와 같은 유해물질에 대한 독성효과를 평가하였다. 독성효과는 엽록소 형광 분석을 통하여 유효양자수율의 변화로 구하였다.

재료 및 방법

연안퇴적물에서 중금속과 제초제가 전혀 검출된 기록이 없는 캐나다 동부 Nova Scotia Pamquet Harbour(45°39'27" N, 61°49'41" W)에서 2005년 9월 저서규조류 *Nitzschia* sp.를 조건대 퇴적물에서 분리했다. 분리한 *Nitzschia* sp.는 삼각 플라스크(125 ml) 배양병을 이용하여 여과(0.22 μm)하여 고온 고압에서 멸균한 30 psu 해수에 F/2 media와 Na₂SiO₃를 넣어 배양하였다. 배양 조건은 13°C, 25 μmol m⁻² s⁻¹, 24시간 명주기 하에서 회분배양(batch culture) 하였다.

저서규조류의 광합성에 대한 구리(Cu), 크롬(Cr(VI))과 제초제 파라쿼트(Paraquat), 알라클로(Alachlor)의 독성 영향을 알아보기 위해 96시간 동안 급성 독성실험을 수행하였다. 실험에 사용한 모든 기구는 10% 염산용액에 24시간 이상 담가 산세척(acid wash) 하였다. 구리 0, 0.01, 0.1, 1 mg L⁻¹, 크롬(VI) 0, 1, 10, 100 mg L⁻¹, 파라쿼트 0, 4.37, 43.7, 437 mg L⁻¹, 알라클로 0, 2.45, 24.5, 245 mg L⁻¹에서 실험하였다. *Nitzschia* sp.에 대한 96시간 독성 측정은 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96시간에 Phyto-PAM(Walz, Germany)을 이용하여 명순응(20 μmol m⁻² s⁻¹, light-acclimated) 상태의 시료에 포화광(saturation light)을 주어 양자수율(PS II quantum yield; φ_{psII}) 측정을 통해 이루어졌다. 광합성 명반응의 반응 중심 중 하나인 광계 II의 광화학적 에너지 전환의 양자수율(quantum yield)은 측정된 형광 값으로부터 다음과 같이

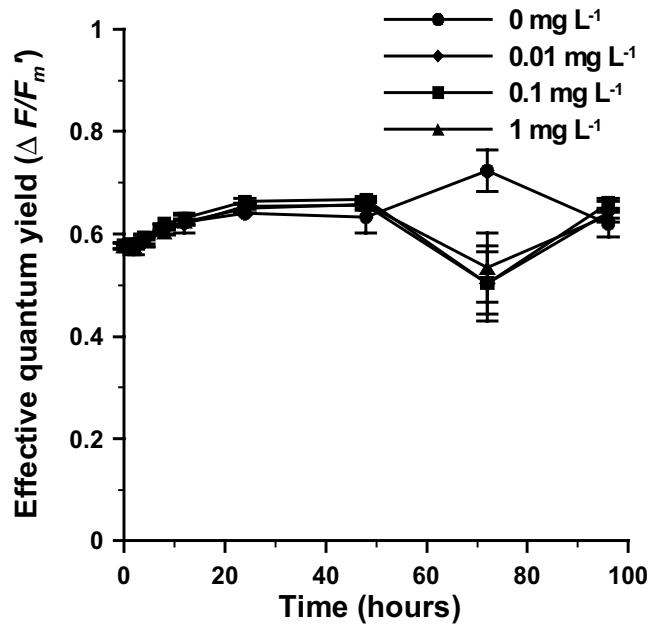


Fig. 1. Photosynthetic responses of effective quantum yield ($\Delta F/F_m'$) in *Nitzschia* sp. to exposure Cu. Error bars indicate a standard deviation of the mean (n = 3).

얻을 수 있다.

$$\phi_{psII} = (F_m' - F_t) / F_m' = \Delta F / F_m'$$

여기서 F_t 와 F_m' 각각은 광적응 하에서 정상상태의 형광(steady state fluorescence)과 포화광에 의해 유도된 최대형광(maximum fluorescence) 값이다.

결 과

96시간 동안 중금속과 제초제에 노출 시키면서 일정한 시간 간격으로 저서규조류 *Nitzschia* sp.의 유효양자수율($\Delta F/F_m'$)을 측정하였다. 오염되지 않은 해수(대조구)에서 자란 저서규조류의 유효양자수율은 측정초기(T = 0 hr)에 0.577(± 0.006)이었고 시간이 지남에 따라 점점 증가하다가 72시간 쯤 0.723(± 0.040)으로 최대값을 보였다.

구리의 경우 농도가 1 mg L⁻¹까지 높아져도 노출 시간에 따른 변화가 나타나지 않았고, 농도 간의 뚜렷한 차이도 보이지 않았다(Fig. 1). 구리는 0.01, 0.1, 1 mg L⁻¹ 세 농도 모두 점점 양자수율이 증가를 하다가 72시간 쯤 양자수율이 0.5 정도로 나타났고, 96시간 쯤 측정 시 유효양자수율은 다시 증가하여 0.64 정도로 나타났다. 크롬(VI)의 경우 농도 증가와 노출시간이 지남에 따라 유효양자수율이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 특히 100 mg L⁻¹에서 2시간 이내에 양자수율이 급격히 감소하는 반응이 나타났으며, 12시간 이내에 유효양자수율이 0.187(± 0.023)까지 감소하였으며, 48

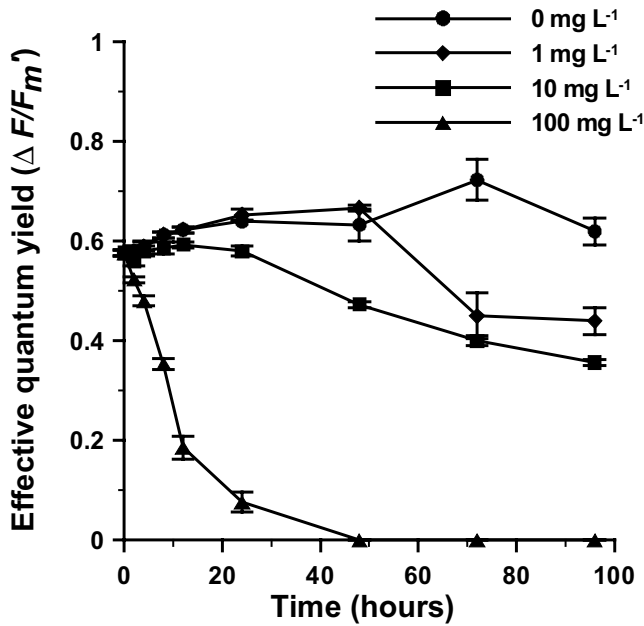


Fig. 2. Photosynthetic responses of effective quantum yield ($\Delta F/F_m'$) in *Nitzschia* sp. to exposure Cr (VI). Error bars indicate a standard deviation of the mean (n = 3).

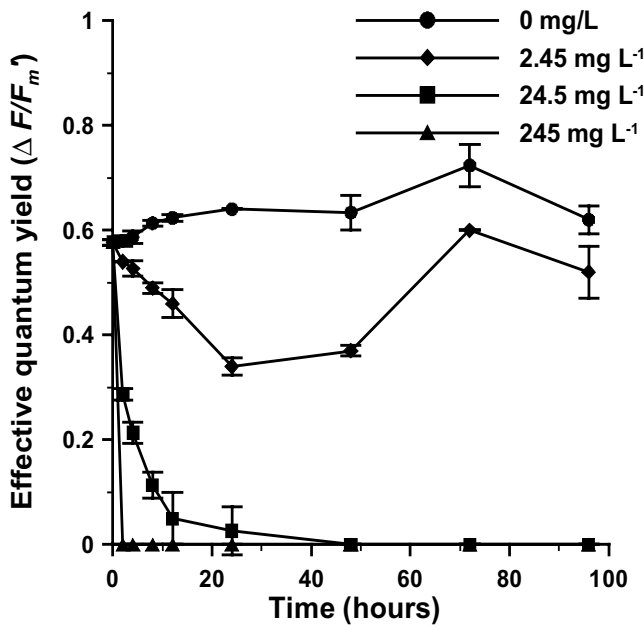


Fig. 3. Photosynthetic responses of effective quantum yield ($\Delta F/F_m'$) in *Nitzschia* sp. to exposure paraquat. Error bars indicate a standard deviation of the mean (n = 3).

시간째 유효양자수율은 0이었다(Fig. 2).

파라쿼트는 모든 농도조건에서 2시간 이내에 유효양자수율의 감소가 나타났고, 2.45 mg L⁻¹ 농도조건에서 유효양자수율이 24시간째 0.340(± 0.017)까지 낮아지다가 다시 증가하여 72시간에 0.600(± 0.000)으로 최대값을 보였다. 24.5 mg L⁻¹ 농도조건에서는 2시간 내에 양자수율이 급격히 감소하여 초기 값의 절반에 해당하는 0.287(± 0.012)로 나타났고

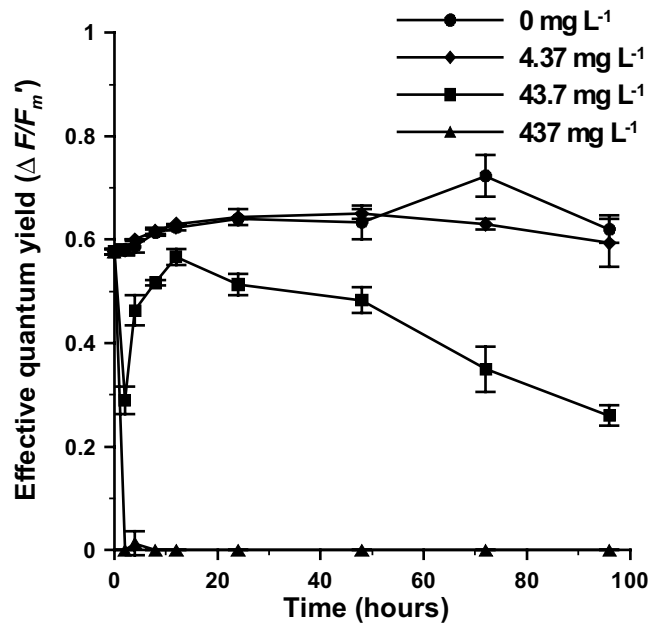


Fig. 4. Photosynthetic responses of effective quantum yield ($\Delta F/F_m'$) in *Nitzschia* sp. to exposure alachlor. Error bars indicate a standard deviation of the mean (n = 3).

시간이 지나면서 점점 감소하여 48시간에 유효양자수율 값은 0이었다. 245 mg L⁻¹ 농도조건에서 2시간에 유효양자수율이 0이 되었으며(Fig. 3), 이 때 저서규조류 사체가 가라 앉은 것을 눈으로 확인할 수 있었다. 알라클로의 경우 43.7 mg L⁻¹ 농도조건에서 2시간 이내에 유효양자수율이 급격히 감소하여 초기값의 절반 정도에 해당하는 0.290(± 0.026)이었고, 이후 양자수율 값이 0.567(± 0.015)까지 점차 증가한 후, 12시간 이후 차츰 감소하여 최종 96시간째 양자수율은 0.355(± 0.044)로 측정되었다. 437 mg L⁻¹ 농도조건에서 양자수율은 2시간에 0까지 감소하였다(Fig. 4).

고 찰

연안해양으로 유입된 중금속과 제조제는 미세조류 군집의 종조성을 변화시키고 군집의 구조 및 기능에 악 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Campanella et al. 2000; Wong 2000). 저서미세조류에 대한 중금속 또는 제조제와 같은 농약에 의한 독성효과는 직접적으로 일차생산력 감소를 일으키고, 연안 생태계에서 저서미세조류의 섭식자를 시작으로 상위 영양단계에 간접적인 악 영향을 미침으로써 결국에는 생태계를 교란하거나 파괴하는 결과를 초래할 수 있을 것이다. 또한 중금속과 같은 유해물질에 의해 교란된 환경에 서식하는 미세조류는 금속이온을 흡수하여 생물농축할 수 있으며, 이는 세포 기능의 저해와 결합하여 심각한 독성효과를 유발할 수 있다(Volterra and Conti 2000). 녹조류인 *Scenedesmus incrasatulus*을 대상으로 한 연구에서 2가의 중금속은 이 미

세조류의 외부형태 마저도 변화시킬 수 있다고 보고하고 있다 (Peña-Castro *et al.* 2004).

저서규조류의 광합성에 대한 구리, 크롬(VI)과 파라쿼트, 알라클로의 독성영향을 측정 한 본 연구의 결과에서, 구리를 제외한 세 가지 물질에서는 농도가 높아질수록 *Nitzschia sp.*의 유효양자수율을 낮게 하고, 대부분의 유해물질은 시간이 지남에 따라 오염된 이 규조류의 양자수율을 점점 낮아지는 경향을 보였다.

구리는 필수 미량 원소로 본 실험에서는 구리에 의한 광합성 저해가 뚜렷하지 않았는데, 이는 구리 농도조건이 최대 1 mg L^{-1} 으로 비교적 낮은 조건에서 실험이 이루어졌기 때문이기도 하지만, *Nitzschia sp.*의 독성에 대한 생리특성가 단순하지 않을 가능성을 내포하고 있다. 크롬(VI)과 알라클로는 특정 농도에서 유효양자수율이 초기에 증가를 보이다가 몇 시간이 지난 후에 다시 값이 낮아졌는데, 이 또한 저서규조류의 일주기 생리특성과 관련이 있는 것으로 추측된다.

본 연구를 통해 저서규조류의 광합성에 대한 구리, 크롬(VI)과 파라쿼트, 알라클로의 독성을 측정 한 결과, 유해물질에 대한 특이성을 갖는 것으로 파악되었다. 미세조류의 생리특성에 대한 제조제의 급성 독성영향은 다음과 같은 순서로 독성영향이 발현되는 것으로 알려져 있다; 광합성 > 세포분열 > 지질합성, acetyl-CoA 탈탄산효소 > acetolactate 합성효소 > ESEP 합성효소, 글루타민 합성효소, 호르몬 합성 > protoporphyrinogen 산화효소 (Ma *et al.* 2006). 본 연구 결과에서도 미세조류의 지질합성을 저해하는 알라클로에 비해 파라쿼트에 의한 광합성 저해가 더 낮은 농도조건에서 발현되는 것으로 보아 독성발현 순서에 대체로 일치하는 것으로 보인다.

중금속이나 제초제에 대한 다양한 저서미세조류의 민감성에 대해서는 알려진 바가 많이 없다. 그 이유는 본 연구에서 사용한 파라쿼트나 알라클로를 포함하여 많은 제조제들이 물에 대한 용해도가 매우 낮은 편이어서 아세트산과 같은 유기용매를 이용하여 용해시키고 배양액에 희석하여 노출시키기 때문이다. 또한 OECD, 미국환경보호국(U.S. EPA) 또는 유럽연합(EU) 등에 의해 잘 정립되어진 유해물질에 대한 수서독성시험을 위한 표준평가방법들은 물에 쉽게 용해되거나 화학적으로 안정한 물질들을 대상으로 하기 때문이다 (Boutin and Rogers 2000).

본 연구에서는 저서규조류에 의한 중금속과 제초제의 흡착에 대해서는 고려하지 않았다. 실제로 생물에 의한 중금속과 제초제의 흡착이 일어나면서 수중의 농도가 처음과 달라질 수 있다. 유해물질에 대한 저서규조류의 독성효과와 연안생태계 기능변화를 정확히 분석하기 위해서는 실험의 농도범위가 자연 환경에서 실제로 존재하는지에 대한 충분한 검토가 필요하고, 독성영향의 농도범위를 정하는데 있어 보다

세분된 농도 수준에서 독성실험이 추가되어야 할 것이다.

사 사

이 논문은 해양수산부의 수산특정연구개발사업 지원에 의해 연구되었습니다.

참고문헌

- Bahena C.L. and Martínez S.S. 2006. Photodegradation of chlorbromuron, atrazine and alachlor in aqueous systems under solar irradiation. *International J. Photoenergy* 2006: 1-6.
- Boutin C. and Rogers C.A. 2000. Pattern of sensitivity of plant species to various herbicides – an analysis with two databases. *Ecotoxicology* 9: 255-272.
- Campanella L., Cubadda F., Sammartino M.P. and Saoncella A. 2000. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res.* 25: 69-76.
- Clack R.B. 2001. *Marine Pollution*. 5th ed. Oxford University Press, New York.
- Couderchet M. and Boger P. 1993. Chloroacetamide-induced reduction of fatty acid desaturation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 45: 91-97.
- Delorenzo M.E., Scott G.I. and Ross P.E. 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Enviro. Tox. And Chem.* 20: 84-98.
- Haynes D., Ralph P., Prange J. and Dennison B. 2000. The Impact of the herbicide diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. *Mar. Pollut. Bull.* 41: 288-293.
- Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P.R., Arrese-Igor C. and Becana M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol.* 116: 173-181.
- Lobban C.S. and Harrison P.J. 1997. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ma J., Wang S., Wang P., Ma L., Chen X. and Xu R. 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 456-462.
- Peña-Castro J.M., Martinez-Jeronimo F., Esparza-Garcia F. and Canizares-Villanueva R.O. 2004. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. *Chemosphere* 57: 1629-1636.
- Rainbow M.H.J., Phillips D.J.H. and Depledge M.H. 1990. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates: a need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Mar. Pollut. Bull.* 21: 321-324.
- Van der Brink P.J. and Ter Braak C.J.F. 1999. Principal response curves: analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 138-148.
- Volterra L. and Conti M.E. 2000. Algae as biomarkers, bioaccumulators and toxin producers. *Int. J. Environ. Pollut.* 13: 92-125.

Wong P.K. 2000. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb614. *Chemosphere* **41**: 177-182.

Received 10 November 2007

Accepted 8 December 2007

