



이 학 석 사 학 위 논 문

비소(As³⁺)노출에 의한 북방전복, *Haliotis discus hannai* (Ino, 1953)의 생체축적 및 생리학적 변화



부경대학교대학원

수산생명의학과

최 수 연

이 학 석 사 학 위 논 문

비소(As³⁺)노출에 의한 북방전복, *Haliotis discus hannai* (Ino, 1953)의 생체축적 및 생리학적 변화

지도교수 강 주 찬

이 논문을 석사학위논문으로 제출함.

2019년 8월

부경대 학교대 학원

수산생명의학과

최 수 연

최수연의 이학석사 학위논문을 인준함.

2019년 8월 23일



위 원 장 이 학 박 사 김 도 형 (인) 위 원 농 학 박 사 허 민 도 (인) 위 원 이 학 박 사 강 주 찬 (인)

목 차	i
Abstract	iii
I. 서론 ······	·· 1
Ⅱ. 재료 및 방법	•• 7
1. 실험생물	•• 7
2. 실험과정	•• 7
3. Bioaccumulation	10
4. Hemolymph 생화학 분석 ·······	11
5. 항산화효소 분석	13
5-1. Superoxide dismutase(SOD)	13
5–2. Catalase(CAT)	14
6. 비특이적 면역인자 분석	15
6-1 Lysozyme(LZM) activity	15
6-2. Phenoloxidase(PO) activity	15
7. 유의성 검정	16
Ⅲ. 결과	17
1. Bioaccumulation	17
	~~

3-1. Superoxide dismutase(SOD)	27
3-2. Catalase(CAT)	30
4. 비특이적 면역인자 분석	33
4-1. Lysozyme(LZM) activity	33
4-2. Phenoloxidase(PO) activity	36
IV. 고찰 ······	39
V. 요약	44
2	
VI. 참고문헌	46
र म भ भ	

The arsenic bioaccumulation and its effects on physiological changes in Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* (Ino, 1953) exposed to waterborne $\operatorname{arsenic}(\operatorname{As}^{3^+})$

Soo-Yeon Choi

Department of Fish pathology, Graduate School, Pukyung National University

Abstract

Arsenic exists in the form of inorganic arsenic in nature, and belongs to metalloid but has similar properties to heavy metals. Arsenic generated mainly by industry and agriculture contaminates the surrounding soil and rivers, flows into the sea, damaging aquatic life. The shellfishes are more susceptible to polluted water systems than fishes which are distributed as attached organisms.

In this study was to exposure to $\operatorname{arsenic}(\operatorname{As}^{3^+})$ for 4weeks at concentrations of 10, 20, 40, 60 and 80 µg/L to observe the in vivo scale and physiological changes of $\operatorname{abalone}(Haliotis discus hannai)$ due to the effects of waterborne arsenic.

The bioaccumulation of abalone exposed to arsenic was in order of hepatopancreas, gill and muscle, the bioaccumulation increased with high concentration organ exposures but the muscles were identified to be significantly lower than other tissues.

Hemolymph observed changes in organic, inorganic and enzyme components. Total protein showed a tendency to decrease with increasing concentration. Glucose was significantly increased at all concentrations except for the control group, T-Cholesterol was not significantly changed. Calcium significantly decreased at 80 μ g/L concentration at 2 weeks and 60 μ g/L at 4 weeks, Magnesium increased significantly at the concentration of 60 μ g/L over 4 weeks of exposure. No changes were observed in Phosphorus.

GOT showed a significant change at the concentration of 80 μ g/L for 2 weeks, a significant increase at the concentration of above 40 μ g/L for 4 weeks, GPT showed a tendency to increase with increasing concentrations and longer exposure periods. LDH increased from a concentration of 80 μ g/L in the 2 weeks and showed a significant increase in concentrations of 60 and 80 μ g/L for 4 weeks.

As antioxidant activity, SOD and CAT of hepatopancreas and gill were observed. SOD showed a significant increase in concentrations of 80 µg/L for 2 weeks in the hepatopancreas and significant increases in concentrations of 60 µg/L for 4 weeks. In gill, significant increase was observed at concentrations of more than 60 µg/L for 4 weeks. CAT showed an increase from a concentration of 80 µg/L for 2 weeks in the hepatopancreas and increased significantly at the concentration of 40 µg/L for 4 weeks, a significant increase was identified at concentrations of 60 µg/L for 4 weeks in gill.

Lysozyme and Phenoloxidase of the hemolymph and hepatopancreas were observed in non-specific immune responses. Lysozyme showed a significant decrease in concentration of 40 μ g/L for 4 week both hemolymph and hepatopancreas, Phenoloxidase was not significantly changed but decreased with increasing arsenic concentration.

I. 서론

지각을 구성하는 다양한 원소 중에서 함유량이 매우 적은 미량금속 (trace metal)은 생물의 효소반응에 중요한 역할을 수행한다. 특히 산업 화와 도시화 과정에서 발생하는 비소(As), 수은(Hg), 카드뮴(Cd), 납 (Pb)과 같은 미량금속은 대기나 강물, 하천, 지하수 등을 통해 해양으로 유입되어 해양환경을 오염시킬 뿐만 아니라 생태계 먹이사슬을 통해 유용 수산생물에 축적되어(Balasubramanian and Kumar, 2013) 이를 섭취하 는 인간의 건강을 위협하기 때문에 해양환경 평가에 주요 감시 대상물질 로 알려져 있다(황 등, 2013).

비소는 지구의 지각, 토양, 대기, 물과 생물체에 흔하게 발견되는 원소 이며 암석 풍화, 생물 반응, 화산 분출 등 다양한 반응을 통해 지구 환경 에서 순환한다. 지난 수십 년 전 인간이 비소를 살충제, 제초제, 건조제, 가축 식품첨가제로 사용하였고, 비소 광산 개발과 화석 연료 사용이 증가 하면서 환경에서의 비소 농도가 크게 증가하였다.

일반적으로 비소는 지각에 대략 1.5~2 ppm이 함유되어 있어 지각 원 소 함유 비율의 상위 20번째에 해당하는 미량원소이다. 대부분 암석에서 단일 원소상태로는 존재하지 않고 대략 200종 이상의 광물 형태로 존재 하는데, 3가(As³⁺), 5가(As⁵⁺)의 비소가 많다. 특히 황화 광물에는 비소 의 함량이 0.02~0.5% 정도로 높은 편에 속하며, 황비철(arsenopyrite, FeAsS)은 최대 5% 정도까지 비소를 함유하고 있다(NAP, 1977). 암석 풍화에 따라 형성된 토양의 비소함량은 평균 5~10 ppm 정도이지만, 황 비철석이 풍화된 토양은 비소 농도가 수 백 ppm에 달하기도 한다. 한편 비소 계열 살충제를 사용하는 과수원의 토양은 366~732 ppm 정도까지 보고되기도 하였다(Ure and Berrow, 1982; Smedly and Kinniburden, 2002).

일반적으로 청정지역의 대기 중의 비소 농도는 대략 0.02~42 µg/m³이 고, 도심 지역은 0.003~0.2 µg/m³이며, 공단 등의 오염이 예상되는 지역 은 1 µg/m³이상인 지역도 보고되었다(WHO, 2001). 대기 중의 비소는 대부분 입자상으로 존재하며, 화산폭발, 바람 침식, 바다의 에어로졸, 화 석연료의 연소 및 산업체의 배출 등으로 유입된 비소는 건식 혹은 습식 침강으로 육지 혹은 바다에 다시 유입된다. 이 중에서 인간의 활동으로 대기 중으로 유입되는 비소는 약 18,800 톤/년으로 대기에 포함된 총 비 소의 30% 정도를 차지한다(Nriagu and Pacyna, 1988).

비소는 청정지역의 강물과 지하수에 0.1~10 µg/L 정도가 함유되어 있 으며, 암석에 포함된 비소 성분의 양과 pH 및 알칼리도 등의 용출 특성 에 따라 농도가 달라지기도 하며, 황화물 광산 지역의 하천, 강 및 지하 수 등에는 수 백 µg/L의 고농도 비소가 함유되어 있을 수 있다(WHO, 2001). 또한 비소는 open sea와 같은 해양에서 평균 1.5 µg/L 정도가 함유되어 있으며, 하구(estuary)에서는 평균 4 µg/L 이하의 비소 농도가 관찰되지만, 염분과 산화환원전위 등에 따라 농도의 범위가 다양하게 나 타난다(Smedley and Kinniburgh, 2001). 비소는 준금속(metalloid)에 속하나 성질이 중금속(heavy metal)과 유사하며 As³⁺와 As⁵⁺의 비소 화합물 형태로 자연계에 존재하여 동물의 소화기를 통해 체내에 빠르게 흡수한다. 체내에 흡수된 비소는 폐, 간, 근육, 신장 등의 기능을 저해시 키며 인간의 급성독성 증상으로 발열, 부정맥 심한 경우 심부전 등으로 사망에 이르게 되기도 한다(Rodr 1 guez *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014). 비소의 생물학적 반감기는 10시간 내지 수일이며, 50~80%는 소변을 통해 체외로 배설된다(Crecelius, 1977). 비소 오염은 주로 광산, 제련소 등의 제조공장에서 나오는 폐수, 광재 및 분진 등을 비롯하여 농작물에 사용되는 살충제에 포함되어 주변 지역의 토양, 우물, 하천 및 강 등에 존재하며, 이는 최종적으로 연안으로 유입되게 된다.

일반적으로 수생 생물인 어류, 패류 및 해조류의 체내에는 비소 농도가 높게 나타나는 편이지만(Barciela-Alonso *et al.*, 2016), 비교적 무해한 유기 비소의 형태로 존재한다. 수생생물 체내에 존재하는 비소는 AsB, AsC, arsenosugars 및 arsenolipids과 같이 비교적 낮은 독성의 유기비 소이지만, 최근 arsenosugars 및 arsenolipids는 무독화하는 과정에서 DMA(Dimethylarsinic acid, 동명; Cacodylic acid)나 MMA (Monomethylarsonic acid)와 같은 메틸화 비소화합종으로 변환되면서 생물에게 잠재적 악영향을 미칠 수 있다고 한다(조, 2016). 비소의 독성 은 유기비소보다 무기비소가 독성이 강하며, 무기비소 중 As⁵⁺보다 As³⁺ 가 독성이 더 강하다(Smith *et al.*, 1998). 무기비소는 체내 대사 활동에 불필요한 중금속으로 수생 생물의 먹이사슬을 통해 축적되는 과정에서 낮 은 농도에서도 독성 영향을 나타낼 수 있다(Freitas *et al.*, 2016).

지금까지 동물에 대한 비소의 독성적인 관점에서 여러 가지 측면의 다 양한 연구가 진행되고 있다. 즉 잉어, mirror carp(*Cyprinus carpio carpio*)의 비소 노출에 따라 간과 신장에서 높은 축적이 확인되었고, 항 산화효소인 SOD 및 CAT 활성은 비소 농도가 높아질수록 유의적 감소를 보였다(Altikat *et al.*, 2015). 척추동물 growing pig는 비소 노출에 따 라 혈청과 간의 항산화효소인 SOD 및 CAT 활성이 유의한 변동을 보였 다(Wang and Xu, 2006). 또한 wistar rat의 비소 노출에 따라 SOD활 성은 10 mg/L의 비소 농도에서 90일 후에 유의적 증가를 나타낸 반면 CAT는 유의한 감소를 확인하였고(Kharroubi *et al.*, 2014), zebrafish (*Danio rerio*)는 아가미의 CAT 활성이 10 µg/L 농도에서는 증가하다가 100 µg/L 농도에서 감소하는 것을 확인하였다(Ventura-Lima, 2009). 패류인 바지락(*Ruditapes philippinarum*)은 비소 노출에 의해 SOD활성 은 비소 농도가 증가할수록 유의적 감소를 나타냈고 CAT 활성은 비소 농도가 증가할수록 유의적 증가가 확인되었다(Freitas *et al.*, 2016).

북방전복(*Haliotis discus hannai*) 치패의 구리(Cu) 및 카드뮴(Cd) 노 출에 의한 조직의 축적은 간췌장 및 근육에서 노출 농도와 시간의 증가에 따라 유의하게 증가하였다. 구리 및 카드뮴의 노출에 따라 간췌장의 SOD 활성은 구리는 시간이 길어질수록 감소하였고, 카드뮴은 증가하는 상반된 결과를 보였다(Lei *et al.*, 2015). 또한 북방전복 치패의 아연(Zn)에 노 출에 따라 간췌장의 아연 축적은 아연 농도가 높아질수록 증가하였고, CAT 활성은 33.8 mg/kg의 농도에서 유의적 증가가 확인하였다(Wu *et al.*, 2011). 또한 민 등(2017)에 의하면 북방전복은 니켈(Ni) 노출에 의 해서 간췌장의 SOD 및 CAT 활성이 200 µg/L의 농도에서 증가하는 것 을 관찰하였다.

Lysozyme은 박테리아 및 세균에 대해 중요한 방어 기작을 하는 항균 성 단백질이다(Lockey and Ourth, 1996). 카드뮴 30 µg/L에 노출된 잉 어, common carp(*Cyprinus carpio*)의 lysozyme 활성은 실험 15일째 는 유의적 차이를 보이지 않다가, 30일째 유의적인 감소를 확인하였다 (Ghiasi *et al.,* 2010). 연체동물의 hemocyte와 phenoloxidase(PO)는 생화학적 변화와 구리(Cu), 카드뮴(Cd) 및 페놀(phenol) 등의 독성물질 또는 수온변화로 인한 스트레스로 증가하거나 감소할 수 있다(Cheng, 1988; Auffret and Oubella, 1994; Coles *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2004). PO 활성은 전복의 부정적 영향을 확인하는 매개 변수로 활용된 다(Hooper *et al.*, 2014). 컬러전복(*Haliotis diversicolor*)의 실험에서 수온 스트레스로 인해 PO 활성이 감소하는 경향을 확인하였다(Cheng *et al.*, 2004). 갑각류인 게(crab)는 카드뮴이 500 µg/L의 농도로 노출되면 면역작용을 하는 phagocytosis가 감소하는 것을 확인 하였다(Truscott and White, 1990).

전복은 분류학적으로 연체동물문(Mollusca), 복족강(Gastropoda), 전 복과(Haliotidae), 전복속(*Haliotis*)에 속하며 전세계에서 약 100종 이상 분포되어 있다. 그 중 약 10종은 상업적 가치가 있는 수산물로 주로 한 국, 일본, 호주 남부, 뉴질랜드, 미국 및 중국에서 서식한다. 특히 북방전 복(*Haliotis discus hannai*)은 우리나라 대표적인 양식 종으로 생산량 대 비 생산액이 높은 고부가가치의 수산물로 생산량은 2010년 6,436 톤에 서 2017년 16,134 톤으로 2.5배 이상 증가하였으며, 동년 대비 생산수 익은 2천 400억 원에서 5천 854억 원으로 2배 이상 증가하였다(통계청, 2017).

전복은 야행성이며 주로 바위 붙어서 서식하거나 바닥을 기어서 생활하는 포복성 저서 동물로서 서식 환경의 중금속 오염에 따라 유영을 하는 어류에 비해 그 영향을 받을 가능성이 매우 높으며(최, 2017), 특히 외양에 비해 연안의 전복이 서식지 및 양식 지역은 중금속 오염 가능성이 높은 지역에 속한다(Goto *et al.*, 2010).

지금까지 중금속 오염에 대한 수생동물에 미치는 영향에 대해서는 생 리, 생화학 및 면역학적인 반응의 측면에서 연구들이 되어왔다(Taylor *et al.*, 1985; Depledge and Rainbow, 1990; Bryan and Langston, 1992; Rainbow, 1997; Rainbow, 2002).

하지만 북방전복에 대한 중금속의 독성적 관점에서의 연구는 일부 결과 에 한정적이며, 특히 비소에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 북방전복(*Haliotis discus hannai*)에 대한 비소(As³⁺)의 독성을 검토하기 위하여 실험을 실시하였다. 즉 연안의 자연 서식지 및 양식장의 비소 오염이 예상됨에 따라 이 종에 미치는 비소의 독성을 파악하기 위하 여 기관별 축적을 비롯하여 hemolymph의 생리적 변화, 항산화효소 및 비특이적 면역 반응에 대한 영향을 검토하였다.



Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험생물

본 연구에서 사용한 실험생물 북방전복(Haliotis discus hannai) 250 마리(Wando, Korea)를 분양 받아 10일간 순치시켰다. 순치 시 사망 개 체는 확인하는 즉시 제거하였고, 순치 후 외견상 건강한 개체(각장 61.76±0.20 mm, 전중 40.35±0.18 g)를 선별하여 실험에 사용하였다. 순치기간 동안 수온(18.0±1.54 ℃), pH(8.2±0.04), 염분(33.8±1.05 ‰) 및 용존산소(7.65±0.43 mg/L)를 유지하였으며, 먹이는 완도산 건미 역(Undaria pinnatifida)을 해수에 30분 정도 불린 후 넓게 펴서 매일 충분히 공급하였다.

2. 실험과정

실험물질인 비소는 아비산나트륨(NaAsO₂, sodium arsenite)을 사용해 1,000 µg/L 표준 용액을 만들고 10, 20, 40, 60 및 80 µg/L의 농도 조 절하였다. 이때 ICP-MS로 검량선을 측정한 각각의 As³⁺ 농도는 0, 12.5, 25, 50, 100 µg/L(y=0.5507x-3.7534, R²=0.9998)이였다. 실 험은 유리 수조(500*280*310mm)에 해수 20L를 채워 각 실험 농도 마 다 20마리씩 입식 하여 4주 동안 실시하였으며, 설정한 비소 농도를 유 지하기 위해 하루에 한번 환수를 했다. 실험에 사용한 해수의 수질은 Table. 1과 같으며, 실험기간 동안 먹이는 순치 시와 마찬가지로 완도산 건미역을 공급하였다. 수질의 악화를 방지하기 위해 실험 수조의 남은 먹 이 찌꺼기 및 이물질은 각 구간마다 개별 뜰채와 사이펀을 사용하여 깨끗 이 제거하였다. 모든 실험은 자연조건에서 실시하였으며, 2주 간격으로 관련 항목을 분석하였다.



Item	Value			
Temperature(°C)	18.0 ± 1.54			
pH	8.2 ± 0.04			
Salinity (‰)	33.8 ± 1.05			
Dissolved Oxygen(mg/L)	7.65 ± 0.43			
Chemical Oxygen Demand (mg/L)	1.24 ± 0.35			
Ammonia(µg/L)	10.4 ± 1.4			
Nitrite(µg/L)	4.45 ± 1.38			
Nitrate(µg/L)	56.2 ± 3.2			
OXYNA AT TO	H OL III			

Table. 1. The chemical components of seawater used during the experiment and the conditions of the experiment.

3. Bioaccumulation

북방전복(Haliotis discus hannai)의 체내 축적은 가췌장 (Hepatopancreas), 아가미(Gill) 및 근육(Muscle)에 대하여 분석하였다. 각각의 조직을 증류수로 세척한 후 E-tube에 1 g을 채집하여 4일간 동 결 건조했다. 건조된 시료를 유리병(vial)에 0.1g 정도 옮겨 담았고 건중 량(dry weight) 측정 후 기록했다. 유리병에 담긴 건조된 시료는 분석에 방해요인이 될 수 있는 유기물을 분해하기 위해 HNO₃(60% concentration, Matsunoen ChemicalsLTD., Japan) 2ml을 넣어 용해시 킨 후 hot plate에 150℃의 온도로 가열하여 노랗게 마를 때까지 재건조 했다. 재건조 된 시료에 2%로 희석한 HNO3 20ml를 첨가하여 하루 암소 보관한 후 membrane filter(0.2 µm, Advantec mfs, Ins.)로 필터링했다. 필터링 된 용액은 Conical tube에 옮겨 담고, HNO₃의 광분해를 억제하 기 위해 분석 전까지 암소보관 했다. 각 조직에 대한 비소(⁷⁵As)의 축적 량의 분석은 ICP-MS(Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy. Perkin Elmer, ELAN DRC)를 이용했다. 비소(⁷⁵As)의 정량을 알아보기 위하여 CRMs(certified reference materials)로는 Multi-element ICP-MS Calibration Std. 3 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) 을 이용하여 질량분석을 실시했다. 각 조직 내 비소(⁷⁵As)축적량은 µq/g dry wt로 표기했다.

4. Hemolymph 생화학 분석

척추동물의 혈액과 유사한 유체인 무척추동물 전복의 hemolymph를 사용하여 생화학 분석을 실행했다. Hemolymph는 hemocyte의 엉김을 방지하기 위해 항응고제(Heparin Lithium Salt, MP Biomedicals, LLC.)를 처리했다. 1회용 주사기를 이용하여 심장 옆 혈림프관에서 약 1ml 정도 채집했다. 채집한 hemolymph는 3000 x g, 4℃에서 10분 (Viant *et* al., 2003)동안 원심분리(MIKRO 22R, Hettich ZENTRIFUGEN Ltd., Germany)하여 상등액을 채집했다. 채집한 상등 액은 분석 실험 전까지 -80℃를 유지하는 초저온냉동고(MDF-U53V, SANYO Electric Co. Ltd., Japan)에 보관했다.

Hemolymph 내 유기성분은 총 단백질(TP), 혈당(Glucose), 총 콜레 스테롤(T-Cholesterol)을 측정했다. 총 단백질은 단백질의 착염을 형성 하는 Biuret method로 비색정량 했다. 혈당은 GOD(Glucose-oxidase) 의 작용에 의한 Enzyme method로 비색정량 했다. 총 콜레스테롤은 Ester Cholesterol의 가수분해에 의한 Enzyme method로 비색정량 했 다.

Hemolymph 내 무기성분은 칼슘(Ca), 마그네슘(Mg), 인(P)을 측정하 였다. 칼슘은 OCPC (orthocresolphthalein complexone) method로 비 색정량 했다. 마그네슘은 마그네슘 콤플렉스를 생성하는 Xylidyl blue-I method로 비색정량 했다. 인은 몰리브덴산 암모늄 분광법(Ammonium molybdate spectrometric method)으로 측정했다.

Hemolymph 내 효소성분은 GOT(glutamic oxalacetic transaminase),

GPT(glutamic pyruvate transaminase), LDH(lactate dehydrogenase) 를 측정했다. GOT와 GPT는 국내에서 가장 널리 사용되고 있는 Reitman-Frankel method로 측정했다. LDH는 Pyruvic acid를 기질로 하는 Wroblewski-Ladue method를 사용했다(Bowers and Takenak a,1963).



5. 항산화효소 분석

항산화효소 분석을 위하여 간췌장과 아가미 조직을 PBS buffer(0.1M, pH 7.5)와 함께 homogenizer(Tissue grinder, Kontes[™] Pellet Pestle, USA)로 균질화 했다. 그리고 10,000 x g, 4℃에서 15분간 원 심분리한 상등액을 실험에 사용했다. 채집한 상등액은 실험 전까지 -8 0℃를 유지하는 초저온냉동고에 보관했다.

간췌장과 아가미의 단백정량은 Bradford method (Bradford, 1976)를 이용했다. 결과 값 도출을 위한 표준 단백질은 bovine serum albumin(BSA, Bio-Rad Laboratones, Inc.)을 사용하여 검량선을 작성 한 후 이용했다.

5-1. Superoxide dismutase(SOD)

SOD activity는 SOD Activity Assay kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, INC., Japan)를 이용하여 분석했다. SOD 활성은 간췌장 과 아가미의 상등액을 5배씩 희석(1/5, 1/25, 1/125, 1/625)한 sample solution을 준비했다. SOD 활성은 분광광도계(Spectrophotometer Infinite M200 Pro NanoQuant Plate[™], TECAN, Austria)를 이용하여 450nm에서 측정했다.

각각의 샘플에 대해 아래의 공식을 이용하여 inhibition rate을 구했다. Inhibition 활성이 50% 억제되는 구간을 inhibition %로 표현했다.

SOD activity (inhibition rate %)

=[(Blank 1-Blank 3)-(Sample-Blank 2)]/(Blank 1-Blank 3)x100.

5-2. Catalase (CAT)

CAT activity는 Oxiselect[™] Catalase Activity Assay kit를 이용하 는 분석법(Catalog no.: STA-341, CELL BIOLABS, INC.)으로 실험 하여 나타냈다. CAT 활성은 1분당 과산화수소(H₂O₂)1µmole을 분해하 는 효소의 양을 1 unit으로 정의하여 unit/mg protein으로 표현했다.



6. 비특이적 면역인자 분석

6-1. Lysozyme activity

Lysozyme activity는 Quantitative Sandwich ELISA kit를 이용하는 분석법(Catalog no.: MBS099538, MyBioSource. Inc.)을 사용하여 측정했다. Lysozyme activity는 kit의 시약을 첨가하고 각각의 sample을 배양한 후 마지막으로 stop solution을 첨가하여 측정한 값을 관찰했다. Lysozyme activity의 단위는 unit/mg protein으로 표현했다.

6-2. Phenoloxidase activity

Phenoloxidase activity는 체코마사리크대학1)의 방법으로 분석했다. 10mM Phosphate buffer(pH7.0) 95µl에 hemolymph 5µl를 넣고 10,000 x g, 4℃에서 5분간 원심분리한 상등액을 40µl 취하여 L-DOPA(_{DL}-3,4-Dihydroxyphenylalanine,Sigma) 160µl와 혼합했다. 혼합한 용액은 흡광도 492nm에서 즉시 측정하였고 30분 후 재 측정한 값을 비교 관찰했다. 1분당 0.001 변화의 값을 1 unit으로 지정하였으며, phenoloxidase activity의 단위는 Unit/min/mg protein으로 표현했다.

¹⁾ https://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi8250c/um/52661469/53116375/ Assay_of_hemolymph_phenoloxidase_activity.pdf, 2018년 5월 16일 검색

7. 유의성 검정

실험 결과의 유의성을 평가하기 위한 통계 분석으로 SPSS 통계 프로 그램(IBM SPSS Statistics 20, version 12.0k)이용하였다. One way ANOVA test를 실시한 후 사후분석으로 Duncan' test를 통해 *P* < 0.05일 때 실험농도 구간의 유의성이 있는 것으로 간주하여 나타냈다.



Ⅲ. 결과

1. Bioaccumulation

1-1. 간췌장(hepatopancreas)

비소(As³⁺)에 노출에 따른 전복 간췌장(hepatopancreas)의 축적 결과 를 Fig. 1에 나타냈다. 간췌장의 비소축적은 2주와 4주 모두 10, 20 µg /L의 농도에서는 유의적인 변화를 보이지 않았으나, 40 µg/L 이상의 농 도부터 유의적인 증가를 나타냈으며, 4주 후의 80 µg/L의 농도에서 가장 큰 증가를 나타냈다(*P* < 0.05).

11 12



Fig. 1. As³⁺ accumulation in hepatopancreas of abalone, *Haliotis discus* hannai exposed to the different concentration of waterborne arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

1-2. 아가미(gill)

비소(As³⁺)에 노출에 따른 전복 아가미(gill)의 축적 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 아가미의 비소축적은 2주 40 µg/L 이상의 농도에서 유의적 증 가를 보이다가 60 µg/L 및 80 µg/L의 농도에서 큰 증가를 나타냈다. 4주 20 µg/L의 농도부터 유의적인 증가를 나타내다가 4주 80 µg/L의 농도에 서 가장 큰 증가를 나타냈다(*P* < 0.05).





Fig. 2. As^{3+} accumulation in gill of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of waterborne arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

1-3. 근육(muscle)

비소(As³⁺)에 노출에 따른 전복 근육(muscle)의 축적 결과를 Fig. 3 에 나타냈다. 근육의 비소축적은 2주와 4주 모두 10, 20 μg/L의 농도에 서는 유의적인 변화를 보이지 않았다. 하지만, 2주 60 μg/L의 농도와 4 주 40 μg/L의 농도부터 유의적인 증가를 나타냈다(*P* < 0.05).





Fig. 3. As^{3+} accumulation in muscle of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of waterborne arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

2. Hemolymph 생화학 분석

비소(As³⁺) 노출에 따른 전복 hemolymph의 유기 성분인 총 단백질 (TP), 혈당(glucose), 총 콜레스테롤(T-cholesterol)은 Table. 2에 나 타냈다. 총 단백질 농도는 2주와 4주 모든 비소 농도에서 유의적인 변화 는 확인되지 않았지만, 비소 농도가 높아질수록 점차 감소하는 경향을 보 였다. 혈당 농도는 2주와 4주 모두 40 µg/L 이상의 비소 농도에서 유의 한 증가가 관찰되었다(*P* < 0.05). 총 콜레스테롤 농도는 2주와 4주 모두 유의적 변화를 보이지 않았다.

Hemolymph의 무기성분인 칼슘(Ca), 마그네슘(Mg), 인(P)은 Table. 3에 나타냈다. 칼슘 농도는 2주 후에 비소 80 µg/L의 이상의 농도에서 유의적인 감소를 확인할 수 있었고, 4주 후에 60 µg/L 이상의 농도에서 유의한 감소가 관찰되었으며(*P* < 0.05), 비소 농도가 높아질수록 감소하 는 경향을 나타냈다. 마그네슘 농도는 2주 후에 대조구를 비롯하여 모든 비소 농도에서 유의적인 변화가 없었으나, 4주 후에 비소 농도 60 µg/L 이상에서 유의한 증가를 보였다(*P* < 0.05).

Hemolymph의 효소성분인 GOT (glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvate transaminase), LDH (lactate dehydrogenase) 활성은 Table. 4에 나타냈다. GOT 활성은 2주 후에 비소 80 μg/L 이상 의 농도와 4주 후에는 비소 40 μg/L 이상의 농도에서 유의적 변화가 확 인되었다(*P* < 0.05). GPT 활성은 2주 및 4주 후에 대조구를 비롯하여 모든 비소 농도에서 유의한 변화가 관찰되지 않았다. LDH 활성은 2주 후에 비소 80 μg/L의 농도에서 유의적인 변화를 확인할 수 있었고, 4주 후에는 60 μg/L 이상의 농도에서 유의한 증가를 보였다(*P* < 0.05).

Groups Periods Parameter (week) Arsenic concentration $(\mu g/L)$ Control 40 10 20 60 80 TP(g/L) 3.786 ± 0.154^{a} 3.763 ± 0.075^{a} 3.752 ± 0.128^{a} 3.743 ± 0.143^{a} 3.717 ± 0.086^{a} 3.690 ± 0.158^{a} 55.79 ± 0.93^{bc} 56.06 ± 1.28^{bc} 2 Glucose(mg/L) 52.45 ± 1.01^{a} 52.94 ± 0.75^{a} 53.23 ± 0.84^{a} 55.28 ± 1.08^{b} T-Cholesterol(mg/L) 75.68 ± 1.12^{a} 75.68 ± 1.02^{a} 75.55 ± 0.48^{a} 75.58 ± 1.65^{a} 75.47 ± 1.20^{a} 75.21 ± 1.49^{a} TP(g/L) 3.771 ± 0.130^{a} 3.764 ± 0.143^{a} 3.750 ± 0.183^{a} 3.714 ± 0.054^{a} 3.610 ± 0.138^{a} 3.598 ± 0.088^{a} 52.59 ± 1.04^{a} 53.27 ± 0.85^{a} 53.72 ± 1.20^{a} 56.06 ± 0.70^{bc} 56.57 ± 1.24^{bc} Glucose(mg/L) $57.08 \pm 1.20^{\circ}$ 4 T-Cholesterol(mg/L) 75.72 ± 1.87^{a} 76.09 ± 0.76^{a} 76.17 ± 0.84^{a} 76.25 ± 1.11^{a} 76.17 ± 0.94^{a} 76.40 ± 1.71^{a}

Table. 2. Changes of total protein, glucose and total cholesterol concentration in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of waterborne arsenic for 4 weeks.

All data are presented as mean \pm S.E. (n=6). Means in each row with different subscripts are significantly different (P < 0.05).

Periods (week)	Parameter	Groups					
		Control	Arsenic concentration (µg/L)				
			10	20	40	60	80
	Ca(mg/dL)	17.09±0.51ª	16.95 ± 0.63^{a}	16.78 ± 0.82^{a}	16.73 ± 0.42^{a}	16.30 ± 0.57^{a}	15.10 ± 0.73^{b}
2	Mg(mg/dL)	8.246 ± 0.040^{a}	8.249 ± 0.015^{a}	8.249 ± 0.028^{a}	8.251 ± 0.018^{a}	8.252 ± 0.044^{a}	8.275 ± 0.045^{a}
	P(mg/dL)	38.01 ± 19.22^{a}	36.05 ± 32.96^{a}	49.68±31.34ª	56.01 ± 18.82^{a}	50.32 ± 2.14^{a}	49.03 ± 26.98^{a}
4	Ca(mg/dL)	17.00 ± 0.54^{a}	16.83 ± 0.54^{a}	16.68 ± 0.67^{a}	16.59 ± 0.61^{a}	14.92 ± 0.76^{b}	14.74 ± 0.61^{b}
	Mg(mg/dL)	8.250 ± 0.061^{a}	8.267 ± 0.053^{a}	8.296 ± 0.017^{a}	8.300 ± 0.027^{a}	8.448 ± 0.048^{b}	8.483 ± 0.040^{b}
	P(mg/dL)	57.30 ± 25.44^{a}	39.85 ± 35.14^{a}	32.53 ± 18.32^{a}	42.94 ± 33.02^{a}	53.66 ± 14.06^{a}	45.77 ± 13.55^{a}

Table. 3. Changes of calcium, magnesium and phosphorus concentration in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of waterborne arsenic for 4 weeks.

All data are presented as mean \pm S.E. (n=6). Means in each row with different subscripts are significantly different (P < 0.05).

Periods (week)	Parameter	Groups					
		Control	Arsenic concentration $(\mu g/L)$				
			10	20	40	60	80
2	GOT(Karmen/mL)	18.91 ± 2.87^{a}	18.78 ± 1.87^{a}	18.88 ± 1.89^{a}	19.22 ± 1.19^{a}	$20.39 \pm 1.17^{\text{ab}}$	$22.76 \pm 1.65^{\text{b}}$
	GPT(Karmen/mL)	17.61 ± 1.03^{a}	17.72 ± 1.27^{a}	18.13 ± 2.76^{a}	18.39 ± 0.64^{a}	18.81 ± 1.17^{a}	18.95 ± 1.02^{a}
	LDH(IU/L)	92.75 ± 3.10^{a}	92.72 ± 3.36^{a}	93.50 ± 3.06^{a}	93.65 ± 3.76^{a}	95.77 ± 2.34^{a}	$100.29 \pm 3.32^{\rm bc}$
4	GOT(Karmen/mL)	18.72 ± 2.08^{a}	19.38 ± 2.29^{a}	19.83 ± 2.07^{a}	$23.49 \pm 1.80^{\circ}$	$23.69 \pm 2.10^{\circ}$	$25.41 \pm 2.37^{\circ}$
	GPT(Karmen/mL)	18.26 ± 0.90^{a}	18.53 ± 3.25^{a}	18.83 ± 1.95^{a}	18.84 ± 1.43^{a}	18.86 ± 1.23^{a}	20.23 ± 0.93^{a}
	LDH(IU/L)	92.36 ± 1.82^{a}	93.05 ± 3.96^{a}	94.86 ± 3.45^{a}	$96.77 \pm 2.34^{\rm ab}$	103.68±2.94°	104.30±3.33°

Table. 4. Changes of GOT, GPT and LDH activities in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of waterborne arsenic for 4 weeks.

All data are presented as mean \pm S.E. (n=6). Means in each row with different subscripts are significantly different (P < 0.05).

3. 항산화효소 분석

3-1. Superoxide dismutase(SOD)

비소(As³⁺) 노출에 따른 전복의 간췌장(hepatopancreas)과 아가미 (gill)의 SOD 활성은 Fig. 4와 5에 나타냈다.

간췌장의 SOD 활성은 2주와 4주 모두 대조구를 비롯하여 비소 40 µg /L 이하의 농도에서는 유의적인 변화를 나타내지 않았으나, 2주 후에 비 소 80 µg/L의 농도, 4주 후에는 비소 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적으 로 증가하였다(*P* < 0.05).

아가미의 SOD 활성은 2주 후에 대조구를 비롯하여 모든 비소 농도에 서 유의적인 변화를 나타내지 않았으나, 4주 후에 비소 60 μg/L 이상의 농도에서 유의적인 증가가 확인되었다(*P* < 0.05).



Fig. 4. Superoxide dismutase(SOD) activity in hepatopancreas of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.



Fig. 5. Superoxide dismutase(SOD) activity in gill of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

3-2. Catalase (CAT)

비소(As³⁺) 노출에 따른 전복의 간췌장(hepatopancreas)과 아가미 (gill)의 catalase(CAT) 활성은 Fig. 6과 7에 나타냈다.

간췌장의 CAT 활성은 2주와 4주 노출 후에 대조구를 비롯하여 비소 20 μg/L 이하의 농도에서는 유의적인 변화를 나타내지 않았으나, 2주 후 에 비소 80 μg/L의 농도, 4주 후에 비소 40 μg/L 이상의 농도에서 유의 한 증가가 확인되었다(*P* < 0.05).

아가미의 CAT 활성은 2주 후에 대조구를 포함하여 모든 비소 농도에 서 유의적인 변화를 나타내지 않았으나, 4주 후에는 60 μg/L 이상의 비 소 농도에서 유의적인 증가를 나타냈다(*P* < 0.05).



Fig. 6. Catalase (CAT) activity in hepatopancreas of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.



Fig. 7. Catalase (CAT) activity in gill of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

4. 비특이적 면역인자 분석

4-1. Lysozyme 활성

비소(As³⁺)에 노출된 전복의 hemolymph와 간췌장(hepatopancreas)의 lysozyme 활성은 Fig. 8과 9에 나타냈다.

Lysozyme 활성은 hemolymph와 간췌장 모두 2주 후에 대조구를 포 함한 모든 비소 농도에서 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 하지만 4주 후에 비소 20 μg/L 이하의 농도에서는 유의적인 변화가 없다가 비소 40 μg/L 이상의 농도에서 유의적인 감소를 보였다(*P* < 0.05).





Fig. 8. Lysozyme activity in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.



Fig. 9. Lysozyme activity in hepatopancreas of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

4-2. Phenoloxidase(PO) activity

비소(As³⁺)에 노출된 전복의 hemolymph와 간췌장 (hepatopancreas)의 phenoloxidase 활성은 Fig. 10과 11에 나타냈다.

비소에 노출시킨 phenoloxidase 활성은 hemolymph와 간췌장 모두 4 주의 실험 기간 동안 유의한 변동이 관찰되지 않았으나, 비소 농도의 증가에 따라 감소하는 경향을 나타냈다.





Fig. 10. Phenoloxidase(PO) activity in hemolymph of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.



Fig. 11. Phenoloxidase(PO) activity in hepatopancreas of abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to the different concentration of arsenic for 4 weeks. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different in 2 weeks and 4weeks (P < 0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

Ⅳ. 고찰

고도성장의 결과물로 인하여 확인되지 않은 다양한 화학물질이 인간과 동물에게 피해를 입히는 사례가 종종 보고되고 있다. 이미 관리되고 있는 화학물질의 위해성에 관한 연구와 노력은 계속되어 왔지만 생물에 미치는 비소에 대한 연구는 미미한 편이다. 비소는 강한 독성을 지니고 있기 때문에 생물에 노출되면 만성반응으로 피부와 조직에 피해를 주고 급성반응으로 신장 장해와 심하면 사망에 이르는 등 부정적인 영향을 일으킨다. 비소의 독성영향에 대한 연구로 척추동물인 돼지와 쥐와 수생생물 어류에 대해서는 이미 많은 연구가 진행되고 있으나 무척추동물에 대한 연구는 부족한 실정이다. 특히 개방혈관계인 복족류 전복은 수계 환경에서 강한 독성을 지닌 금속에 노출되기 쉬운 편이나, 비소에 대한 영향평가는 없거나 대개 확인하기 어렵다.

최근 수생생물의 양식업은 나날이 늘어나 단백질의 수요를 충족시키기 위해 빠르게 발전하고 있는 산업 중 하나이다. 그 중에서 북방전복, 일명 참전복(*Haliotis discus hannai*)의 우리나라 생산액은 2010년과 비교하여 2017년에 2배 이상 증가(통계청, 2017)하였고 향후 더욱 각광받는 수산물로서 전복에 대한 다양한 연구의 필요성을 강조하는 바이다.

주로 해양 저층 바닥에 기어서 생활하는 전복은 인간의 산업 활동으로 인해 해양환경에 비소가 노출되어 쌓인 퇴적물의 피해를 받을 가능성이 많다. 또한 실험물질인 sodium arsenite는 수용성이 높은 편이며, 보통 물에 잘 녹는 미량금속은 식이를 통한 섭취보다 수계에 존재했을 때 독성을 더 강하게 나타낸다고 알려져 있다(Wang et al., 2009).

북방전복의 비소(As³⁺)노출에 따라 조직 별 체내 축적을 분석한 결과, 간췌장 및 아가미는 비소 40 µg/L 이상의 농도에서 유의적으로 증가하였으며, 근육은 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적인 증가를 나타냈고, 축적의 정도는 간췌장 > 아가미 > 근육 순으로 간췌장에서 가장 높게 나타났다. 전복의 간췌장은 해독 및 배설 작용과 관련이 있으며, 아가미는 호흡기관으로 비소 노출에 전복의 유해화학물질에 대한 체내의 순환과정에서 근육보다 축적이 증가한 것으로 추정된다.

어류는 환경요인 중 유해화학물질에 대해 스트레스를 받으면 혈액 성상 및 혈청 성분의 변화를 야기 시키는데, 이 요소들은 유해화학물질에 대한 스트레스 지표로 사용되기도 한다. 어류의 혈액 성분과 유사한 무척추동물의 hemocyte 와 hemolymph는 어류와 달리 개방혈관계로 이루어진 전복의 면역체계에 대하여 중요한 기능을 담당한다(민 등., 2014).

비소(As³⁺) 노출에 따른 전복의 hemolymph 유기 성분인 총 단백질과 총 콜레스테롤의 농도는 실험기간 동안 유의적인 변화가 관찰되지 않았지만, 혈당 농도는 비소 40 µg/L 이상의 농도에서 유의한 증가가 관찰되었다. Hemolymph 의 무기성분인 칼슘 농도는 2주 후에 비소 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적으로 감소하였고, 반면 마그네슘 농도는 비소 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적으로 증가하였다. 또한 hemolymph 의 GPT 활성은 실험기간 동안 유의한 변동이 없었으나, GOT 활성은 비소 40 µg/L 이상의 농도에서, LDH 활성은 비소 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적 증가를 보였다.

Figueira et al. (2012)에 의하면 grooved carpet shell(Ruditapes decussatus)의 카드뮴(Cd) 노출에 따라 단백질의 농도는 유의적 변화가 없다는 것을 지적하였다. 따라서 본 실험의 비소 노출에 따른 전복 hemolymph의 총 단백질 농도의 결과와 동일한 결과를 나타내고 있으며, 북방전복에 있어서도 본 실험의 노출 기간과 농도에서는 영향이 없을 것으로 생각된다. 한편 Tromp et al. (2018)의 수온 스트레스가 미치는 대서양 연어(Salmo salar)에 대한 연구에서 스트레스에 대해 콜레스테롤의 변화는 유의적 차이가 없다는 것을 증명하였는데, 이는 본 실험 전복에 대해 비소 노출의 스트레스로 인한 콜레스테롤 농도는 통계적으로 차이를 나타내지 않은 결과와 유사하다고 생각한다. 북방전복 hemolymph의 혈당 농도는 40 µg/L 이상의 비소 농도에서 유의한 증가가 관찰되었다. Gustafson et al. (2005)에 의하면 패류는 환경 악화에 따라 스트레스가 발생하며, 보다 많은 에너지를 요구하게 되므로 glucose 의 농도가 증가한다고 하였다. 따라서 전복 hemolymph 내 혈당 농도의 증가는 비소 노출에 의한 에너지 요구의 증가에 기인하는 것으로 생각된다.

북방전복 hemolymph 내 칼슘 농도는 2주 후에 비소 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적으로 감소하였고, 반면 마그네슘 농도는 비소 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적으로 증가하였다. 일반적으로 Ca과 Mg은 삼투압에 따라 생리학적으로 상호 보완적인 작용을 하는 원소로서(Hur *et al.*, 2001; 민 등., 2014) 어류인 경우에는 4:1 정도가 적절한 비율이다(Luo, 2016). 본 실험에서도 비소 노출로 인해 칼슘의 농도가 감소하면서 이를 보완하기 위해 마그네슘이 증가한 것으로 추정된다. 또한 북방전복 hemolymph의 GOT 활성은 비소 40 µg/L 이상의 농도, LDH 활성은 비소 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적인 증가를 보였다. 동물의 아미노전이효소인 GOT, GPT 및 LDH는 세포조직, 특히 간세포 조직의 손상에 대한 지표로 활용되며(Koh and Choi, 1987; 조, 2005) 유해화학물질 등에 노출된 동물은 간세포의 손상에 의해 이들 효소가 혈액 속으로 다량 유리되어 활성이 증가하게 된다. 따라서 북방전복의 GOT 및 LDH의 증가는 간췌장의 손상에 의해 hemolymph 내로 이들 효소가 유리된 결과라고 생각된다.

항산화효소(antioxidant enzyme)는 체내 자연적으로 생성되는 효소로 중금속에 노출될 경우 ROS(Reactive oxygen species, 활성산소) 및 Oxygen free radical(유해산소)에 대한 촉매작용을 통하여 산화반응을 억제하는 효소이다. SOD(superoxide dismutase), CAT(catalase), GPx(glutathione peroxidase), glutathione reductase, peroxiredoxin 등이 있으며, SOD, CAT 및 GPx는 신체의 방어 기작에서 산화 스트레스를 퇴치하는 중요한 역할을 하는 항산화효소이다(Kharroubi *et al.*, 2014). SOD는 초과산이온(O₂⁻)을 산소(O₂)와 과산화수소(H₂O₂)로 전환하여 초과산이온이 가지고 있는 free radical anion의 해로운 영향을 방어하는 역할을 한다. 이때 발생한 과산화수소를 CAT의 기작으로 물(H₂O)과 산소(O₂)로 분해하여 해독작용을 한다.

비소(As³⁺)에 노출된 북방전복 간췌장의 SOD 활성은 2주 후에 비소 80 µg/L의 농도, 4주 후에 비소 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적으로 증가하였고, 아가미의 SOD 활성은 4주 후에 비소 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적인 증가가 확인되었다. 또한 간췌장의 CAT 활성은 2주 후에 비소 80 µg/L의 농도, 4주 후에 비소 40 µg/L 이상의 농도에서 유의하게 증가하였고, 아가미의 CAT 활성은 4주 후에 60 µg/L 이상의 비소 농도에서 유의적인 증가를 나타냈다.

Freitas, R *et al.*(2016)는 바지락(*Ruditapes philippinarum*)의 비소 농도가 증가할수록 산화 스트레스를 발생시킨다고 하였고, Duarte *et al.* (2011)는 칠레홍합(*Mytilus edulis chilensis*)의 조직에서 카드뮴(Cd), 구리(Cu) 및 아연(Zn) 등 중금속 농도가 증가하면 CAT 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 북방전복의 항산화효소 활성의 증가는 비소 노출에 따라 산화스트레스에 기인된 결과라고 생각된다.

비소(As³⁺)노출에 따른 북방전복의 lysozyme 활성은 hemolymph와 간췌장 모두 4주 후에 20 µg/L 이하의 비소 농도에서는 유의적인 변화가 없다가 40 µg/L 이상의 비소 농도에서 유의적인 감소를 보였고, phenoloxidase 활성의 변동은 관찰되지 않았다. Lysozyme은 양이온성 단백질로 면역, 항균 작용 및 항바이러스 활성을 포함하는 방어 기작에 관여하며, phenoloxidase(PO)는 pro-PO system에 존재하는 말단 효소로 세포 간 정보를 전달하고 체내 세균을 제거하는 역할을 한다(Mai and Wang, 2010). 따라서 북방전복의 lysozyme 활성의 감소는 비소에 대한 방어 기작에 기인하여 감소한 것으로 생각된다.

결론적으로 비소(As³⁺)에 노출된 북방전복(*Haliotis discus hanni*)은 체내의 비소 축적에 의해 hemolymph의 유기, 무기 성분 및 효소 활성의 유의한 변동을 일으키고, 산화스트레스를 유발하며, 비특이적 면역에도 영향을 미칠 것으로 판단된다. 따라서 본 연구 결과, 북방전복의 서식지 및 양식 환경에 적어도 비소 농도 60 µg/L 이상에서 4주 이상 노출될 경우 생리, 생화학 및 면역학적 측면에서 악영향을 받을 것으로 예상된다.

V. 요약

비소는 무기비소의 형태로 자연계에 존재하며 중금속과 성질이 유사하다. 주로 공업이나 농업에 의해 발생된 비소가 주변의 토양과 하천 등을 오염시켜 바다로 흘러오면서 수생생물에게 피해를 입힌다. 패류는 부착생물로서 유영하는 어류보다 오염된 수계에 대한 영향을 받기 쉽다.

본 연구의 목적은 북방전복에 대해 수계 노출된 비소가 미치는 영향으로 전복의 체내 축척 및 생리적 변화를 확인하기 위해 대조구인 Control을 포함하여 10, 20, 40, 60 및 80 µg/L 의 농도로 4주의 기간 동안 비소 노출 실험하였다.

비소(As³⁺)에 노출된 전복의 체내 축적량은 간췌장, 아가미, 근육 순이었으며 고농도 장기노출일수록 축적량은 증가하였고, 근육은 다른 조직보다 다소 낮은 축적을 확인하였다.

Hemolymph 내 유기, 무기 성분 및 효소 활성의 변화를 관찰하였다. TP와 T-Cho는 노출실험 2주와 4주 모두 유의적 변화를 보이지 않았다. GL은 대조구를 제외한 2주와 4주 40 µg/L 이상의 농도에서 유의적 증가를 확인하였다. Ca은 노출실험 2주에서 80µg/L 농도와 4주 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적 감소를 나타냈고, 반면 Mg은 노출실험 4주 60 µg/L 이상의 농도에서 유의적 증가를 나타냈다. 그러나 P는 유의적 차이가 없었다. GOT는 노출실험 2주 80µg/L의 농도에서 유의적 변화를 보이다가 노출실험 4주에서는 40 µg/L이상의 농도에서 유의적 증가를 관찰하였고, GPT는 유의성은 인정되지 않았지만 농도가 증가하고 노출기간이 길어질수록 점차 증가하는 경향을 나타냈다. LDH는 노출실험 2주 80μg/L의 농도에서부터 증가하다가 노출실험 60 μg/L 이상의 농도에서 유의적인 큰 증가를 나타냈다.

항산화 반응으로 간췌장과 아가미의 SOD와 CAT를 관찰하였다. SOD는 간췌장에서 노출실험 2주 80 μg/L의 농도에서 증가를 나타냈고 4주 60 μg/L 이상의 농도에서 유의적 증가를 확인하였다. 아가미에서는 노출실험 4주 60 μg/L 이상의 농도에서 유의적 증가를 확인하였다. CAT는 간췌장에서 노출실험 2주 80 μg/L의 농도에서 증가를 보이다가 4주 40 μg/L 이상의 농도에서 유의적 증가를 나타냈다. 아가미에서는 노출실험 4주 60 μg/L 이상의 농도에서 유의적 증가를 확인했다.

비특이적 면역 반응으로 Hemolymph 와 간췌장의 Lysozyme 활성과 Phenoloxidas 활성을 관찰하였다. Lysozyme 활성은 Hemolymph 와 간췌장 모두 노출실험 4주 40 µg/L의 농도에서 유의적 감소를 확인하였고, Phenoloxidase 활성은 유의적 변화는 없었지만 비소 농도가 증가할수록 감소하는 변화를 확인하였다.

VI. 참고문헌

- Altikat, S., Uysal, K., Kuru, H. I., Kavasoglu, M., Ozturk, G. N., & Kucuk, A. (2015). The effect of arsenic on some antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in various tissues of mirror carp (Cyprinus carpio carpio). *Environmental Science* and Pollution Research, 22(5), 3212-3218.
- Arnot, J. A., & Gobas, F. A. (2006). A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, 14(4), 257-297.
- Auffret, M., & Oubella, R. (1994). Cytometric parameters of bivalve molluscs: effect of environmental factors. *Modulators* of fish immune responses, 1, 23-32.
- Balasubramanian, J., & Kumar, A. (2013). Effect of sodium arsenite on liver function related enzymes of cat fish Heteropneustes fossilis and its chelation by zeolite. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(2), 53-58.
- Barciela-Alonso, M. C., Bermejo-Barrera, P., Feldmann, J., Raab, A., Hansen, H. R., Bluemlein, K., ... & Jensen, K. B. (2016). Arsenic and As Species. *Metallomics: Analytical Techniques* and Speciation Methods.

Bowers, G. N. and Y. Takenaka (1963). Lactic Dehydrogenase.

Standard Methods of Clinical Chemistry, Vol. 4,163-172.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bryan, G. W., & Langston, W. J. (1992). Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environmental pollution*, 76(2), 89-131.
- Cheng, T. C. (1988). In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of Crassostrea virginica: total and differential cell counts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 51(3), 207-214.
- Cheng, W., Hsiao, I. S., Hsu, C. H., & Chen, J. C. (2004). Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone Haliotis diversicolor supertexta and its susceptibility to Vibrio parahaemolyticus. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(3), 235-243.
- Coles, J. A., Farley, S. R., & Pipe, R. K. (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel Mytilus edulis resulting from exposure to cadmium. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22(1), 59-65.
- Crecelius, E. A. (1977). Changes in the chemical speciation of arsenic following ingestion by man. *Environmental Health*

Perspectives, 19, 147-150.

- Depledge, M. H., & Rainbow, P. S. (1990). Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 97(1), 1-7.
- Duarte, C. A., Giarratano, E., Amin, O. A., & Comoglio, L. I. (2011). Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (Mytilus edulis chilensis) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Marine pollution bulletin*, 62(8), 1895–1904.
- Figueira, E., Cardoso, P., & Freitas, R. (2012). Ruditapes decussatus and Ruditapes philippinarum exposed to cadmium: toxicological effects and bioaccumulation patterns. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(2), 80-86.
- Freitas, R., Salamanca, L., Velez, C., Wrona, F. J., Soares, A. M., & Figueira, E. (2016). Multiple stressors in estuarine waters: effects of arsenic and salinity on Ruditapes philippinarum. *Science of the Total Environment*, 541, 1106-1114.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handlinger, J., & Goulias, J. (2014). Effects of severe heat stress on immune function, biochemistry and histopathology in farmed Australian abalone (hybrid Haliotis laevigata× Haliotis rubra). Aquaculture, 432, 26-37.

- Gao, X., Zhang, M., Li, X., Song, C., & Liu, Y. (2017). Physiological metabolism of Haliotis discus hannai Ino under different light qualities and cycles. *Aquaculture research*, 48(7), 3340-3355.
- Ghiasi, F., Mirzargar, S. S., Badakhshan, H., & Shamsi, S. (2010). Effects of low concentration of cadmium on the level of lysozyme in serum, leukocyte count and phagocytic index in Cyprinus carpio under the wintering conditions. *Journal of fisheries and Aquatic Science*, 5(2), 113-119.
- Goto, D., & Wallace, W. G. (2010). Relative importance of multiple environmental variables in structuring benthic macroinfaunal assemblages in chronically metal-polluted salt marshes. *Marine pollution bulletin*, 60(3), 363-375.
- Gustafson, L. L., Stoskopf, M. K., Showers, W., Cope, G., Eads, C., Linnehan, R., ... & Levine, J. F. (2005). Reference ranges for hemolymph chemistries from Elliptio complanata of North Carolina. *Diseases of aquatic organisms*, 65(2), 167-176.
- Kharroubi, W., Dhibi, M., Haouas, Z., Chreif, I., Neffati, F., Hammami, M., & Sakly, R. (2014). Effects of sodium arsenate exposure on liver fatty acid profiles and oxidative stress in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(3), 1648-1657.
- Koh, J. Y., & Choi, D. W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by

lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of neuroscience methods*, 20(1), 83-90.

- Lei, Y., Zhang, W., Xu, W., Zhang, Y., Zhou, H., & Mai, K. (2015). Effects of waterborne Cu and Cd on anti-oxidative response, lipid peroxidation and heavy metals accumulation in abalone Haliotis discus hannai ino. *Journal of Ocean University of China*, 14(3), 511-521.
- Lockey, T. D., & Ourth, D. D. (1996). Purification and characterization of lysozyme from hemolymph of Heliothis virescens larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220(3), 502-508.
- Luo, S., Wu, B., Xiong, X., & Wang, J. (2016). Effects of total hardness and calcium: magnesium ratio of water during early stages of rare minnows (Gobiocypris rarus). *Comparative medicine*, 66(3), 181-187.
- Mai, W. J., & Wang, W. N. (2010). Protection of blue shrimp (Litopenaeus stylirostris) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. *Fish & shellfish immunology*, 28(4), 727-733.
- Nriagu, J. and J.M. Pacyna, 1988. Quantitative Assessment of Worldwide Contamination of Air, Water and Soils by Trace Metals. Nature 333(6169): 134-9.
- Rahman, M. M., Ng, J. C., & Naidu, R. (2009). Chronic exposure of arsenic via drinking water and its adverse health impacts

on humans. *Environmental geochemistry and health*, *31*(1), 189–200.

- Rainbow, P. S. (1997). Trace metal accumulation in marine invertebrates: marine biology or marine chemistry?. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 77(1), 195-210.
- Rainbow, P. S. (2002). Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?. *Environmental pollution*, 120(3), 497-507.
- Rodr I guez, V. M., Jimenez-Capdeville, M. E., & Giordano, M. (2003). The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology letters*, 145(1), 1-18.
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2001). Source and behavior of arsenic in natural waters. United Nations synthesis report on arsenic in drinking water. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www. who. int/water_sanitation_health/dwg/arsenicun1. pdf, 1-61.
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied geochemistry*, 17(5), 517–568.
- Smith, E. R. G., Naidu, R., & Alston, A. M. (1998). Arsenic in the soil environment (Doctoral dissertation, Academic Press).
- Sun, H. J., Rathinasabapathi, B., Wu, B., Luo, J., Pu, L. P., & Ma,L. Q. (2014). Arsenic and selenium toxicity and their

interactive effects in humans. *Environment international*, *69*, 148–158.

- Taylor, D., Maddock, B. G., & Mance, G. (1985). The acute toxicity of nine 'grey list' metals (arsenic, boron, chromium, copper, lead, nickel, tin, vanadium and zinc) to two marine fish species: dab (Limanda limanda) and grey mullet (Chelon labrosus). Aquatic Toxicology, 7(3), 135-144.
- Tromp, J. J., Jones, P. L., Brown, M. S., Donald, J. A., Biro, P. A., & Afonso, L. O. (2018). Chronic exposure to increased water temperature reveals few impacts on stress physiology and growth responses in juvenile Atlantic salmon. *Aquaculture*, 495, 196-204.
- Truscott, R., & White, K. N. (1990). The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Functional Ecology*, 455-461.
- Ure, A. M., & Berrow, M. L. (1982). The elemental constituents of soils. *Environmental chemistry*, *2*, 94–204.
- Ventura-Lima, J., de Castro, M. R., Acosta, D., Fattorini, D., Regoli, F., de Carvalho, L. M., ... & da Silva, R. S. (2009).
 Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish Danio rerio (Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(4), 538-543.

Viant, M. R., Rosenblum, E. S., & Tjeerdema, R. S. (2003).

NMR-based metabolomics: a powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. *Environmental science & technology*, *37*(21), 4982-4989.

- Wang, L., & Xu, Z. R. (2006). Effects of arsenic (AsIII) on lipid peroxidation, glutathione content and antioxidant enzymes in growing pigs. Asian-australasian journal of animal sciences, 19(5), 727-733.
- Wang, W., Mai, K., Zhang, W., Ai, Q., Yao, C., Li, H., & Liufu, Z. (2009). Effects of dietary copper on survival, growth and immune response of juvenile abalone, Haliotis discus hannai Ino. Aquaculture, 297(1-4), 122-127.
- World Health Organization, 2001. Environmental Health Criteria 224. ARSENIC AND ARSENIC COMPOUNDS. 2nded.114pp.
- World Health Organization, 2001. Environmental Health Criteria 224: ARSENIC AND ARSENIC COMPOUNDS. Second edition. 321p (http://www.who.int/iris/handle/10665/42366).
- Wu, C., Zhang, W., Mai, K., Xu, W., & Zhong, X. (2011). Effects of dietary zinc on gene expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in hepatopancreas of abalone Haliotis discus hannai. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(1), 1-6.

- 민은영, 이정식, 곽인실, 김재원 & 강주찬. (2014). 카드뮴 노출에 따른 북방전복, Haliotis discus hannai (Ino, 1953) 의 hemolymph 및 hepatopancreas 의 효소활성의 변화. *The Korean Journal of Malacology*, *30*(1), 41-49.
- 민은영, 차용주 & 강주찬. (2017). 니켈 (NiCl₂) 및 수온 스트레스에 의한 북방전복, Haliotis discus hannai (Ino, 1953) 의 생리학적 변화. *The Korean Journal of Malacology*, *33*(4), 213-222.
- 조아라. (2016). HPLC-AFS를 이용한 해산물, 농산물 및 요 중 비소 화학종 분리정량. *순천향대학교 대학원*
- 최우석, 윤민철, 조미라, 권지영, 김지회, 이희정 & 김풍호. (2017). 가리비 (Patinopecten yessoensis) 및 키조개 (Atrina pectinata)
 - 의 부위별 중금속 함량 및 위해도 평가. *한국수산과학회지*, *50*(5), 487-493.
- 통계청,http://www.nso.go.kr/nso2006/k04__0000/k04g_0000/k04gb_0000/k04gbj0020/k04gbj0020.html
- 황동운, 김평중, 정래홍 & 윤상필. (2013). 목포-해남 연안 조간대 퇴적물 중 유기물 및 미량금속 분포 특성. *한국수산과학회지*, 46(4), 454-466.