

Research Paper

## 퇴적물 용출수를 이용한 오염 퇴적물의 생물영향평가 가능성과 방향: 요각류 유생의 성장 및 분자생체지표의 활용

원은지\* · 강예희\*,\*\*

한국해양과학기술원 환경기반연구센터\*, 과학기술연합대학원대학교 해양융합과학과\*\*

### Potential and Future Directions of Effect Assessment of Polluted Sediment Using Sediment Elutriates: Effects on Growth and Molecular Biomarkers on Marine Copepod

Eun Ji Won\* · Yehui Gang\*,\*\*

Korea Institute of Ocean Science and Technology\*  
University of Science and Technology\*\*

**요약** : 오염퇴적물의 생물영향평가를 위해 다양한 생물검정 연구가 수행되고 있다. 퇴적물에 직접 노출시키는 평가 방법은 실험과정 동안 섭식 및 섭식에 의한 생물의 영향을 배제할 수 없으며 관찰을 위한 실험 생물이 대형생물 또는 저서성 생물에 제한되는 등의 한계가 있다. 본 실험에서는 짧은 생활사를 가지며 많은 연구에서 독성 결과가 축적되어 있는 요각류와 퇴적물의 용출수를 이용해 생물영향평가의 가능성을 확인하고자 하였다. 오염의 정도가 다른 두 정점의 퇴적물 용출수에 해산 요각류를 노출시켜 개체 및 분자 수준에서 관찰되는 변화를 측정하고 결과 해산 요각류의 유생의 성장과 분자생체지표의 발현에서 오염된 퇴적물의 용출수에서 대조군과 유의한 차이를 보였다. 분자생체지표의 발현은 용출수의 희석 정도와 노출 시간에 의존적인 경향을 나타내 용출수를 이용한 생물영향평가의 가능성을 보여주었다. 본 논문 결과를 바탕으로 퇴적물의 오염 및 생물영향평가에 있어 용출수 노출시험이 오염물질의 정량적 분석결과를 보완할 수 있는 방법으로 이용될 수 있을 것을 확인하였으며 향후 많은 자료의 축적과 활용성에 대한 평가 및 기준이 제시되어야 한다고 제안한다.

**주요어** : 퇴적물 용출수, 퇴적물평가, 만성독성, 요각류, *Paracyclops nana*

**Abstract** : Several bioassays have been performed for assessment of the impact of polluted sediments. The direct exposure method using sediments is limited by difficulty controlling feeding

First Author: Eun Ji Won, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Ansan, Republic of Korea 15627 Tel: +82-31-400-7734 E-mail: ejwon@kiost.ac.kr

Corresponding Author: Eun Ji Won, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Ansan, Republic of Korea 15627 Tel: +82-31-400-7734 E-mail: ejwon@kiost.ac.kr

Co-Author: Yehui Gang, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Ansan, Republic of Korea 15627 Tel: +82-31-400-7734 E-mail: yehui@kiost.ac.kr

Received: 30 May, 2017. Revised: 23 June, 2017. Accepted: 26 June, 2017.

and its effects on organisms. Furthermore, only macro-organisms and benthic organisms are used. To evaluate the potential application of sediment elutriate as a complementary strategy for impact assessment, copepods, small organisms with a short life cycle, were exposed to sediment elutriates, and several end-points were measured. As a result, sediment elutriates prepared from polluted sites caused growth retardation in marine copepods. In terms of molecular biomarkers, antioxidant-related and chaperone protein gene expression levels were increased in a dose- and time-dependent manner. Thus, we suggest that sediment elutriate tests can provide an effective alternative for toxicity assessment using whole sediment samples. Further studies are required to obtain sufficient data for future applications.

**Keywords :** Sediment elutriates, Sediment evaluation, Chronic exposure, Copepod, *Paracyclopsina nana*

## I. 서론

퇴적물의 오염을 평가하기 위해 다양한 방법의 연구가 수행되고 있다. 퇴적물에 함유되어 있는 오염물질의 농도를 분석하는 것은 물질의 정량적 평가방법으로 가장 신뢰할 수 있으며 잠재적 독성을 갖는 물질의 위해 가능성을 추정할 수 있는 자료가 될 수 있다. 생물 평가는 정량적 분석연구와 병행되어 생물 영향을 측정하여 해석을 보완하고 분석 항목의 검토 및 생물 이용성과 같은 실제 환경에서의 위해성을 평가하는 데에 중요한 자료를 제시하며 최근 그 중요성이 강조되고 있다(Ferraz et al. 2017; Vethaak et al. 2017).

퇴적물을 이용한 생물 평가(또는 독성평가)는 퇴적물 내 오염물질이 야기할 수 있는 생물 영향을 판단하기 위해 수행되며 퇴적물에 존재하는 오염물질의 정량분석과 함께 서식하는 생물에 미치는 영향을 가시적인 결과로 보여준다(Bat & Raffaelli 1998; Ferraz et al. 2017; Vethaak et al. 2017). 실제로 갯지렁이, 이매패류 등 다양한 저서생물을 활용한 퇴적물 노출 실험에서 생물의 운동성, 치사, 생식을 변화 및 공극수를 이용한 발광 박테리아 검정 법 등이 수행되어왔다(Phelps 1989; Bat & Raffaelli 1998; ASTM 2009).

최근 생물 평가분야에서는 분자생체지표를 이용하여 개체보다 민감한 수준에서의 생물 영향을 진단하고 활용하기 위한 연구가 수행되고 있다(Sarkar et al. 2006; Schettino et al. 2012). 분자 수준에서의 생물 평가는 생물독성 및 생태독성연구에 있어 빠른

변화의 진단과 함께 개체수준에서 확인되는 변화에 대한 생물 영향의 시작점(initiating point)을 추정할 수 있게 하여 오염물질의 체내 영향에서 이어질 수 있는 개체 및 군집에의 변화를 예측하는데 이용되기도 한다(Ankley et al. 2010).

그러나 퇴적물 오염 평가를 위한 분자생체지표의 활용은 현장에 서식하는 생물체 내의 생체지표 차이나 현장 퇴적물에 노출시켜 관찰할 수 있는 생물(즉, 대형 저서동물)을 이용한 노출 실험 등에 한 해 수행되고 있으며 이러한 생물의 경우 실험실에서의 생물의 유지와 확보의 어려움이 있다. 또한, 퇴적물에 직접 노출 시키는 평가 방법은 먹이가 될 수 있는 입자에 의한 영향 또는 섭식 경로를 통한 오염물질의 노출에 의한 생물 영향을 배제할 수 없으며(USEPA 1994), 실험 중에도 제약이 있어 관련된 평가를 위해서는 다양한 시도와 신뢰할 수 있는 자료가 요구되는 상황이다(Word et al. 2005).

공극수나 용출수와 같은 퇴적물로부터 확보한 액상의 시료를 이용한 생물 평가는 퇴적물의 오염 상태를 반영하며(Harkey 1994; Haring 2010), 퇴적물을 동시에 노출시키면서 발생할 수 있는 다양한 물리화학적 인자들은 제외시킬 수 있고, 작은 실험 생물을 이용한 실험을 수행할 수 있다는 점에서 장점을 갖는다. 특히 퇴적물의 용출수는 국제표준시험법 중 미국 재료시험학회(American Society for Testing and Materials, ASTM)에서 제시한 실험 방법 중 하나로서 시정액의 처리 처분 평가를 위해 이용되고 있으며

(Ludwig et al, 1989; Moore 2001; USEPA 2016), 토양과 같은 직접 노출이 어려운 매체에 대한 독성 평가 방법으로도 제시되고 있다. 실제로 생물 평가를 위해 오염 토양 및 퇴적물 용출액에서의 발광 박테리아의 생태독성평가 방법을 제시된 바 있으며(ASTM 2009), 토양 분야의 경우 물벼룩을 이용한 생태독성 평가를 위한 용출수 제조에 대한 연구에 대한 검토와 방향에 대한 논의가 있어왔다(Nam & An 2014).

요각류는 많은 연구에서 환경생물학 및 환경독성학에 이용되어왔다(Raisuddin et al, 2007; Dahl 2008; Kwok et al, 2015; Dahms et al, 2016). 해산 요각류 *Paracyclopsina nana*는 최근 방대한 분자생물학적 정보를 바탕으로 다양한 환경 연구에 이용되고 있다(Lee et al, 2015; Dahms et al, 2016). 특히 유사하게 이용되고 있는 타 요각류에 비해 여러 환경 인자에 대한 높은 민감성 및 실험적 용이성이 보고된 바 있으며(Dahms et al, 2016), 배양이 쉽고 현미경 하에서 성장단계의 구분과 분류가 용이하여 성장단계에 따른 시료를 확보하고 생활사 전반에 걸친 종말점(end-point)을 실험의 결과로 이용할 수 있다.

특히 요각류를 이용한 실험은 대형저서생물을 이용한 실험에 비해 실험 동안 요구되는 매체(물 또는 퇴적물)의 양을 제한할 수 있으며 생활사가 짧아서 짧은 관찰 시간 동안 생활사 전반에서의 변화를 관찰하여 생물 영향에 대한 결과 도출 시간을 단축할 수 있다는 장점을 갖는다.

본 논문에서는 오염물질에 대한 생물독성 및 생물 영향평가에 많이 이용되는 해산 요각류의 성장과 분자수준에서의 생체지표를 이용하여 오염의 정도가 상이한 퇴적물 시료의 용출수 노출에 따른 생물 영향 측정의 가능하지 여부를 확인하고, 이를 바탕으로 향후 퇴적물 평가에 용출수와 실험생물의 활용 방향을 제시하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험생물

본 실험에 이용한 해산 요각류 *P. nana*는 현장에

서 채집, 분리하여 약 4년간 한국해양과학기술원 생물 배양실에서 유지하였다. 배양기는 24°C, 12h light/12h dark photoperiod를 유지하였으며, 15 psu (practical salinity unit)의 인공 해수(Instant Ocean Sea Salt, United pet group, Inc. Cincinnati, OH USA)(pH 7.9~8.2)에서 배양하며 먹이로는 조류 *Tetraselmis suecica*를 공급하였다.

### 2. 퇴적물 용출수 제조

퇴적물은 오염 우려 지역인 시화호 상류 정점의 표층 퇴적물(Test, T)과 대조군 시료로 시화호 외측(Control, C)의 표층 퇴적물을 이용하였다. 많은 이전 연구에서 시화호 내측과 외측에서의 퇴적물 내 오염물질(중금속, PAH, PCDD/F) 농도가 유의하게 차이가 난다고 보고된 바 있으며(Shin 2008, Ra et al, 2009; Moon et al, 2012a; Won et al, 2012) 이전 연구는 본 실험에서 이용한 퇴적물 시료를 포함해 시화호 내·외측에서 채취한 표층 퇴적물의 중금속 및 PAHs 농도가 상이함을 보인 바 있다(Shin, 2009). 퇴적물의 중금속 농도는 구리와 아연, 납에 대해 NOAA기준의 ERM (effect range median)을 상회하였으며 노닐페놀과 PAHs의 농도 역시 시화호 내측의 실험군 정점에서 각각 최고 1028 ng/g dw 과 1042 ng/g dw의 높은 농도를 보였다(Shin 2009). 용출수 준비를 위한 오염 퇴적물과 대조군 퇴적물 시료는 동결 건조하여 냉동 보관하였고(-20°C), USEPA에서 제시하는 방법과 최근 연구 논문을 바탕으로 수정하여 제조하였다(USEPA 1991; Novelli et al, 2006). 1:4(w/v)비로 퇴적물과 증류수를 혼합하여 rotary shaker에서 24 시간 동안 혼합한 후 (250rpm), 3000rpm에서 20분간 원심 분리하여 퇴적물과 물을 분리하였다. 이후 0.2µm의 membrane filter를 이용하여 부유 입자를 제거하였다(Figure 1). 용출수의 염분은 염분 측정 굴절계(ATAGO, MASTER-S28M, Japan)를 이용하여 측정 후 실험 생물을 유지한 환경과 동일하도록 고염분(80psu)으로 제조된 stock solution소량을 첨가하여 15psu로 조절하였다. 실험과정 동안 용출수는 필요 시 마다

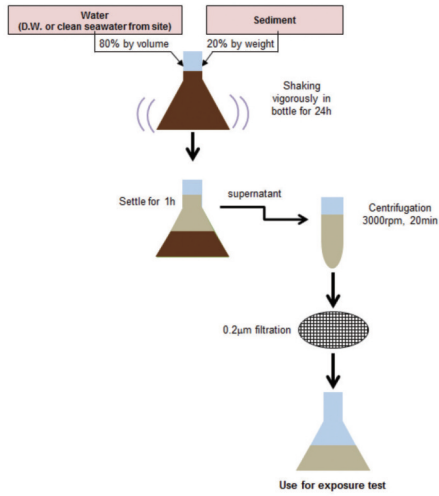


Figure 1. Schematic flow of preparing sediment elutriate using sediment

새롭게 제조하여 이용하였다. 용출수의 생물영향을 확인하기 위하여 퇴적물을 이용하여 준비한 용출수를 100%로 하고, 필요 시 인공 해수와 혼합된 25%, 50%, 75%의 용출수를 만들었다.

### 3. 생물 노출 및 개체영향

급성 노출 실험에는 2세대 배양을 거쳐 생애 첫 번째 알을 가진 성체 암컷을 이용하였다. 이를 위해 150 µm mesh사이즈의 체로 알 주머니(egg sac)를 달고 있는 암컷 성체를 제거한 대량의 생물 시료를 확보하여 다시 12시간 동안 배양 후 150 µm mesh사이즈로 여과하여 알을 달고 있는 개체(> 150µm)를 분리, 현미경 하에서 선별하였다. 노출 실험을 위해서는 12-well 배양판(12-well plate)에 용출수 4mL를 실험용량으로 하여 노출 시킨 후 96시간 동안의 치사율을 관찰하였다.

요각류의 성장 실험은 유생을 이용하여 수행하였다. 유생시료 확보를 위해서 급성실험을 위한 암컷 성체 확보 단계와 같은 절차를 거쳐 생애 첫 번째 알 주머니를 가진 암컷 성체를 분리하고 이로부터 부화한 지 12시간 미만의 유생을 선별하여 이용하였다. 알을 가진 암컷 성체만을 분리하여 12시간 이후 100µm mesh 사이즈의 체로 분리하여 체를 통과한

유생을 분리하였다. 급·만성 실험에는 100%의 용출수를 이용하여 두 시료를 비교하였으며 성장은 12일간 24시간 간격으로 관찰하였다. 10 개체의 유생을 노출 시켰으며 용출수는 3일에 한 번 교환해 주었다. 먹이는 기존 연구에 따라 성장단계별로 공급하였고 3번 반복 수행하였다(Lee 2004).

### 4. 분자생체지표 발현

퇴적물 용출수에 노출된 요각류의 생체지표 분석을 위해 기존 연구에서 발표된 항산화효소 및 환경스트레스에 대해 발현하여 생체지표 가능성이 판단되었던 유전자를 선별하였다(Table 1). mRNA발현을 위한 노출 대상은 copepodid와 성체를 이용하였다. 앞서 준비한 농도가 다른 용출수에 약 500개체를

Table 1. Primer set used in this study (Sequence information of biomarkers was cited from Won et al., 2015 and Han et al. 2015)

Gene	Primer
hsp40	F: CGCACCTCATCATACAGAC
	R: TGATGAGCTTGCCCTTCTC
hsp60	F: GCCTGTTGCCAACGAAGAC
	R: CTCGATGACCTTGTTAACAAATGAC
hsp70	F: AACCAACCTGCTGTACCATC
	R: CAGGAGGATGCCAGTCAAG
hsp90	F: CTGCATTGTCACCTCTCAGTATG
	R: GCTGTGGTCAGGGTTGATTC
CuZn-SOD	F: ATGGTTTCCACGTGCATGAG
	R: CACCGCATGCCTAGTTTC
Mn-SOD	F: GGCAGCTATTTCAGAGACTTTG
	R: TAGCCAACCATCCCCATC
Catalase	F: TACAGGACTCAGGTGAAGAATACTAC
	R: TTCCTGCCGTCGTCATTAG
GR	F: GGGCGAAAGTTGGCACATAG
	R: GTGATGCCACACGTTTCTATC
GST-omega	F: CATGGATGGAGAGAGTGGAAATC
	R: GCACAACAGGATCTTCCTTCATAG
GST-mu	F: ATTGAGGCTGGAACCAATTGAC
	R: GCCTTGATGTGATCACCCCTTG
GST-zeta	F: TACTCGGGCAAATACTGTGTG
	R: AATTCTGTTGATGTTATGGAATG
CYP3027F1	F: GGAAGTGCAGGAAAGGCTGTAC
	R: CCGGTCGTGTTTCAGTCAAAG
18s rRNA	F: TGTGTGATTGACGGAGGTTTC
	R: GCGTATTAAGCCTGCTTTGAG

노출 시켜 24시간째 농도(0, 25, 50, 75, 100%)에 따른 발현 변화를 관찰하였다. 그리고 농도에 따라 유의하게 발현 한 유전자에 대해 추가로 시간에 따른 발현을 확인하기 위해 실험군 시료로 제조한 100%의 용출수에 6, 12, 24, 48시간 동안 요각류를 노출 시킨 후 노출 시간에 따른 RNA 시료를 확보하였다.

Total RNA는 TRIZOL<sup>®</sup> 시약을 이용하여 추출하고, 1 $\mu$ g의 RNA를 이용하여 cDNA를 제작하였다(SuperScript III RT kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 분자생체지표로는 *P.nana*에서 기 연구된 12개의 항산화 및 오염물질에 반응하는 유전자를 대상으로 하여 primer를 제작하고 실시간 증합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR, AriaMx Real-Time PCR System G8830A, Serial No. MY15245245, Agilent Technologies)을 수행하였다(Table 1). 분석은 3회 반복하였으며 housekeeping 유전자는 *18s rRNA*를 이용하였다. 발현량은  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method를 이용하여 계산하였다(Livak & Schmittgen 2001).

## 5. 통계분석

결과는 평균과 표준편차로 표시하였다. 결과의 등분산검정에는 Levene 검정법을 이용하였으며, 농도 및 시간에 따른 평균 비교는 Tukey의 사후검정 분석을 따랐다(one-way ANOVA,  $p < 0.05$ ). 오염의 정도가 다른 두 정점의 퇴적물 노출에 대한 성장 및 분자생체지표의 발현 차이는 student *t*-test를 이용하였다( $p < 0.05$ ). 통계 프로그램은 SPSS를 이용하였다(SPSS<sup>®</sup> version 23.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)).

## III. 결과

### 1. 급만성 생물 영향시험

실험 동안 실험군과 대조군에서 치사율이 관찰되지 않았다(96h,  $p > 0.05$ ). 12일 동안 관찰에서 보여진 유생의 성장 단계별 조성은 N1-N3, N4-N6(유생, Nauplius 1-6), C1-C2(copepodid1-2), C3-C4(copepodid3-4), 성체(adult)의 총 5단계로 나누

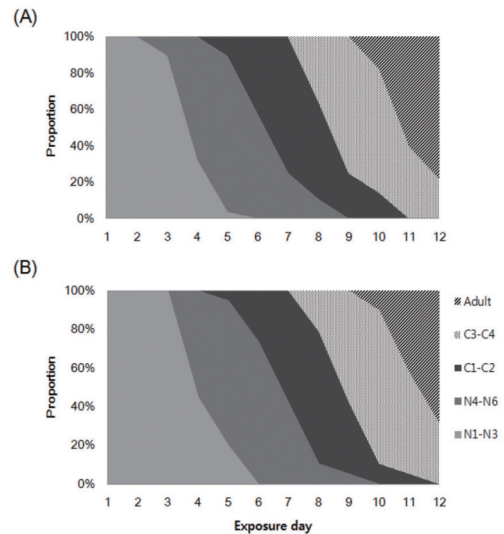


Figure 2. The proportion of developmental phase of *Paracyclopsina nana* exposed to (A) control and (B) test sediments elutriates

어 나타내었다(Figure 2). 대조군(control)에 노출된 유생은 12일간의 노출 동안 치사한 개체가 관찰되지 않았으나 실험군(test)에서는 copepodid 단계까지 성장하지 못하고 유생단계에서 죽는 개체를 확인할 수 있었으며, 12일 동안 약  $36 \pm 11.5\%$ 의 치사율을 보였다. 실험군은 대조군에 비해 1~2일가량의 저해된 성장률을 보였고 성체까지 성장 개체의 비율은 대조군에서는  $78.6 \pm 2.1\%$ , 실험군에서는  $68.4 \pm 1.5\%$ 로 유의한 차이를 보였다(Figure 2,  $p < 0.05$ ).

### 2. 분자생체지표의 발현

해산 요각류 *P. nana*의 분자생체지표는 산화스트레스에 대한 반응, 단백질 샤페론 기능에 관여하는 열충격 단백질(heat shock protein), Phase I 관련 CYP450 효소로 나누어 그 발현 변화를 확인하였다. 실험군의 요각류는 대부분의 모든 유전자에서 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였다(Figure 3,  $p < 0.05$ ). 특히, *GST-omega*는 최대 3배의 발현 증가를 보였으며, 그 밖에도 *CuZn-SOD*, *hsp70*, *CYP450* 유전자는 1.5배 이상의 증가를 보였다. 그러나 대조군 퇴적물(control)에서는 대부분의 유전자에서 농도에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다. 시

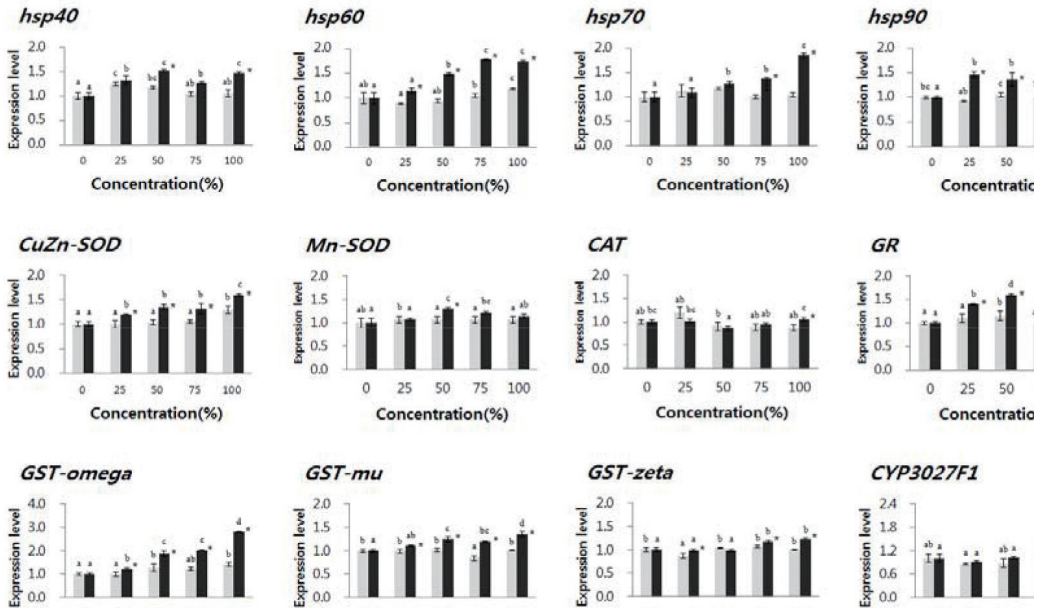


Figure 3. Relative expression levels of 12 different molecular biomarkers genes in copepod *Paracyclopsina nana* exposed to control and test sediment elutriates (asterisks and different letters indicate significant differences in expression levels between control and test group ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ) and according to exposure doses by ANOVA test (Tukey's post hoc test,  $p < 0.05$ ), respectively

간에 따른 mRNA 수준에서의 발현 변화는 농도에 대한 실험에서 유의한 증가를 보이는 4개의 유전자 (*hsp70*, *CuZn-SOD*, *GST-omega*, *CYP3027F1*)에 대해 실험군 시료를 대상으로 분석하였다. 모든 지표 유전자에서 시간 유의하게 증가하는 경향을 보

였다(Figure 4). *GST-omega*의 경우 48시간째 최대 3배 가량 발현이 증가하였고, *CuZn-SOD*의 mRNA 발현은 24시간째 가장 높은 증가를 보였으며, 48시간 시료는 12시간과 비슷한 발현을 보였다(Figure 4).

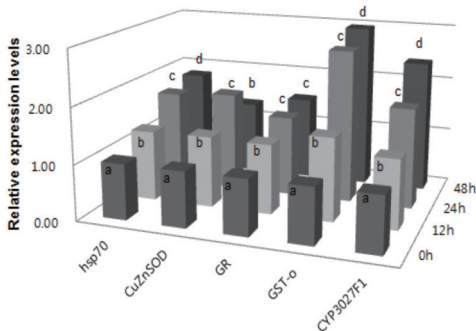


Figure 4. Effects of sediment elutriate on molecular biomarker genes according to exposure time (h). Significant differences according to the exposure times were analyzed by ANOVA (Tukey's post hoc test;  $p < 0.05$ ). Different colors of each bar indicate different samples in exposure time (0, 12, 24, and 48h).

#### IV. 결론

본 논문에서는 오염의 정도가 다른 두 퇴적물 시료의 용출수에 해산 요각류를 노출시켜 개체 및 분자수준에서의 영향을 관찰하였다. 용출수 노출에 대해서는 치사를 관찰이 되지 않았으나 성장 관찰을 위해 유생을 노출 시킨 경우 유생(Nauplius) 1-3 단계에서 탈피 하지 못하고 죽는 개체를 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 유생의 민감성을 보여주며 유생을 이용한 민감한 수준에서의 급성독성실험의 적용 가능성을 시사한다. 실제로 요각류 *Tisbe biminiensis*의 유생을 이용한 해수 노출 실험에서 아연에 대한 노출에 성체보다 민감한 결과를 보여주어 해수와 같

은 낮은 농도의 생물 영향을 측정하기 위한 방법으로 제시되기도 하였다(Lavorante et al, 2013). 요각류의 성장은 성장 단계별 탈피를 통해 이루어지며 모양과 크기가 변해 관찰과 구별이 용이하다(Dahms et al, 2016). 특히 실내 배양 조건에서 일반적으로 1-2일에 한 단계의 성장을 보여 약 2주 동안 24시간 간격의 관찰로 유생부터 성체까지의 전주기 관찰을 가능하게 한다(Won et al, 2014). 성장의 지연은 정상적인 체내활동이 저해됨을 보여주는 지표가 되며 용출수에 노출된 요각류에서 관찰된 성장 지연은 퇴적물의 오염물질에 의한 영향으로 판단된다.

대조군과 달리 실험군에서 나타난 항산화기작 관련 유전자가 농도 의존적으로 발현하는 결과 역시 퇴적물 내 오염물질(중금속 등)이 요각류 체내에서 산화스트레스를 유발했음을 시사한다. 산화스트레스와 단백질 사폐론 관련 유전자에 대한 요각류의 반응은 이미 많은 논문에서 생체지표로서의 가능성이 시사된 바 있다(Won et al, 2014a; Won et al, 2014b). 특히 *P.nana*의 *GST*, *GR*, *Hsp* 등의 유전자는 이전 연구에서 아치사 농도의 금속 노출에 대해 유사한 결과를 보인 바 있다(Lee et al, 2012).

PAHs와 같은 유기오염물질의 해독 기작과 관련된 Phase I 효소인 CYP450 계열 유전자 *CYP3027F1*의 발현은 용출수 내의 유기오염물질의 존재 때문으로 보여진다. 실제로 실험에 이용한 퇴적물을 채취한 시화호의 표층퇴적물은 최근 많은 연구에서 중금속과 PAHs, PCB 이외에도 PBDE, PCDD/Fs와 같은 신규 오염물질이 상당한 농도로 분석되고 있다(Moon et al, 2012a; Moon et al, 2012b). 따라서 용출수를 이용한 실험 결과는 퇴적물에 존재하는 오염물질이 특정 조건에서 생물에게 미칠 수 있는 복합적인 영향을 보여주어 영향 기반 모니터링(effect-based monitoring)기법을 위한 매체로서의 활용 가능성을 보여준다. 실제로 퇴적물의 용출수와 패시브 샘플러(passive sampler)의 추출물을 이용한 생물평가에서 퇴적물에서 정성 및 정량평가를 하지 않은 생물 영향 물질에 대한 가능성을 평가할 수 있음이 시사된 바 있다(Vathaak et al, 2017).

본 논문에서 비록 용출수에서 오염물질의 농도를

분석하여 생물 반응과 직접 비교하지는 않았으나 실험군과 대조군 시료에서의 생물 반응 차이를 통해 오염된 퇴적물의 용출수 오염에 대한 생물 반응이 오염을 비교하고 생물 영향을 추정하는 데에 화학적인 분석의 보완적인 방법으로 사용될 수 있음을 확인하였다. 실제로 용출수를 이용한 연구들에서는 그 제조 방법에 따라 또는 오염물질의 존재 형태에 따라 용출수의 오염물질 농도가 다를 수 있음을 언급하였다(Nam & An 2014). 이번 실험 역시 용출수 제작을 통한 노출은 유기오염물질의 분배계수(log Kow)에 따라 수층으로의 용출 정도가 다를 수 있을 것이기에 해산 요각류에서 관찰된 이러한 생체지표의 변화는 용출수에 존재하는 다양한 오염물질이 미치는 복합적인 영향으로 해석해 볼 수 있다. 이는 용출수를 이용한 실험이 오염물질에 대한 단독적인 평가로 이어지는 데에 있어서의 한계를 가지며 매체에 대한 평가 방법의 하나로 이용되어야 함을 보여준다. 실제 용출수를 이용한 유사 연구들이 퇴적물과 수분의 함량비, 용출 단계의 속도, 온도, 여과 여부 등에 다양한 기준을 가지고 적용하고 있기 때문에 이러한 실험적 가변성이 퇴적물의 물리화학적 특징에 따라 용출수의 오염물질 농도에 영향을 미칠 수 있음을 간과해서는 안 될 것이다. 또한, 오염의 생물 영향 경로가 수계를 통한 노출(water phase exposure)로 제한된다는 점을 감안하여 볼 때 실제 퇴적물에 서식하고 섭식을 통한 노출 가능성이 있는 생물에 대해서는 더 큰 영향이 있을 수 있을 수 있다고 예측된다. 그리고 오염물질의 존재와 결합 형태에 따라 퇴적물에서 물 층으로 용출될 수 있는 부분이 달라질 수 있기 때문에 이에 대한 정확한 판단을 위해서는 퇴적물 시료의 전함량 분석이 아닌 생물이용성을 고려한 화학 분석 결과가 함께 비교되어야 할 필요성이 있을 것으로 판단된다.

## V. 고찰

본 실험에서는 퇴적물의 생물영향평가를 위한 용출수 노출 실험의 가능성을 평가하고자 오염의 정도가 다른 두 정점의 표층 퇴적물을 이용해 만든 용출수에 해산 요각류를 노출시켜 생물의 개체 및 분자 수

준에서 변화를 관찰하였다. 그 결과 유생의 성장과 분자생체지표의 발현에서 오염된 퇴적물의 용출수에서 대조군과 유의한 차이를 보였고 용출수의 희석 정도와 노출 시간에 따라서 농도와 시간 의존적인 발현 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 용출수를 이용한 생물영향평가의 가능성을 보여주며, 향후 퇴적물의 오염 및 생물영향평가에 있어 오염물질의 정량적 분석 방법과 함께 보완적인 방법으로 이용 될 수 있을 것이라 사료된다. 그러나 다양한 연구 사례를 바탕으로 보았을 때 용출수를 이용한 기존 연구에서의 용출수 제작 방법(퇴적물 대 용매의 비율, 혼합방법, 시간, 광주기, 분리방법, 여과 및 원심분리 속도 등)이 다양하고 시료에 존재하는 오염물질의 존재 형태에 따라 용출수의 화학적 조성에 가변성이 있을 수 있기 때문에 보다 많은 자료의 축적을 통해 향후 활용성에 대한 평가와 활용 기준이 제시되어야 한다고 판단된다.

## 사 사

이 논문은 한국연구재단(2012R1A6A3A01039126/2015R1C1A2A01053437)의 지원을 받아 수행하였습니다.

## References

- Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW, Johnson RD. 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem.* 29: 730-741.
- American Society for Testing and Materials (ASTM) 2009, D5660-96 Standard test method for assessing the microbial detoxification of chemically contaminated water and soil using a toxicity test with a luminescent marine bacterium, ASTM International, United States, p. 1-9.
- Bat L, Raffaelli D. 1998. Sediment toxicity testing: a bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina*. *J Exp Mar Biol Ecol.* 226(2): 217-239.
- Dahl U. 2008. Integrating biochemical and growth responses in ecotoxicological assay with copepod. Ph.D. dissertation, Stockholm University, Sweden.
- Dahms HU, Won EJ, Kim HS, Han J, Park HG, Souissi S, Raisuddin S, Lee JS. 2016. Potential of the small cyclopoid copepod *Paracyclopsina nana* as an invertebrate model for ecotoxicity testing. *Aquat Toxicol.* 180:181-194.
- Ferraz MA, Alves AV, Muniz CC, Pusceddu FH, Gusso-Choueri PK, Santos AR, Choueri RB. 2017. Sediment toxicity identification evaluation (TIE phases I and II) based on microscale bioassays for diagnosing causes of toxicity in coastal areas affected by domestic sewage. *Environ Toxicol Chem.* DOI: 10.1002/etc.3824. *In press*
- Han J, Won EJ, Kim HS, Nelson DR, Lee SJ, Park HG, Lee JS. 2015. Identification of the full 46 cytochrome P450 (CYP) complement and modulation of CYP expression in response to water-accommodated fractions of crude oil in the cyclopoid copepod *Paracyclopsina nana*. *Environ Sci & Technol.* 49(11): 6982-6992.
- Harkey GA, Landrum PF, Klaine SJ. 1994. Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environ Toxicol Chem.* 13(8): 1315-1329.
- Haring HJ, Smith ME, Lazorchak JM, Crocker PA, Eureski A, Wratschko MC. 2010. Comparison of bulk sediment and

- sediment elutriate toxicity testing methods. Arch Environ Contam Toxicol. 58(3): 676-683.
- Kwok KWH, Souissi S, Dur G, Won EJ, Lee JS. 2015. Copepods as references species in estuarine and marine water. In: Editor Amiard-Triquet C, Amiard JC, Mouneyrac C. Aquatic ecotoxicology: Advancing tools for dealing with emerging risks. Elsevier; p. 281-308.
- Lavorante BR, Oliveira DD, Costa BV, Souza-Santos LP. 2013. A new protocol for ecotoxicological assessment using nauplii of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida). Ecotoxicol Environ Saf. 95: 52-59.
- Lee KW. 2004. Mass culture and food value of the cyclopoid copepod *Paracyclops nana* Smirnov. Ph.D. dissertation, University of Gangreung. Korea. [Korean Literature]
- Lee KW, Rhee JS, Han J, Park HG, Lee JS. 2012. Effect of culture density and antioxidants on naupliar production and gene expression of the cyclopoid copepod, *Paracyclops nana*. Comp Biochem Physiol A. 161: 145-152.
- Lee BY, Kim HS, Choi BS, Hwang DS, Choi AY, Han J, Won EJ, Choi IY, Lee SH, Om AS, Park HG, Lee JS. 2015. RNA-seq based whole transcriptome analysis of the cyclopoid copepod *Paracyclops nana* focusing on xenobiotics metabolism. Comp Biochem Physiol D. 15: 12-19.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Methods. 25(4): 402-408.
- Ludwig DD, Sherrard JH, Amende RA. 1989. Evaluation of the standard elutriate test as an estimator of contaminant release at dredging sites. Res. J Water Pollut. 61 (11/12): 1666-1672.
- Moon HB, Choi M, Choi HG, Kannan K. 2012a. Severe pollution of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in sediments from Lake Shihwa, Korea: Tracking the source. Mar Pollut Bull. 64(11): 2357-2363.
- Moon HB, Choi M, Yu J, Jung RH, Choi HG. 2012b. Contamination and potential sources of polychlorinated diphenyl ethers (PBDEs) in water and sediment from the artificial Lake Shihwa, Korea. Chemosphere. 88(7): 837-843.
- Moore DW. 2001. Review of field validation studies of sediment bioassays for theregulatory evaluation of dredged material, DOER Technical Notes Collection (ERDCTN-DOER-C23), U.S. Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS.
- Nam SH, An YJ. 2014. Review of the extraction methods of soil extracts, soil elutriates, and soil suspensions for ecotoxicity assessment. J Soil Groundw Environ. 19(3): 15-24. [Korean Literature]
- Novelli AA, Losso C, Libralato G, Tagliapietra D, Pantani C, Ghirardini AV. 2006. Is the 1:4 elutriation ratio reliable? Ecotoxicological comparison of four different sediment: water proportions. Ecotox Environ Saf. 65: 306-313.
- Phelps HL. 1989. Clam burrowing bioassay for estuarine sediment. Bull Environ Contam Toxicol. 43(6): 838-845.
- Ra K, Kim KT, Kim ES, Won EJ, Lim KI, Park SY, Shin KH. 2009. Geochemistry of trace metals in Shihwa Lake sediment. Proceedings of the Conference of the Korean Society for Marine Environment

- & Energy; 2009 Nov.; Korea 175-180.  
[Korean Literature]
- Raisuddin S, Kwok KWH, Leung KMY, Schlenk D, Lee JS. 2007. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat Toxicol.* 83: 161-173.
- Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarker S. 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology.* 15(4): 333-340.
- Schettino T, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Lionetto MG. 2012. Biomarker approach in marine monitoring and assessment: New insights and perspectives. *Open Environ Sci.* 6: 20-27.
- Shin KH. 2009. Research for developing monitoring and risk assessment method of suspended particles in bottom water of Lake Shihwa. AETEC. Report 08-2-70-76 [Korean Literature]
- USEPA. 1991. Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal testing manual. EPA 503/8-91/001.
- USEPA. 1994. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPZ 600/ R-94/024.
- USEPA. 2016. Guidance for performing tests on dredged material proposed for ocean disposal. EPA
- Vethaak AD, Hamers T, Martínez-Gómez C, Kamstra JH, de Weert J, Leonards PEG, Smedes F. 2017. Toxicity profiling of marine surface sediments: A case study using rapid screening bioassays of exhaustive total extracts, elutriates and passive sampler extracts. *Mar Environ Res.* 124: 81091.
- Won EJ, Hong S, Ra K, Kim KT, Shin KH. 2012. Evaluation of the potential impact of polluted sediments using Manila clam *Ruditapes philippinarum*: bioaccumulation and biomarker responses. *Environ Sci Pollut Res.* 19(7): 2570-2580.
- Won EJ, Lee JS. 2014a. Gamma radiation induces growth retardation, impaired egg production, and oxidative stress in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Aquat. Toxicol.* 150: 17-26.
- Won EJ, Lee Y, Han J, Hwang UK, Shin KH, Park HG, Lee JS. 2014b. Effect of UV radiation on hatching, lipid peroxidation, and fatty acid composition in the copepod *Paracyclops nana*. *Comp Biochem Physiol C* 165: 60-66
- Word JQ, Gardiner WW, Moore DW. 2005. Influence of confounding factors on SQGs and their application to estuarine and marine sediment evaluations. In: Editor Wenning RJ, Batley GF, Ingersoll CG, Moore DW. Use of sediment quality guidelines and related tools for the assessment of contaminated sediments. SETAC, p.633-686.