

원유의 노출이 담치와 조피볼락의 phase II 약물대사효소 UDP-glucuronosyl transferase 및 glutathione S-transferase의 활성에 미치는 영향

박관하*, 김주완, 박음미, 임철원,
최민순, 최선남, 황인영,¹ 김정상²

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과 및 식품공학과,
¹인제대학교 자연과학대학 환경공학부, ²경북대학교 농업생명과학대학 동물공학과

Activity Changes in Phase II Drug-metabolizing Enzymes UDP-Glucuronosyl Transferase and Glutathione S-Transferase to Crude Oil Exposure in Mussel and Rockfish

Kwan Ha Park*, Ju-Wan Kim, Eum-Mi Park, Chul-Won Lim,
Min-Soon Choi, Sun-Nam Choe, In-Young Hwang¹ and Jung-Sang Kim²

Departments of Aquatic Life Medicine and Food Science & Engineering, Kunsan National University,

¹School of Environmental Science & Engineering, Inje University,

²Department of Animal Science & Biotechnology, Kyungpook National University

ABSTRACT

This study examined effects of crude oil on the phase II drug-metabolizing enzymes UDP-glucuronosyl transferase (UDPGT) and glutathione S-transferase (GST) in mussel *Mytilus edulis* and rockfish *Sebastes schlegeli*, a representative bivalve and a culture fish, respectively. This work also intended indirectly to evaluate the post impact recovery from the massive oil tanker spillage accidents occurred during the summer of 1995 in the sea area off Yosu City, Chonnam. For these, enzyme activities of UDPGT and GST were examined in the fish and mussel following laboratory exposure to fresh crude oil, weathered oil, field-obtained oil residues, or in the field biota samples. Decreased GST activity was observed in rock fish following exposure to oil-soluble fraction (OSF) of fresh oil. A similar diminished GST activity was also observed after OSF of artificially weathered oil. OSF of field oil residues retrieved from the spillage area approximately 1 year later also exerted a slight inhibition of GST to rockfish. There was neither a change in UDPGT in rockfish, nor were there changes in mussel in both enzymes to any oil fractions. We could not observe any difference in the two enzymes either in rockfish or mussel sampled from the field during 1.5~2.0 years post spillage, indicating that their enzyme systems might had been recovered by the sampling time. In conclusion, it seems that the inhibition of GST activity in rockfish is a biomarker response to crude oil exposure. The results, however, must be interpreted with care, as the inhibition may reflect various factors such as oil concentration, duration and water temperature.

Key words : crude oil, phase II drug-metabolizing enzymes, UDPGT, GST, rockfish, mussel

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-63-469-1885, E-mail: khpark@kunsan.ac.kr

서 론

전 세계적으로 매년 약 5백만 톤의 유류관련 물질이 해양내로 유입(Neff, 1990)되며 유류물질내에 함유되어 있는 4 환 이상의 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)는 돌연변이원성 및 발암성을 보유(Krahn *et al.*, 1986; Van Veld *et al.*, 1992)하고 있기 때문에 중요한 환경독성학적 연구대상이 되어 왔다. 그러나 한편 유류물질들은 복잡한 화학성분 구성만큼이나 독성 현상도 복잡하여 환경독성 평가결과를 해석하는 것이 단순하지가 않다.

유류물질이 해양으로 유출되면 2~5%의 유기성분은 해수로 용해(Payne *et al.*, 1987)되며, 이들 중 강력한 독성성분들이 생물체내로 용이하게 흡수(Thomas and Rice, 1981)되어 해양생물에 심각한 영향을 미친다(Neff and Anderson, 1981). 유류물질에의 오염정도를 파악하기 위해 조직내 PAHs 물질을 분석하는 방법이 자주 사용되고는 있으나, 해양생물의 종류에 따라 PAHs를 분해하는 능력이 상이하기 때문에 독성의 생화학적 지표가 경우에 따라서는 더 예민한 지표가 되기도 한다(Collier *et al.*, 1996). 어류 및 패류에서 약물대사효계 phase I의 하나인 mixed-function oxygenase (MFO) cytochrome P₄₅₀은 PAHs의 대사에 관여하며 유류오염시 활성유도가 관찰된다(Collodi *et al.*, 1984; Gagnon and Holdway 1998; Peters *et al.*, 1999). Phase II 대사효소계인 UDP-glucuronosyl transferase (UDPGT) 및 glutathione S-transferase (GST)는 endogenous compounds, xenobiotics 및 phase I enzyme에 의해 생성된 1차 대사물질의 무독화와 배설에 중요한 역할을 한다(Clark, 1989). 이 phase II 효소들도 화학물질에 의한 오염시 활성이 변화되기 때문에 유류오염지표로서의 역할에 대한 연구가 수행되어 왔다(Moreira *et al.*, 2004). 이와 같이 약물대사효소의 변화는 유류물질에 의한 오염의 중요한 생화학적 지표의 위치에 있다(Collier *et al.*, 1996).

산업의 급격한 발달에 따라 유류물질의 국내로의 수입이 현저히 증가하였고 이에 따른 직접적 해양유류 유출사고나 유류부산물의 해양으로의 유출이 증가하였다. 국내에서의 유류 유출사고 중 1995년 여름 여수지역 해역에서 발생한 씨프린스호 원유수송선 전복사고는 세계적 기준으로도 대

형의 유출사고로서 인근 해역해역에 미친 직·간접적 영향이 막대하였던 것으로 평가된다. 특히, 과거 외국의 유류유출사고에서 발견된 결과(Lee and Anderson, 2005)를 고려하면 이 지역의 해양생물에 적지 않은 영향을 미쳤을 것으로 추정된다.

유류물질에 오염되었을 경우 유류물질의 대사와 배설을 촉진하기위하여 어류 간장이나, 패류에서 이물질(xenobiotics)의 대사에 관여하는 소화선의 약물대사 phase II 효소의 변화도 예상된다. 따라서 본 연구에서는 유류에 노출된 어패류에서 나타나는 생화학 반응의 일환으로서 어류의 간장 또는 패류의 소화선에의 UDPGT 및 GST의 활성을 측정하였다. 즉, 유류에 오염된 경력이 없는 것으로 인정되는 어패류를 사용하여 실험실에서 다양한 유류 성분에 노출시킨 후의 변화를 측정함으로써 이 변화의 정도를 실험실적으로 측정하여 biomarker로 사용할 수 있는가를 확인하였다. 그 결과를 바탕으로 현장에서 채취한 생물시료에서도 과연 이 효소들의 변화가 일어났는가를 측정함으로써 유류 피해의 정도를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험실적 노출용 생물 시료

유류시료가 해양생물에서 유발하는 생화학적 반응을 검토하기 위해 2종의 생물을 사용하여 시험을 수행하였다. 대표적인 어류로는 여수지역에서 많이 양식하고 있는 조피볼락(*Sebastes schlegeli*), 패류로는 여수인근 조간대에서 빈번히 발견되는 담치(*Mytilus edulis*)를 조사대상으로 하였다. 시험동물인 조피볼락은 체중 24~73 g 및 체장 11.3~15.1 cm, 패류인 담치는 체중 9~15 g, 각장 4.0~6.0 cm의 크기를 사용하여 시험하였다. 실험실적 노출시험에 사용된 생물은 전북 및 충남지역의 양식장에서 구입하거나 조간대에서 채취하였다. 시험시료 노출전까지 약 1주일간 실험실에서 순치하였다. 시험중 조피볼락에는 치어용 사료를 급이하였으며 담치에는 사료를 공급하지 아니하였다.

2. 현장 생물시료

현장시료의 효소측정을 위해서 사용된 조피볼락

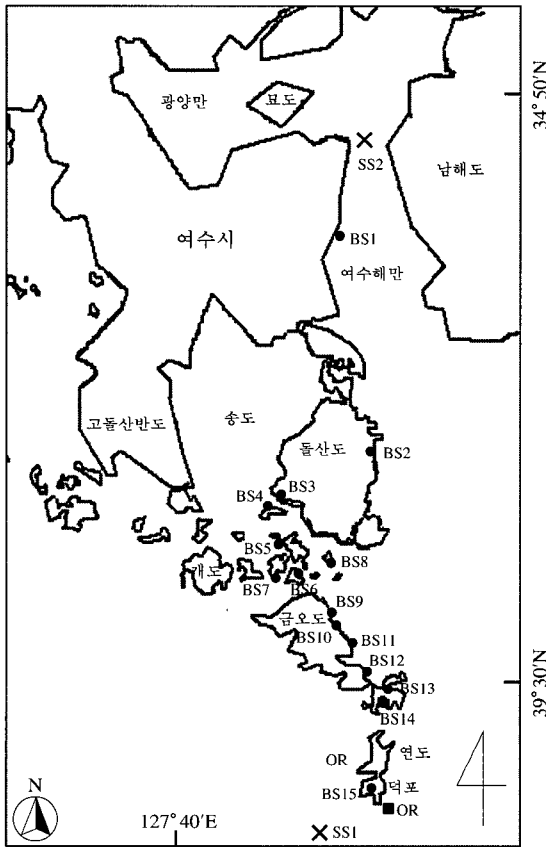


Fig. 1. Map of collection site for oil residue samples and biota samples (■ OR: oil residue samples, ● BS: biota samples, × SS: spill site).

(360~700 g, 17~22 cm)은 송도 인근에 설치된 5개소의 양식장에서, 담치(각장 10~13 g, 4~5 cm)는 방죽포 등 8개소의 조간대에서 각각 1997년 2월 및 5월에 구입하거나 채취하여 사용하였다(Fig. 1). 이 시험에서 분석한 조피볼락은 1년 정도 사육한 시료들로서 치어기에, 잔존하는 유류로 인해 부분적인 유류피해를 입었을 가능성이 있는 크기였으며 담치는 유류노출가능성을 높이기 위해 비교적 크기가 큰 것들을 사고인근 지역 조간대에서 채취하였다. 시료는 분석시까지 -70°C에서 보관하였으며 채취 후 6개월 이내에 분석에 사용하였다.

3. 유류시료

유류시료는 총 3종, Saudi Arabia의 카푸치원유,

해양사고 시 원유 유출 후 발생하는 풍화과정을 실험실적으로 모사한 원유풍화시료를, 현장 유류시료는 해안지역의 조간대에서 전북사고시 유출된 것으로 추정되는 유류성분을 사고지역인 소리도 연목지역 (Fig. 1)에서 채취하여 사용하였다. 이 현장시료채취지역에 인근의 유류오염사고는 1995년 7월 23일 씨프린스호(소리도 남단 15마일, Fig. 1의 SS1)가 있었으며, 다소 떨어진 지점으로는 1995년 11월 17일의 호남짜파이어호(여수시 낙포부두, Fig. 1의 SS2)의 2건(해양경찰청 자료)이 있었으며 현장유류시료는 대략 1년 후인 1996년 8월 19~23일(여름시료) 및 1996년 9월 18~20일(가을시료)의 2차에 걸쳐 수거한 것을 사용하였다.

원유의 실험실적 풍화는 하계 실험실 조건(실온 22~30°C, 상대습도 42~92%, 해수온도 17.0~29.5°C)에서 14일간 지속하였다. 즉 내경 39.8 cm, 높이 44.0 cm의 원통형 stainless 용기에 해수를 12.0 L 채우고 원유 1.0 L를 혼합하였다. 이 용기안에 바닥에서 15 cm에 높이에 위치한 날개길이 약 6.0 cm의 프로펠라를 360~420 rpm의 속도로 연속적으로 회전시켰다. 풍화과정 동안 용기의 상단에 위치한 프로펠라 구동용 motor의 높이에는 가정용 선풍기를 강하게 틀어 지속적으로 공기를 강제 순환시켰다.

4. 유류시료의 분획처리

원유에는 동량 용적의 해수(volume : volume)를 가하고 2시간 동안 교반하여 해수에 용출된 성분을 수용성 성분(water-soluble fraction, WSF)으로 사용하였으며 나머지 성분에 Tween 80을 5:1의 비율로 혼합하고 교반 후 추출된 물질을 지용성 시험시료(oil-soluble fraction, OSF)로 하였다. 농도의 표현에서는 최초의 원유량에서 유래한 성분량을 시험시의 노출량으로 정의하였다. 즉, 예를 들어 "지용성 성분 1,000 mg/L"라 함은 총 유류량으로 1,000 mg/L이 되도록 노출하였을 경우를 가정하면 그 1,000 mg/L에서 유래한 성분중 Tween 80 가용 성분만(수용성 성분을 뺀 량)을 100%의 지용성 성분으로 정의하였다. 실험실적 풍화 원유시료도 원유와 동일한 방법으로 처리하였다. 그러나 풍화유는 반고형 상태로 유동성이 없었기 때문에 중량비(weight : weight)로 동량의 해수를 가하여 수용성

성분을 추출한 후에 Tween 80을 가해(5:1) 시험시료로 사용하였다.

현장채취 유류시료는 시료:해수를 3:1의 비율로 섞고 격렬하게 2시간 교반하여 유출된 시료를 수용성성분, 20:1의 비율로 시료:Tween 80으로 2시간 추출한 것을 지용성성분으로 각각 정의하였다. 농도의 계산은 유류유래성분의 제거 후 잔존하는 고형물질을 칭량하여 [총중량-고형성분]을 유류량으로 하였다.

유류를 분획하였을 때 해수로 추출한 WSF에는 저분자 방향족물질이 분리를 목적으로, Tween 80을 이용한 OSF의 추출은 중요한 독성성분인 저분자 PAHs를 제외한 대부분의 PAHs를 추출함을 각각 목적으로 하였다(Bobra *et al.*, 1989; Heras *et al.*, 1992; Saeed and Al-Mutairi, 2000). 이런 방법으로 추출한 두 중의 분획은 육안적으로 관찰하였을 때 노출농도에서 사육해수와 균질하게 섞이는 것을 확인하였다.

5. 시험동물의 시료에 대한 노출

원유에 대한 노출을 위해 동물을 직사각형수조(45×25×20 cm)에 수용하고 시험물질을 15 L의 해수에서 가해, 15°C 또는 25°C의 온도에서 1주일간 노출을 지속하였다. 그 후 24시간에 동물을 희생시켜서 조피볼락의 경우에는 간체장을, 담치는 전육질부를 적출하여 효소의 분석에 사용하였다. 사육수는 매일 전량을 교체하였다. 사망동물이 발생하는 경우 잔존동물만을 효소의 측정에 사용하였다. 실험실적 풍화원유에 대한 노출은 25°C에서만 수행하였으며 노출기간은 1주일로 하였다. 현장채취 유류시료의 경우에는 하계시료는 25°C, 추계시료는 15°C 각각 1주일간 노출을 지속하였다. 그러나 현장채취 하계 유류시료에 노출한 조피볼락의 경우에는, 지용성 1,000 mg/L으로 48시간 노출에서 대량폐사가 발견되었으므로 노출을 중단하고 1일 후 효소분석을 행하였다. 노출 중에는 heater를 사용하여 사육수 온도를 15±2°C 또는 25±2°C로 유지하였으며 이를 각각 온도 표시시 15°C 또는 25°C로 정의하였다. 수조에는 지속적으로 폭기장치를 사용하여 산소를 공급하였다. 노출 후 생존하는 모든 개체를 분석에 사용하였다. 시료는 분석시까지 -70°C에서 보관하였으며 저장 6개월 이내에

분석을 수행하였다.

6. UDP-glucuronosyl transferase (UDPGT) 효소 활성의 분석

어류의 경우에는 간체장, 담치의 경우에는 육질 전체를 각각 적출하여 100 mM K-phosphate buffer (pH 7.4)를 시료량의 3배량 가하고 homogenize한 후 9,000×g에서 20분간 냉장 centrifuge하여 단백질농도 4~8 mg/mL로 조정하여 사용하였다.

시료 homogenate 100 µL에 Tris-HCl buffer (286 mM, pH 7.4, 28.6 mM MgCl₂ 함유) 70 µL와 4-nitrophenol (20 mM) 20 µL를 가하고 1분간 preincubation하였다. UDPGA (100 mM) 10 µL을 가한 후 25°C에서 30분간 incubation한 다음 0.5 M TCA 1.0 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 30분간 저온에서 방치 후 2,500×g에서 10분간 원심분리하여 상청액 0.5 mL를 0.315 M KOH 2.5 mL와 혼합 후 400 nm에서 흡광도를 측정(Isselbacher *et al.*, 1962)하였다. UDPGA 첨가 직후의 반응액을 reference로 흡광도 변화를 비교하였다. Incubation을 시작한 시점에서의 존재하는 4-nitrophenol의 양이 400 nmol이므로 그의 흡광도의 소실량을 흡광도 변화로부터 산출하여 활성은 nmoles/mg protein/min으로 표현하였다.

7. Glutathione S-transferase (GST) 효소 활성의 측정

UDPGT 측정에 사용하기 위해 조제한 homogenate 시료 5~10 µL와 0.25 M K-phosphate buffer (pH 7.45) 0.48 mL 및 증류수 0.54 mL씩 넣고 25°C로 incubation하였다. 10분 후 20 mM GSH용액 0.06 mL와 20 mM의 1-dichloro-2,4-dinitro benzene (CDNB)용액 0.06 mL를 넣은 즉시 vortexing하여 spectrophotometer용의 semimicro cell에 옮겨서 340 nm에서 1분간의 흡광도 변화를 측정하였으며 활성은 1분간의 반응곡선의 기울기로부터 구하였다. CDNB의 glutathione포합체의 분자흡광계수는 $\Delta\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 을 이용하여 GST의 활성을 산출하여 µmol/mg protein/min으로 표현하였다(Habig *et al.*, 1974).

8. 통계학적 처리

대조군과 처리군, 또 처리군 상호간의 차이나 현장에서 채취한 시료상호간에 대해서는 Duncan's multiple range test를 사용하여 검정하고 p-value가 0.05 이하일 때 두 군 간에는 차이가 있다고 판정하였다. Data는 mean ± SEM으로 표현하였다.

결 과

1. 원유시료의 실험실적 노출 후의 효소활성

조피볼락과 담치를 원유시료에 1주간 노출한 후의 효소활성을 Table 1에서 보여주고 있다. UDPGT 활성에 시험군간의 차이가 없었다. 그러나 GST활성은 지용성 300 및 1,000 mg/L에 의하여 조피볼락에서 현저히 감소되었다. 담치에서는 조피볼락과는 달리 GST의 활성변화가 없었다.

2. 실험실적 풍화 원유시료로 실험실적 노출 후의 효소활성

담치와 조피볼락의 UDPGT활성은 원유시료의 경우와 마찬가지로 풍화시료에서도 변화하지 아니하였다(Table 2). 그러나 조피볼락의 GST의 활성이

지용성 300 및 1,000 mg/L의 노출에 의하여 현저하게 감소하였다. 한편 담치에서는 GST의 활성에 변화가 관찰되지 아니하였다.

3. 현장채취 유류시료의 실험실적 노출 후의 효소활성

현장에서 채취한 유류잔류 시료를 사용하여서 효소의 변화를 측정하였다. 이 유류시료는 하계와 추계에 걸쳐 채취하였으며 채취계절에 따라 다른 노출온도에서 시험을 수행하였다. 즉 하계시료로는 25°C에서 추계시료는 15°C에서 각각 수행하였으며 결과는 Table 3에 보여주고 있다. 이들 시료에 노출된 조피볼락과 담치에서 모두 대조군과 비교하여 UDPGT 활성의 유의성 있는 변화는 관찰되지 아니하였다. 그러나 조피볼락의 GST 활성에서는 지용성 성분을 300 mg/L로 1주일간 노출하였을 때 대조군과 비교하여 유의성있는 효소량의 감소가 관찰되었다. 조피볼락 1,000 mg/L의 경우에는 노출 첫날부터 치사동물이 많이 발생(10마리 중 7마리)하여 48시간 후 노출을 중단하고 다시 24시간 후 효소를 분석하였으나 유의성 있는 변화를 관찰할 수 없었다. 담치에 대해서는 추계시료만을 시험한 바, 유의성 있는 GST 활성이 관찰되지 않았다.

UDPGT활성에 있어서는 조피볼락과 담치 어떤

Table 1. Enzyme activities in rockfish and mussel following exposure to crude oil

Group	Con. (mg/L)	Temp. (°C)	# of animals survived	Enzyme activity		
				UDPGT (nmol/mg protein/min)	GST (μmol/mg protein/min)	
Rockfish	Control	0	15°C	10/10	0.550 ± 0.040	0.620 ± 0.050
	WSF	1,000	15°C	10/10	0.480 ± 0.030	0.680 ± 0.050
	OSF	1,000	25°C	9/10	0.510 ± 0.040	0.660 ± 0.050
		300	25°C	9/13	0.620 ± 1.000	0.380 ± 0.040*
	Tween 80	1,000	15°C	10/12	0.490 ± 0.030	0.400 ± 0.040*
		1.0 mL/L	15°C	11/11	0.580 ± 0.090	0.601 ± 0.040
Mussel	Control	0	15°C	10/10	0.104 ± 0.012	0.980 ± 0.080
	WSF	1,000	15°C	10/10	0.125 ± 0.013	0.905 ± 0.060
	OSF	1,000	25°C	10/10	0.101 ± 0.009	1.002 ± 0.060
		300	25°C	10/10	0.138 ± 0.010	0.970 ± 0.070
	Tween 80	1,000	15°C	10/10	0.116 ± 0.030	1.210 ± 0.050
		1.0 mL/L	15°C	10/10	0.094 ± 0.028	1.280 ± 0.110

Animals were exposed to crude oil-derived fractions for 1 week and enzyme activities were assessed 24 hr thereafter. Tween 80 was used as the solvent to accommodate oil-soluble fraction at 1 mL/L concentration.

WSF: water soluble fraction; OSF: oil-soluble fraction.

*Significant decrease compared to control by Duncan's multiple range test at P < 0.05.

Table 2. Enzyme activities in rockfish and mussel following exposure to laboratory-weathered crude oil

Group	Con. (mg/L)	Temp. (°C)	# of animals survived	Enzyme activity		
				UDPGT (nmol/mg protein/min)	GST (μmol/mg protein/min)	
Rockfish	Control	0	25°C	10/10	0.430 ± 0.100	0.520 ± 0.070
	WSF	1,000	25°C	9/10	0.510 ± 0.080	0.590 ± 0.120
	OSF	300	25°C	8/10	0.380 ± 0.110	0.280 ± 0.070*
		1,000	25°C	6/10	0.550 ± 0.160	0.206 ± 0.140*
Mussel	Control	0	25°C	10/10	0.077 ± 0.014	0.764 ± 0.102
	WSF	1,000	25°C	10/10	0.093 ± 0.009	0.815 ± 0.083
	OSF	300	25°C	10/10	0.071 ± 0.015	0.916 ± 0.122
		1,000	25°C	10/10	0.086 ± 0.024	0.841 ± 0.142

For experimental details, refer to the legend to Table 1.

*Significant decrease compared to control by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

Table 3. Enzyme activities in rockfish and mussel following exposure to oil residue sampled in the oil spill area

Group	Con. (mg/L)	Temp. (°C)	# of animals survived	Enzyme activity			
				UDPGT (nmol/mg protein/min)	GST (μmol/mg protein/min)		
Rockfish	Control	0	25°C	11/11	0.580 ± 0.090	0.690 ± 0.050	
	Summer oil sample	WSF	1,000	25°C	10/10	0.370 ± 0.070	0.600 ± 0.030
		OSF	300	25°C	8/10	0.390 ± 0.060	0.480 ± 0.040*
			1,000	25°C	3/10	0.420 ± 0.180	0.506 ± 0.090
	Autumn oil sample	Control	0	15°C	9/9	0.730 ± 0.070	0.570 ± 0.060
		WSF	1,000	15°C	9/9	0.720 ± 0.090	0.690 ± 0.090
OSF		1,000	15°C	9/9	0.620 ± 0.080	0.710 ± 0.070	
Tween 80		1 mL/L	15°C	10/10	0.660 ± 0.080	0.660 ± 0.070	
Summer oil sample			N.T				
Mussel	Control	0	15°C	10/10	0.092 ± 0.007	0.890 ± 0.080	
	Autumn oil sample	WSF	1,000	15°C	10/10	0.092 ± 0.009	0.980 ± 0.100
		OSF	1,000	15°C	9/9	0.102 ± 0.009	0.910 ± 0.120
		Tween 80	1 mL/L	15°C	10/10	0.088 ± 0.010	0.990 ± 0.110

Summer and autumn samples were respectively collectively during Aug. 19~23, 1996, and Sep. 18~20, 1996.

For 1,000 mg/L Summer oil sample in rockfish, the exposure was terminated after 2 days due to marked mortality, and enzyme analysis was performed 24 hr later.

For other experimental details, refer to the legend to Table 1.

N.T: not tested.

*Significant decrease compared to control by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

것도 대조군과 비교하여 효소활성에 유의성 있는 변화가 관찰되지 아니하였다.

4. 현장채취 생물시료에서의 효소활성

유류오염사고 발생현장에서 가장 가까운 장소에

설치된 양식장에서 조피볼락을 구입하거나, 사고지역 근처의 조건대에서 채취한 담치에서의 활성을 측정하였으며 그 결과를 Table 4에서 정리하였다. 구입하거나 채취한 조피볼락과 담치에서 UDPGT의 활성에 채취장소간 유의할 만한 차이가 발견되지 아니하였다. 또한 이들의 활성은 실험실에서 사

Table 4. Enzyme activities in rockfish and mussel sampled in the oil spill vicinity

Organism	Sampling site	Sampling date	# of animals examined	Enzyme activity	
				UDPGT (nmol/mg protein/min)	GST (μ mol/mg protein/min)
Rockfish	BS4	Feb. 12, 1977	6	0.710 \pm 0.077	0.788 \pm 0.111
		May 8, 1977	5	0.527 \pm 0.043	0.824 \pm 0.083
	BS12	Feb. 12, 1977	5	0.728 \pm 0.112	0.754 \pm 0.115
	BS3	Feb. 12, 1977	5	0.790 \pm 0.154	0.776 \pm 0.105
	BS6	Feb. 11, 1977	5	0.674 \pm 0.167	0.608 \pm 0.208
	BS7	May 8, 1977	5	0.584 \pm 0.104	0.711 \pm 0.116
	Mussel	BS2	Feb. 11, 1977	6	0.087 \pm 0.008
BS11		Feb. 11, 1977	5	0.089 \pm 0.081	0.834 \pm 0.118
BS1		Feb. 11, 1977	7	0.097 \pm 0.015	0.879 \pm 0.181
BS15		Feb. 24, 1977	10	0.084 \pm 0.010	0.684 \pm 0.072
BS8		Feb. 24, 1977	10	0.075 \pm 0.005	0.672 \pm 0.094
		May 9, 1977	10	0.082 \pm 0.008	0.708 \pm 0.099
BS8		Feb. 24, 1977	10	0.088 \pm 0.008	0.662 \pm 0.088
		BS10	Feb. 24, 1977	10	0.068 \pm 0.009
BS5		May 9, 1977	8	0.068 \pm 0.009	0.725 \pm 0.092
		May 9, 1977	3	0.072 \pm 0.006	0.728 \pm 0.212

For collection sites, refer to Fig. 1.

Two BS8 sample sites in mussel were very close as to be expressed as a single circle.

용한 동일 어류의 대조군과 비교하여도 유의할 만한 차이가 발견되지 아니하였다.

현장에서 입수한 조피볼락과 담치의 GST활성에 있어서도 채취 장소간, 또는 이미 설명한 동일종의 대조군에서의 효소활성과 비교하여서도 유의할 만한 차이가 발견되지 아니하였다.

고 찰

최근 해양생물에서의 다양한 생화학적 반응을 유류오염의 평가의 지표로 활용하는 연구가 많이 수행되었다. 특히 담치와 같은 고착생물들은 오염 현장에서 도피하는 능력이 결여되어 있기 때문에 오염물질에 고농도로 노출되는 결과가 초래되어 심각한 손상을 입게 된다.

본 연구에서는 원유, 실험실적으로 유도한 풍화 유류시료, 1996년 하계 및 1996년 추계에 오염현장에서 채취한 유류를, 비노출지역에서 입수한 어류 및 패류에 1주일 동안 노출시키면서 생화학적인 측면에서의 독성인 Phase II 약물대사효소 활성의 변화를 조사하였다. 또한 동일한 생물종을 오염지

역에서 채취하여 이들 효소의 변화를 측정함으로써 현장의 어패류가 어느 정도 독성학적 영향을 받고 있는가를 검토하고자 하였다.

독성물질에 노출된 생물에서의 생화학적 반응은 대부분 가역적이므로 어떤 시점에서 분석하였느냐에 따라 결과와 해석이 달라지게 될 것이다. 이 연구의 경우 불행하게도 현장오염 전 및 직후에 확보한 현장시료가 없어서 오염지후에 현장의 생물에서 일어났을 것으로 생각되는 상황은 추정에 의존할 수 밖에 없을 것이다. 그러나 유류사고발생 후 상당한 기간이 경과한 생물시료 수집시점에서, 현장에서는 유류잔류물이 발견되었을 뿐 아니라 유류오염에 기인하는 것으로 추정되는 현상으로서 빈약한 조건대 생물상이 관찰되었다(개인 관찰자료). 또한 이 연구에서 분석한 생물시료에는 유류잔류물에 지속적으로 노출되고 있던 것으로 추정되는 것들도 포함시켰다. 따라서 본 연구의 결과는, 유류사고 후 상당 시간 경과 후에는 잔류하고 있는 유류물질의 노출이 생물에 어느 정도 영향을 미칠 수 있는가를 평가할 수 있는 중요한 자료로 사용될 수 있을 것이다. 아울러 현재 또는 향후에 동일지역 생물에 대한 분석을 수행하는 데에

참고자료로 활용될 수 있을 것이다. 본 연구는 이러한 변화하는 상황을 고려, 현장생물시료의 분석, 현장유류시료에 대한 실험실적 노출 및 인공풍화 시료에 대한 실험실적 노출시험 등 다양한 변수를 검토하였다.

이 논문의 결과 부분에서 data를 제시한 순서와는 달리, 실제 시험순서는 오염현장에서 채취한 하계 유류시료를 가장 먼저 시험하였으며 그 시료를 사용한 시험결과를 참고로 하여 이후의 시험 농도나 노출기간을 정하였다. 우선 하계유류 시료 중 지용성 성분은 최고 노출농도인 1,000 mg/L에서 상당수의 조피블락이 치사하였다. 따라서 효소활성을 측정할 정도로 충분한 수의 잔존동물이 노출 후 남지 않을 가능성이 우려되어 300 mg/L으로 농도를 감소하여 재시험을 시도하였다. 또한 이 하계 시료를 이용한 시험에서는 비교적 고온인 25°C로 노출하는 예비시험 과정에서 노출농도가 높을수록 독성이 증가하는 경향이 있음이 파악되었다. 이 하계유류시료에서 발견된 현상은 지용성 성분의 300 mg/L의 노출에 의해 조피블락 GST활성의 현저한 감소였다. 더 높은 농도인 1,000 mg/L에서는 48시간만 노출하였을 뿐만 아니라 분석할 수 있는 잔존 동물수가 너무 적었기 때문에 통계학적으로 유의할 만한 변화가 관찰되지 않았을 것으로 생각된다. 지용성 300 mg/L에서의 GST활성의 감소가 추출용매로 사용된 Tween 80에 의한 효과일 가능성이 의심되었으나 이후의 연구에서 Tween 80은 관계가 없음이 규명되었다. 한편이 이 연구에서 사용한 300 mg/L 이상은, 다른 연구자(Georgiades *et al.*, in press; Siron *et al.*, 1991; Strömngren, 1987)들이 사용한 원유의 농도(< 30 mg/L)보다 훨씬 높아 원유 유출사고 직후에 국지적으로 나타날 수 있는 생물계의 반응과 깊은 연관성이 있는 것으로 사료된다.

추계채취 유류시료에 의한 노출에서는 노출온도를 15°C로 유지하였으며 1,000 mg/L까지의 노출에서도 하계시료에서 발견되었던 심각한 치사효과나 조피블락의 GST 활성 감소현상은 관찰되지 아니하였다. 추계시료와 하계시료 모두 유출사고 약 1년 후 채취하였으며 실제로 추계-하계의 기간 차이는 겨우 1개월에 불과하여 추계시료에서 하계시료보다 현저한 물리화학적 변화가 발생하였다고 추정하기는 어렵고, 단지 두 시료는 이미 채취 이전부터 독성의 강도측면에서 상이한 단계에 도달해 있

었기 때문으로 보인다. 그러나 추계유류시료가 하계채취시에는 어떠한 단계에 있었던 가를 알지 못하기 때문에 확정적인 결론을 내리기가 다소 어렵기는 하다.

제2단계의 시험에서는 원유시료 및 실험실적 풍화유류시료를 사용하여 실험실적 노출시험을 수행하였다. 특히 이전의 조사에서 하계 현장시료 중 지용성 성분으로 노출(300 mg/L, 25°C)시킨 경우 GST활성의 부분적 감소가 관찰된 반면 추계시료로 노출(1,000 mg/L, 15°C)시에는 그 변화가 관찰되지 아니하였기 때문에 원유를 사용한 시험에서는 15°C와 25°C로 노출 온도를 구분하여 시험하였다. 또한 이 단계에서는 지용성 성분에서의 노출시 관찰된 변화가 지용성성분 용해 목적으로 사용된 Tween 80의 노출에 의한 효과는 아님을 확인할 수 있었다. 전반적으로 높은 온도의 노출이 독성작용을 증가시키는 경향이 있었기 때문에 풍화유류시료의 경우는 25°C에서만 시험하였다. 실제로 원유와 풍화시료로 치사경향과 효소의 활성변화를 검토한 결과 대체적으로 하계유류시료에서 나타난 독성, 즉 지용성 성분에서의 상당수 조피블락의 치사와 GST활성의 감소가 관찰되었다. 그러나 원유시료와 풍화시료를 비교하였을 경우에는 현저한 차이가 없음이 관찰되었다. 이는 풍화과정에 의해 치사를 유발하거나 생화학적인 독성을 유발하는 물질이 그다지 현저하게는 소실되지 않음을 시사한다. 또한 조피블락이나 담치에서 모두 수용성분 확인 경우는 비교적 높은 농도에 노출되는 경우에는 효소활성의 변화나 사망동물이 잘 발생하지 않았다. 이는 독성이 강한 PAHs는 주로 지용성분획에 존재함을 의미한다.

유류오염시 생물에서 나타나는 생화학적 변화는 독성을 평가하는 지표로 활용되어 왔으며, phase I 및 II의 약물대사 효소계들은 모두 예민한 반응종의 하나로 간주되고 있다. Phase I 효소계는 유류오염에 의해 예민하게 증가하는 것이 일반적(Lee and Anderson, 2005)이나, phase II의 변화는 다소 둔감하면서도 생물종이나 노출조건에 따라 다르게 관찰되고 있다. 예를 들어 담치의 일종인 *Mytilus galloprovincialis*, 굴의 일종인 *Crassostrea rhizophorae*, 환형동물 *Euthoe complanata*에서는 GST의 활성이 증가함을 보고(Moreira *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2005; Nusetti *et al.*, 2005)하고 있는 반면, 성계류

*Paracentrotus lividus*와 mouse에서는 감소가 보고되고 있다(Raza *et al.*, 1995; Cunha *et al.*, 2005). 그러나 rat에서는 처음에는 증가하였다가 감소하는 경향으로 변동(Arif *et al.*, 1994)되는 등 분석시점에 따라서도 다른 결과를 얻을 수 있음을 시사한다. 어류인 Atlantic salmon에도 유류의 오염이 phase II enzyme을 억제할 수 있는 가능성이 제시된 바 있다(Gagnon and Holdway, 2000). 그러나 이 연구에서 직접적으로 다른 독성학적 지표인 체중의 변화나 간장유래 혈장효소(예, GOT, GPT)를 분석하지 않았기 때문에 확인할 수는 없지만, 발견된 Phase II 활성의 감소가 이들 효소계에 미친 선택적인 영향이 아니라 일반적인 간장독성으로 인한 대사장애일 가능성(Khan *et al.*, 1986)도 배제할 수는 없을 것이다.

한편 본 연구와 연계하여 수행한 분석에서는 동일한 방법으로 실험실적으로 원유에 노출한 조피볼락과 담치에서 phase I 효소들인 EROD 및 AHH가 1.7~22.0배까지 증가하는 양상을 발견(김정상, 미발표자료)하였다. 즉 Phase II 효소는 감소한 반면, phase I 효소는 증가한 현상이 관찰되므로 두 효소계의 변화 방향이 반드시 일치하지는 않음을 의미한다. 이와 유사하게 동일한 오염물질 노출로 인해 phase I 효소계와 II 효소계가 서로 다른 방향으로 변화할 수 있음이 보고되어 있다(Croce and Stagg, 1997).

본 연구에서 유류오염 현장으로부터, 실험실적 노출 생물종과 동일종인 조피볼락 및 담치를 유출사고 1년 6개월~2년 후에 해당하는 1997년 2월과 1997년 5월에 채취하여 효소활성을 조사하였다. 그 결과 분석한 2종의 효소활성에서 채취 장소간 차이가 발견되지 않았다. 특히 이때 생물채취장소를 유류지점으로부터 거리가 다른, 즉 상이한 수준의 유류오염을 겪었을 곳으로 추정되는 현장을 대상으로 분석한 바, 실험실적으로 노출하였던 경우의 조피볼락과는 달리 채취장소간 차이가 발견되지 아니하였다. 이는 생물채취 시점에 현장에 존재하는 어류에서 유류오염에 의한 생화학적 독성이 잔존하고 있지 않다는 의미이다. 또한 이들에서의 효소활성이 실험실에서 사용한 동일종의 대조군과 차이가 없음은 효소계에 영향이 없음을 확인하였다고 할 수 있다.

본 연구에서 원유 또는 그 실험실적 풍화물질들

노출하였을 때 나타난 감소 반응이 유류사고가 난 지 약 1년 이상 경과한 후에 채취한 시료에서는 관찰되지 않아서, 시료를 채취한 시점에서는 이미 노출반응이 소실된 것으로 보인다. 이는 다른 연구자들이 유류사고 후 약 2~3 개월간은 유류오염지역에서 포획한 어류 간장 phase I 효소계의 활성이 지속적으로 증가하지만 1년 이내(보통 4개월)에는 이전의 수준으로 복귀하는 현상(Lindström-Seppä, 1988)과 유사하다고 할 수 있을 것이다. 생물시료를 채취한 1997년에도 현장에서 유류잔류물이 조간대에서 발견되고는 있었지만, 이 연구에서 사용한 현장생물시료들은 노출사고 1.5~2년 후에 채취되었기 때문에 현장생물시료에서의 분석결과는 독성현상의 하나인 효소계가 복구되었음을 확인하는 의미를 가진다.

결론적으로, 실험실적으로 유류시료를 어패류에 높은 농도로 노출시키면 현저한 생화학적 독성이 나타나지만 현장에서 채취한 어패류에서는 Phase II 효소계에의 독성이 나타나고 있지 않은 것으로 미루어, 효소변화가 이미 회복되었거나 또는 생물시료 수집시점에서의 오염유류의 농도는 생화학적 독성을 유발할 정도로 높지 않았던 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 군산대학교 수산과학연구소의 연구비지원에 의해서 수행되었습니다.

참고 문헌

- Arif JM, Khan SG, Mahmood N, Aslam M and Rahman Q. Effect of coexposure to asbestos and kerosene soot on pulmonary drug-metabolizing enzyme system. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 181-183.
- Bobra AM, Shiu WY, MacKay D and Goodman RH. Acute toxicity of dispersed fresh and weathered crude oil and dispersants to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 1989; 19: 1199-1222.
- Clark AG. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 1989; B92: 419-446
- Collier TK, Krone CA, Krahn MM, Stein JE, Chan S-L and

- Varanasi U. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the *Exxon Valdez* oil spill. *Am Fish Soc Symp* 1996; 18: 671-683.
- Collodi P, Stekoll MS and Rice SD. Hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase activities in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to petroleum hydrocarbons. *Comp Biochem Physiol* 1984; 97C: 447-341.
- Croce B and Stagg RM. Exposure of Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) to a combination of resin acids and a water soluble fraction of diesel fuel oil: a model to investigate the chemical causes of pigmented salmon syndrome. *Environ Toxicol* 1997; 9: 1921-1929.
- Cunha I, Garcia LM and Guilhermino L. Sea-urchin (*Paracentrotus lividus*) glutathione S-transferase and cholinesterase activities as biomarkers of environmental contamination. *J Environ Monit* 2005; 7: 288-294.
- Da Silva AZ, Zanette J, Fernando-Ferreira J, Guzinski J, Marques MR and Bainy AC. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicol Environ Saf* 2005; 62: 376-382.
- Gagnon MM and Holdway DA. MFO induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during and after exposure to Bass Strait crude oil. *Aus J Ecotox* 1998; 4: 29-35.
- Gagnon MM and Holdway DA. EROD induction and biliary metabolite excretion following exposure to the water accommodated fraction of crude oil and to chemically dispersed crude oil. *Arch Environ Contam Toxicol* 2000; 38: 70-77.
- Georgiades ET, Danis B, Gillan DC, Dubois Ph., Temara A and Holdway DA. Effect of crude oil contaminated sediment exposure on cytochrome P450 enzymes in the Australian asteroid *Coscinasterias muricata*. *Chemosphere*, in press.
- Habig WH, Pabst MJ and Jacoby WB. Glutathione transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
- Heras H, Ackman RG and MacPherson EJ. Tainting of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by petroleum hydrocarbons during a short-term exposure. *Mar Poll Bull* 1992; 24: 310-315.
- Khan S, Rahman AM, Payne JF and Rahimtula AD. Mechanisms of petroleum hydrocarbon toxicity: studies on the response of rat liver mitochondria to Prudhoe Bay crude oil and its aliphatic, aromatic and heterocyclic fractions. *Toxicology* 1986; 42: 131-142.
- Krahn MM, Rhodes LD, Myers MS, Moore LK, MacLeod WD Jr and Malins DC. Association between metabolites of aromatic compounds in bile and the occurrence of hepatic lesions in English sole (*Paophyrus vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Arch Environ Contam Toxicol* 1986; 15: 61-76.
- Lee RF and Anderson JW. Significance of cytochrome P₄₅₀ system responses and level of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Mar Poll Bull* 2005; 50: 705-723.
- Lindström-Seppä P. Biomonitoring of oil spill in a boreal archipelago by xenobiotic biotransformation in perch (*Perca fluviatilis*). *Ecotoxicol Environ Saf* 1988; 15: 161-170.
- Moreira SM, Moreira-Santos M, Ribeira R and Guilhermino L. The "Coral Bulker" fuel oil spill on the north coast of Portugal: spatial and temporal biomarker responses in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology* 2004; 13: 619-630.
- Neff JM. Composition and fate of petroleum and spill-treating agents in the marine environment. In: Geraci JR and St. Aubin DJ (eds) *Sea mammals and oil: confronting the risks*. Academic Press, London, 1990; pp. 1-12.
- Neff JM and Anderson JW. Responses of marine animals to petroleum and specific petroleum hydrocarbons. Applied Science Publishers, Essex, 1981; 177pp.
- Nuseti O, Zapata-Vivenes E, Esclapes MM and Rojas A. Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomididae) exposed to used vehicle crankcase oil. *Arch Environ Contam Toxicol* 2005; 48: 509-514.
- Payne JR, Phillips CR and Hom W. Transport and transformations: Water column processes. In: Boesch DF and Rabalais NN (eds). *Long-term environmental effects of offshore oil and gas development*. Elsevier Applied Publishers, London, 1987; pp. 175-231.
- Peters LD, Shaw JP, Nott M, O'Hara SCM and Livingstone DR. Development of cytochrome P₄₅₀ as a biomarker of organic pollution in *Mytilus* sp.: Field studies in United Kingdom (Sea Empress's oil spill) and the Mediterranean Sea. *Biomarkers* 1999; 4: 425-441.
- Raja H, Qureshi MM and Montague W. Alteration, glutathione S-transferase and lipid peroxidation in mouse skin and extracutaneous tissues after topical application of gasoline. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27: 271-277.
- Saeed T and Al-Mutairi M. Comparative composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sea water-soluble fractions of different Kuwaiti crude oil. *Adv Environ Res* 2000; 4: 141-145.
- Siron R, Giusti G, Berland B, Morales-Loo R and Pelletier E. Water-soluble petroleum compounds: chemical aspects and effects on the growth of microalgae. *Sci Total*

Environ 1991; 104: 211-227.

Stromgren T. Effect of oil and dispersants on the growth of mussels. *Mar Environ Res* 1987; 21: 239-246.

Thomas RE and Rice SD. Excretion of aromatic hydrocarbons and their metabolites by freshwater and seawater

Dolly Varden char. In: Verbnberg FJ, Calabrese A, Thurberg F and Venberg W (eds) *Biological monitoring of marine pollutants*. Academic Press, New York, NY, 1981; pp. 425-448.