

실내종 *Chironomus riparius*와 야외종 *Chironomus plumosus*의 중금속 노출에 따른 분자지표 유전자 발현

김원석 · 김로사¹ · 박기연 · 차밀라니 · 곽인실*

전남대학교 해양기술학부, ¹안정성평가연구소

The Molecular Biomarker Genes Expressions of Rearing Species *Chironomus riparius* and Field Species *Chironomus plumosus* Exposure to Heavy Metals. Kim, Won-Seok, Rosa Kim¹, Kiyun Park, Nikapitiya Chamilani and Ihn-Sil Kwak* (Department of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea; ¹Korea Institute of Toxicology, Jinju 660-840, Korea)

Abstract *Chironomus* is aquatic insect belonging to order Diptera, family Chironomidae. Their larval stage can be found mainly in aquatic benthic environment, hence good model organism to study environmental toxicology assessments and consider as useful bio indicators of contamination of the aquatic environment. In this study, *Chironomus* Heat Shock Proteins, Cytochrome 450, Glutathione S-transferase, Serine-type endopeptidase gene expressions were compared between polluted field areas (*Chironomus plumosus*) and under laboratory conditions (*Chironomus riparius*) to investigate molecular indicators for environmental contaminant stress assessment. Heavy metal (Al, Fe, Mn, Cu, Cr, Zn, Se, Pb, As, Cd) concentrations in sediments collected from three study areas exceeded the reference values. Moreover, HSPs, CYP450 and GST gene expression except SP for *C. plumosus* showed higher expression than *C. riparius* gene expression. Similar gene expression pattern was observed in *C. riparius* that exposed environment waters up to 96 h when compared to *C. plumosus* exposed to waters that grown in lab conditions. In summary, this comparative gene expression analysis in *Chironomus* between field and laboratory condition gave useful information to select candidate molecular indicators in heavy metal contaminations in the environment.

Key words: *Chironomus*, heavy metal, molecular biomarker, Heat Shock Protein, Cytochrome P450, Glutathione S-transferase, Serine-type endopeptidase

서 론

고도화된 도시화와 산업화로 인해 수계로 유입되는 오염원은 그 종류와 유래가 다양하고, 여러 형태로 환경수

및 퇴적물에 존재하며, 수계 내 서식하는 생물의 성장, 생식 및 생존에 영향을 준다 (Rand *et al.*, 2003). 특히 환경 중 중금속은 자체적인 분해 및 희석이 어려워 지속적으로 퇴적물에 축적되며, 생물농축으로 이어져 생태구조에 영향을 끼치는 넓은 범위의 환경 유해물질이다 (Garcia Sampaio *et al.*, 2008). 또한, 일부 중금속은 유전자 독성을 유발하여 세포 속의 DNA 염기서열 구조와 dsDNA가닥의 변화를 통해 염색체 이상, 생식기관의 기능 및 구조의 변화, 생물의 배아상태에서의 성장을 감소 등을 유발시키기

Manuscript received 20 January 2015, revised 30 March 2015,
revision accepted 5 June 2015

* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148, Fax: +82-61-659-7149,
E-mail: iskwak@chonnam.ac.kr, inkwak@hotmail.com

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

도 한다(Demiark *et al.*, 2006; Nadella *et al.*, 2009).

Heat Shock Proteins (HSPs)은 항상성 유지와 온도 변화, 조직의 외상, 중금속류의 독성과 같은 외부적 스트레스에 대한 방어작용에 작용하는 단백질로 잘 알려져 있다(Hightower, 1991; Limón-pacheco and Gonsebatt, 2009; Kalmar and Greensmith, 2009). 최근에는 유해물질에 노출된 다양한 생물, 새, 쥐, 전복, 계에서 유전자 발현에 차이가 나타남이 보고 되었다(Kim *et al.*, 2013, 2014; Park and Kwak, 2014a; Park *et al.*, 2015). Cytochrome 450 (CYP 450)과 Glutathione S-transferase (GST)는 해독에 관여하는 효소로, 외부 유해물질 및 PAH, PCB와 같은 독성물질에 의해 발현됨이 연구되었다(Buhler and Williams, 1988; Park *et al.*, 2009; Nair and Choi, 2011; Martínez-Paz *et al.*, 2012). CYP450과 GST 분자마커는 체내에 잘 보존되어 있으며, 유해물질에 노출된 갈다구류를 포함한 수서생물에서 유전자 발현에 차이가 나타남이 알려져 위해성 평가에 이용되고 있다(Park and Kwak, 2008, 2009, 2010; Park *et al.*, 2009, 2010; Shu *et al.*, 2011). Serine-type endopeptidase (SP)는 가수분해효소의 일종으로 많은 곤충 종에서 발견되었는데(Terra *et al.*, 1996), *Helicoverpa zea* 유충의 증장선(Volpicella *et al.*, 2006)과 *Busseola fusca* (George *et al.*, 2008), *Aedes aegypti* (Bian *et al.*, 2008)에서 확인되기도 하였는데, DEHP에 노출된 *C. riparius*에서 발현에 변화가 나타남이 보고되었다(Park and Kwak, 2008). 분자지표 유전자의 발현패턴을 통한 환경 위해성평가는 개체수준에서 평가가 가능하기 때문에, 유해물질 노출에 따른 생물의 반응을 구체적으로 확인할 수 있는 장점이 있다.

실내 및 야외 환경 위해성평가를 위해 수서생물의 HSPs, CYP 450, GST 유전자의 발현 패턴을 사용하고자 하는 연구가 이루어지기도 하였다(Kilemade *et al.*, 2009). 또한 오염지역에서 채집된 수서생물의 HSPs, CYP 450, GST 유전자의 발현을 비교 분석하기도 하였다(Faria *et al.*, 2010; Rios-Sicairos *et al.*, 2010).

*Chironomus*는 파리목 갈다구과에 속하는 OECD 표준 시험생물로서(OECD, 2001) 성체시기를 제외한 알, 유충, 번데기 시기에 수서에 서식하는 생물학적 특징으로 수생태계 환경평가에 이용되는 저서생물이다(Faria *et al.*, 2008; Tuikka *et al.*, 2011). 또한, 온도변화와 같은 물리적 요인과 PCP (Pentachlorophenol), CAP (Chlorantraniliprole) 등과 같은 독성물질에 대한 생물 위해성 평가에 적합한 생물로 제안되기도 하였다(Mónica *et al.*, 2014; Park and Kwak, 2014b; Anderia *et al.*, 2015).

본 연구에서는 환경 중 복합중금속에 노출된 수생물의

위해성을 진단하기 위하여 분자지표 유전자가 유용하고 적합하게 환경을 반영하는가를 살펴보고자 한다. 또한 현장 서식 개체와 실내 노출 개체 간의 분자지표 발현을 비교하여 분자지표 연구의 현장 적용 가능성을 파악해 보고자 하였다. 이 연구를 위하여 저서생물상에서 우점을 차지하는 갈다구류 중 야외종 *Chironomus plumosus*와 실내 사육종인 *Chironomus riparius*의 HSPs, CYP 450, GST와 SP 유전자의 발현을 측정하여 현장적용 가능성을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 현장 생물시료 조사지역

조사지역은 오염지표종인 갈다구류가 높은 밀도로 서식하는 여수의 연등천과 진주의 판문천, 영암의 영암천으로 선정하였다(Fig. 1). 여수의 연등천은 전형적인 도심하천으로서 하천 상류에서 하류에 이르기까지 유역에 많은 상가와 주거지가 밀집되어 있으며 생활하수가 하천 내로 유입되는 하천이다. 진주의 판문천은 아파트가 밀집해 있으며, 근래에 대단위 규모의 아파트가 들어서기 위한 기반공사가 진행되고 있는 지역에 위치한 하천이다. 영암의 영암천 주변은 농경지이며 인근에 대불 산업단지가 위치해 있어, 산업단지 내로 왕래하는 공사차량의 왕래가 잦은 곳이다.

2. 퇴적물 내 주요 중금속 함량 분석과 야외 서식 *C. plumosus*의 채집

여수의 연등천, 진주의 판문천, 영암의 영암천에서 퇴적물과 *C. plumosus*를 채집하였다. 각 조사지역에서 채집한 퇴적물을 폴리에틸렌 재질의 채집통에 담고, *C. plumosus*는 살아있는 상태에서 채집 후 채수통에 담은 후 아이스 박스에 보관한 상태로 실험실까지 운반하였다. 운반한 퇴적물은 중금속 함량을 분석하기 전까지 -80°C 에서 보관하였다. 중금속은 「수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 시행규칙」에서 지정한 수질오염물질(제3조 및 별표 2)인 Fe, Pb, As, Cd, Mn, Cu, Cr, Zn과 Al을 분석하였다. 분석 방법은 해양환경공정시험방법(Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, 2005)에 따라 원자흡광분광도계(AA: Atomic absorption spectrometer)와 유도결합 플라즈마 질량분석기(ICP-MS: Inductively coupled plasma mass spectrometry)를 이용하여 중금속을 분석하였다(Chonnam National University Center for Research Facilities). ICP-MS의 측정

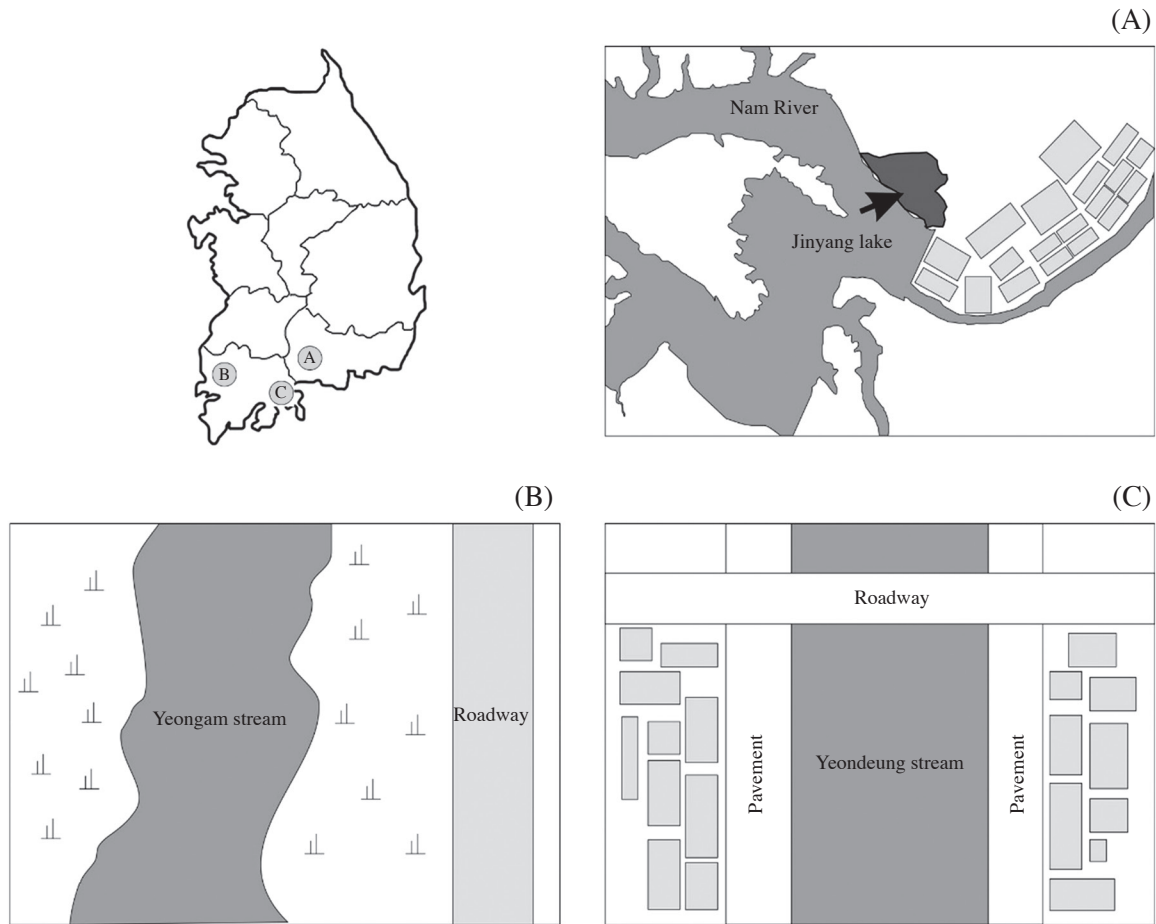


Fig. 1. Sampling sites of the *C. plumosus* and sediment. A: Panmun stream, Jinju, Gyeongsangnam-do. B: Yeongam stream, Yeongam-gun, Jeollanam-do. C: Yeondeung stream, Yeosu, Jeollanamdo. Asterisk(*): recreational and market area. □: Residential area.

한계는 다음과 같다: Al: $0.005 \mu\text{g L}^{-1}$, AS: $0.0006 \mu\text{g L}^{-1}$, Cd: $0.00009 \mu\text{g L}^{-1}$, Cr: $0.0002 \mu\text{g L}^{-1}$, Cu: $0.0002 \mu\text{g L}^{-1}$, Fe: $0.0003 \mu\text{g L}^{-1}$, Mn: $0.00007 \mu\text{g L}^{-1}$, Pb: $0.00004 \mu\text{g L}^{-1}$, Se: $0.0007 \mu\text{g L}^{-1}$, Zn: $0.003 \mu\text{g L}^{-1}$, Hg: $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. 그리고 채집한 *C. plumosus*는 마운팅하여 현미경 하에서 종을 동정한 후, 분자지표 유전자 발현을 측정하기 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

3. 실내 실험종인 *C. riparius*를 대상으로 한 노출실험

실내에서 사육한 4령기의 *C. riparius*를 대상으로 불특정한 다양한 물질이 복합되어 있는 현장수에 노출하였다. 실내 사육된 *C. riparius*는 OECD에서 제시한 표준 사육방법에 따라 사육하였으며 (OECD, 2001), 배양액으로는 M4 배지를 사용하였고, 사육온도는 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 70%, 광주기 16:8 (light:dark)의 조건으로 항온기 내에서 사육

하였고 노출실험 조건도 위와 동일한 조건에서 진행하였다. 사육하는 동안 먹이는 Tetramin (TetraWerke, Melle, Germany)을 곱게 갈아 매일 공급해 주었으며 노출실험이 진행되는 동안 개체 간 공식을 막기 위해 소량 공급해 주었다. 노출로 사용한 현장수는 조사지역 중 여수의 연등천의 하상부근의 수체를 BOD 측정 시 채수하는 방법에 따랐으며, 채수한 환경수는 아이스박스에 담아 실험실까지 4°C 이하에서 운반한 후, 노출실험에 이용하였다. 노출실험이 진행되는 동안에는 산소부족으로 실험생물이 치사되는 것을 막기 위해 공기를 공급하였다. 야외서식종의 환경수 노출농도와 가능한 동일한 조건을 유지하기 위하여, 환경수의 농도는 사육배지와 희석 없이 100% 환경수를 사용하여 한 수조당 20개체씩, 3번 반복 노출하였다. 실험이 진행되는 96시간 동안 매일 사망 개체를 확인하였으며, 사망한 개체는 육안으로 관찰했을 때 붉은 빛을 띠지 않으며, 노출 비이커의 사육수를 스포이드에 담은 물로 자

극하였을 때 몸의 움직임이 전혀 없는 경우에 사망한 것으로 평가하였다. 사망한 실험생물은 즉시 제거하였으며, 실험 종료 후에는 살아 있는 실험생물들을 모두 회수하여 -80°C에 보관하였다.

4. 분자지표 유전자 발현 측정

조사지역의 서식종인 *C. plumosus*와 현장 환경수에 96 시간 노출된 실내 사육종 *C. riparius*의 HSPs (HSP 70, HSP 40, HSP 90), CYP 450, GST, SP 유전자 발현을 분석하였다. TRIZOL (Invitrogen, Scotland, UK)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 또한 cDNA는 4 µg total RNA와 random hexamer 프라이머를 이용해 SuperScript® III RT kit (Invitrogen, Scotland, UK)로 합성하였다. 각 분자지표 유전자의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 시퀀스 정보는 Table 1에 나타냈으며 정량화를 위한 내부 컨트롤로는 GAPDH (EU999991)를 이용하였다. qRT-PCR 증폭과 발현 양 측정은 SYBR green mixture (Takara, Kyoto, Japan)와 AB7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 실시하였다. qRT-PCR 조건은 94°C에서 20초, 55°C에서 40초, 72°C에서 40초로 38 cycles을 실시한 후 72°C에서 1분 정도 더 증폭하였다. 각 분자지표 유전자의 발현양은 AB7300 System SDS software를 이용하여 분석하였고 각 실험은 3회 반복 수행하여 분석하였다.

5. 통계적 자료 분석

각 실험생물의 분자지표 유전자의 발현양은 standard curve를 기준으로 GAPDH의 발현양을 internal control로

표준화(normalized)하였다. 실험생물과 대조구 간의 표준화된 발현양의 유의성을 비교하기 위해 SPSS 12.0KO (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Tukey's multiple range test로 분석하였다. p<0.05를 통계적으로 유의수준으로 검정하였다.

결 과

1. 조사지역 하상퇴적물과 *C. plumosus*의 중금속 분석

여수의 연등천, 진주의 판문천과 영암의 영암천 퇴적물에서 Al, Fe, Mn, Cu, Cr, Zn, Se, Pb, As, Cd의 함량을 분석하였다 (Table 2). 퇴적물의 중금속 중에서 Al과 Fe이 가장 많은 양으로 검출되었다. 세 조사지점에서 채집한 퇴적물 중 중금속 함량의 평균치를 「수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 시행규칙」에 따른 수질오염물질의 배출허용기준 (제34조 및 별표 13)과 비교했을 때, Al을 제외한 나머지 항목인 Fe, Mn, Cu, Cr, Zn, Se, Pb, As, Cd은 배출허용기준을 넘는 수준으로 검출되었다. 조사지점별로 살펴보면, 여수의 연등천에서 Al과 Fe이 각각 22513.8 mg L⁻¹와 21,834 mg L⁻¹로 가장 높게 검출되었으며, Mn과 Pb, Cd도 각각 456.0, 31.7, 0.2 mg L⁻¹로 세 조사지점 중에서 가장 높게 검출되었다. 진주의 판문천에서는 Cu (27.5 mg L⁻¹)와 Zn (129.8 mg L⁻¹), Se (0.3 mg L⁻¹)가 가장 높게 검출되었으며, 영암의 영암천에서는 Cr (16.4 mg L⁻¹)와 As (2.5 mg L⁻¹)가 가장 높게 검출되었다. 따라서 조사지점에 따라 각 중금속의 함량에 차이가 있는 것으로 나타났다. 조사지점 중에서 중금속 10개 항목 중 5개 항목이 가장 높게 나타난 여수 연등천의 퇴적물이 중금속 함량이 상대적으로 가장 높은

Table 1. Primers used to amplify specific genes.

Gene name	Primer sequence (5' to 3')	Accession number
CYP450 (CYP4G)	F: GACATTGATGAGAATGATGTTGGTG R: TAAGTGGAAGCTGGTGGGTACAT	FJ541450
HSP40	F: CGATTTCGATCTATATGTGTCAT R: GCCTTCCAGCCCGGCTTCAC	EU490320
HSP70	F: CATGTGAACGAGCCAAGAGA R: TCGAGTTGATCCACCAACAA	HM769899
HSP90	F: TTCGGTGTGGGTTTCTACTC R: CTCCACCAGTAGCTCGATCGGGT	EU490319
SP	F: GGATCTGCTGCTCATTGCACA R: CAGCTGAACCTGGATGTGAGG	EU783960
GST (Theta 1)	F: CATAAAAGCCCCGTGCCTTAG R: GTGTGGCTTGAAAGTGCTGA	EZ966126
GAPDH	F: GGTATTTTCATTGAAATGATCACTTGT R: TAATCCTTGGATTGCAITGACTTG	EU999991

Table 2. Concentrations of heavy metals for sediment and *C. plumosus*.

	Al	Fe	Mn	Cu	Cr	Zn	Se	Pb	As	Cd
Sediment										
	Unit: mg kg ⁻¹ dry weight									
Yeosu	22513.8	21834.4	456.0	14.9	13.8	114.1	0.1	31.7	1.4	0.2
Jinju	7108.2	7042.3	391.3	27.5	8.5	129.8	0.3	7.2	1.5	0.1
Yeongam	12158.1	16847.0	236.5	8.6	16.4	93.0	0.0	21.8	2.5	0.1
Average	13926.7	15241.2	361.3	17.0	12.9	112.3	0.1	20.2	1.8	0.1
Standard ^a	—	10.0	10.0	3.0	2.0	5.0	0.1	0.5	0.25	0.1
<i>C. plumosus</i>										
	Unit: mg L ⁻¹									
Yeosu	211.9	275.0	10.5	3.0	0.2	17.3	N.D	0.2	N.D	N.D
Jinju	8.7	112.6	3.1	0.9	0.0	9.6	N.D	N.D	N.D	N.D
Yeongam	1407.6	1239.8	29.6	4.9	1.2	36.4	N.D	1.6	N.D	N.D
Average	542.7	542.5	14.4	3.0	0.5	21.1	—	0.9	—	—
Standard ^a	—	2.0	2.0	1.0	0.5	1.0	—	0.1	0.05	0.02

^a Effluent quality standard for aquatic pollutants, according to ordinance on water quality and aquatic ecosystem conservation
N.D: Not detected

것으로 나타났으며, 영암천은 중금속 2개 항목(Cr, As)의 함량이 가장 높게 나타났다.

여수의 연등천과 진주의 판문천, 영암의 영암천에서 채집한 *C. plumosus* 체내의 Al, Fe, Pb, As, Se, Cd, Mn, Cu, Cr, Zn의 함량을 분석하였다(Table 2). *C. plumosus*의 중금속 검출량은 퇴적물의 중금속 검출량보다 낮은 수준으로 나타났다. *C. plumosus*의 체내에서는 Al과 Fe가 가장 높은 수준으로 검출되었으며, As와 Se, Cd는 검출되지 않았다. 세 조사지점에서 채집한 *C. plumosus*의 체내 중금속량의 평균치를 「수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 시행규칙」에 따른 수질오염물질의 배출허용기준(제34조 및 별표 13)과 비교해 본 결과, Fe와 Mn, Cu, Cr, Zn, Pb의 평균 중금속 함량이 기준치보다 높은 수준으로 나타났다. 조사지점별로 살펴보면, 영암의 영암천에서 채집한 *C. plumosus*의 체내에서 Al과 Fe, Mn, Cu, Cr, Zn, Pb가 가장 많이 축적된 것으로 나타났다. 반면에 진주의 판문천에서 채집한 *C. plumosus*에서 Al과 Fe, Mn, Cu, Cr, Zn, Pb가 상대적으로 가장 낮게 검출된 것으로 나타났다.

2. 현장 채집된 *C. plumosus*의 분자지표 유전자발현

현장(영암 영암천, 진주 판문천, 여수 연등천)에서 채집한 *C. plumosus*를 대상으로 분자지표 유전자 발현을 확인하였다(Fig. 2). HSPs(HSP 70, HSP 40, HSP 90) 유전자에서 HSP 70과 HSP 40의 발현패턴이 비슷하게 나타났으며, HSP 90과 CYP 450, GST가 비슷한 발현 경향을 보였다. *C. plumosus* HSP70, HSP40을 대상으로 유전자 발현을 확인해 본 결과, HSP70에 비해 HSP40이 전체적으로 발현량이 낮았으며 여수 연등천에서 가장 높은 발현량을 나타냈

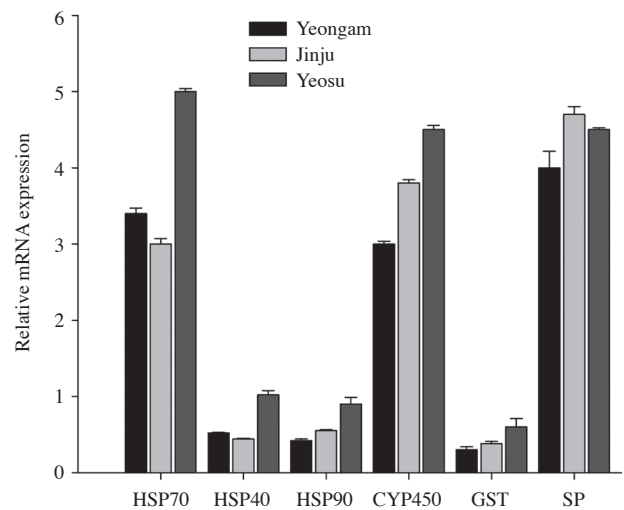


Fig. 2. Relative biomarker gene expressions of the *C. plumosus* sampled at three field sites.

며, 진주 판문천에서 가장 낮은 발현량을 보였다. HSP 90, CYP 450, GST 유전자 발현에서는 영암 영암천에서 가장 낮은 발현량을 나타내었으며, 여수 연등천에서 발현량이 가장 높았다. CYP 450에서 전체적으로 높은 발현량을 나타내었으며, GST에서 낮은 발현량을 보였다. SP 유전자 발현은 진주 판문천에서 가장 높은 발현량을 보였으며, 영암 영암천에서 상대적으로 낮은 발현량을 나타내었다.

3. 환경수 노출에 의한 *C. riparius*의 유전자 발현 분석

여수 연등천의 환경수를 실내 사육된 *C. riparius*에 96시간 노출시킨 후 분자지표 유전자의 발현분석을 확인하였

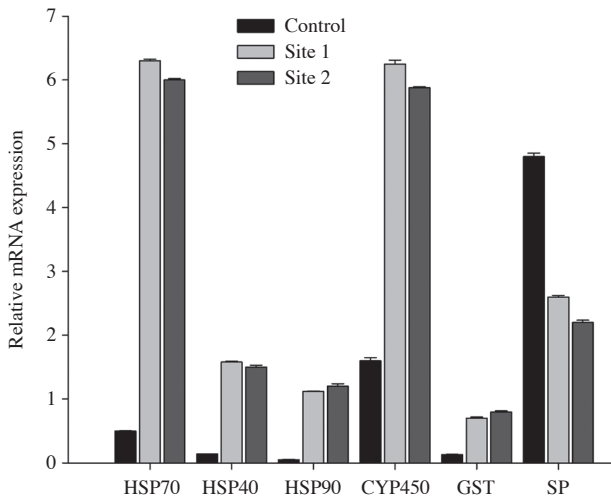


Fig. 3. Relative biomarker gene expression of the *C. riparius* exposed to environmental water in Yeondeung stream.

다 (Fig. 3). 환경수에 노출된 *C. riparius*는 SP 유전자를 제외한 HSPs, CYP 450, GST 유전자에서 높은 발현량을 나타내었다. HSP 70과 HSP 90 유전자는 노출되지 않은 대조구에 비해 약 12배 발현양이 증가하였으며, HSP 40 유전자의 경우에는 15배 정도의 발현 증가를 나타내었다. CYP 450 유전자의 경우에는 4배 정도 발현양이 증가하였고 GST 유전자는 8배 정도의 발현 증가를 나타냈다. 이와는 대조적으로 SP 유전자는 2배 정도의 발현 감소를 나타내었다.

고 찰

환경에 존재하는 다양한 형태의 유해물질은 유전자 발현에 영향을 유발할 수 있으며, 많은 유전자는 독성물질의 직간접적인 영향을 받아 유전자 발현이 달라진다. 유전자 발현의 변화는 환경 위해성평가를 위한 다양한 연구 분야에서 응용되고 있다. 중금속은 지각을 구성하는 주요성분일 뿐만 아니라 일상생활에서 흔히 쓰이는 생활용품 및 공업용품의 원료로 사용되며 오염된 수계와 퇴적물에서 높은 농도로 축적되고 있다. 퇴적층에 서식하는 저서생물인 *Chironomus*는 축적된 중금속의 영향을 알아보기에 좋은 지표생물이다.

HSPs (HSP 70, HSP 40, HSP 90), CYP 450과 GST는 다양한 스트레스 요인에 의해 발현되는 분자지표 유전자로 위해성 평가를 위해 적용하고자 하는 시도들이 이루어지고 있는 추세이다. 다양한 오염원이 유입되는 지점에서 채집한 송어 (*Mugil curema*)의 HSP 70 발현이 높은 수준으로

증가하였고 (Rios-Sicairos *et al.*, 2010), 중금속 오염지역에서 서식 중인 송어 (*M. curema*)와 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)의 CYP 450의 발현이 증가하였다 (Rocha-e-Silva *et al.*, 2004; Rios-Sicairos *et al.*, 2010). GST의 경우에 금속 오염지역과 폐수 처리장이 인접한 곳에서 서식 중인 홍합 (*Dreissena polymorpha*), 미국가재 (*Procambarus clarkia*) 및 담수 홍합 (*Elliptio complanata*)에서 활성이 증가함이 보고되었다 (Gagné *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2010). 본 연구에서 조사한 지역의 퇴적물과 체내 중금속 함량을 분석값은 기준치를 훨씬 넘는 수준으로 나타났으며, 이에 상응하여 분자지표 유전자인 HSPs (HSP 70, HSP 40, HSP 90), CYP 450과 GST의 발현이 증가하여 나타났다.

오염지역의 환경수에 노출된 유럽산 뱀장어 (*Anguilla Anguilla*)와 퇴적물에 노출된 유럽산가자미 터봇 (*Scophthalmus maximus*)의 CYP 450 발현이 증가하였으며 (Agradi *et al.*, 2000; Kilemade *et al.*, 2009), 오염지역의 퇴적물에 노출된 지렁이 (*Lumbriculus variegates*)에서 GST의 발현이 증가하였고 (Contardo-Jara and Wiegand C, 2008), 공장 폐수에 노출된 유럽산 뱀장어 (*A. anguilla*)와 잉어 (*Leuciscus alburnoides*)에서 GST 활성이 증가한 것으로 보고되었다 (Lopes *et al.*, 2001; Maria *et al.*, 2003).

SP 유전자는 HSPs, CYP 450, GST 유전자와 달리 항상 일정하게 체내에 존재하는 유전자로, Di-ethylhexyl phthalate (DEHP)에 노출된 *C. riparius*에서 유전자 발현이 감소된 것으로 보고되었다 (Park and Kwak, 2008). 본 연구에서도 중금속을 포함한 다양한 불특정 복합물질에 노출된 *C. riparius* SP 유전자 발현이 감소한 것으로 나타났다. 유사한 예로 AI의 노출에 의해 *C. riparius*의 침샘 유전자는 기능적 및 구조적으로 손상을 받는다고 알려져 있다 (Michailova *et al.*, 2003).

퇴적물 내 중금속 양과 생물체내에 축적된 중금속의 농도에 차이가 나타나는 것은 체내로 유입된 필수 금속이 과도한 양으로 유입될 때 체내 유입을 제한하거나 배출시키며, 불활성 형태로 저장시킴으로써 체내에 축적되는 양을 조절함으로써 인해 차이가 나타난다고 보고하였다 (Rainbow, 2002). 본 연구에서 퇴적물의 주요 중금속 함량은 여수 연등천은 퇴적물의 중금속 함량이 가장 높았으며, 특히 Pb와 Cd의 수치가 높았으며 체내 축적된 중금속의 함량은 영암의 영암천에서 가장 높게 검출되었다. 야외 환경에 서식하며 지속적으로 자연적 복합물질에 노출된 *C. plumosus*의 분자지표 유전자의 발현을 측정된 결과 HSPs (HSP 70, HSP 40, HSP 90), CYP 450과 GST 유전자의 발현은 여수 연등천에서 채집한 *C. plumosus*에서 가장 높은 것으로 나타났다.

최근 연구에서 PFOS (Perfluorooctane sulfonate)와 DEHP (Di-ethylhexyl phthalate)를 바다 송사리 (*Oryzias melastigma*)에 노출시켜 복합물질에 의해 다양한 유전자 발현이 나타남을 보고하였다 (Huang *et al.*, 2015). 복합오염원이나 중금속 노출로 인해 생물이 받은 영향을 유전자 발현으로 살펴보는 것은 퇴적물 내에 함유된 모든 물질을 분석하는 것이 어려운 경우 분자지표 유전자 발현을 통해 반응성을 살펴볼 수 있는 장점이 있다. 야외 환경은 복합오염원이나 물질로 구성된 환경으로 단일 물질에 노출하여 이루어진 실내 연구 결과와는 차이가 많을 것으로 인식되고 있으나 어떤 차이가 있는 지를 살펴본 연구는 드물다. 이에 실내 사육종인 *C. riparius*의 HSPs, CYP 450, GST와 SP 유전자 발현의 현장적용 가능성을 검토하기 위하여, 야외 *C. plumosus*가 서식하는 연등천의 환경수에 실내종인 *C. riparius*를 노출시켜 HSPs, CYP 450, GST와 SP 유전자 발현을 측정하였다. 중금속 함량이 높고 유기물 오염된 여수 연등천에서 야외 서식종인 *C. plumosus* 분자지표 발현이 높게 나타난 것과 같이 실내종인 *C. riparius*에서도 높은 분자지표의 발현을 나타내었다 (SP유전자 제외: Figs. 2, 3). 환경에 민감하게 반응하고 적응하는 소화관련 유전자인 SP 유전자 발현은 연등천의 환경수에 노출된 실내종 *C. riparius*의 경우 매우 크게 감소하여 일정하고 안정된 배양조건에서 사육되던 실내종의 경우에 환경수 노출은 매우 극심한 스트레스로 작용하여 SP 유전자의 기능저하가 수반되었을 것으로 사료된다. 다양한 환경에 적응된 야생종인 *C. plumosus*와 실내 사육종인 *C. riparius*의 분자지표 유전자의 발현은 매우 유사한 양상을 나타내었으나 소화와 관련된 SP유전자 발현에는 차이를 보였다.

사 사

이 논문은 한국연구재단 기초연구사업의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2013-R1A2A2A-01004914).

REFERENCES

- Agradi, E., R. Baga, F. Cillo, S. Ceradini and D. Heltai. 2000. Environmental contaminants and biochemical response in eel exposed to Po river water. *Chemosphere* **41**: 1555-1556.
- Andreia, C.M.R., G. Carlos, Q. Carla, G. Oksana, Z. Vladimir, B. Carlos, M.V.M.S. Amaden and L.T.P. Joao. 2015. Life history and biochemical effects of Chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment* **508**: 506-513.
- Bian, G., A.S. Raikhel and J. Zhu. 2008. Characterization of a juvenile hormone-regulated chymotrypsin-like serine protease gene in *Aedes aegypti* mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**: 190-200.
- Buhler, D.R. and D.E. Williams. 1988. The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquatic Toxicology* **11**: 19-28.
- Contardo-Jara, V. and C. Wiegand. 2008. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Lumbriculus variegates* as biomarkers of contaminated sediment exposure. *Chemosphere* **70**: 1879-1888.
- Demirak, A., F. Yilmaz, A.L. Tuna and N. Ozdemir. 2006. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. *Chemosphere* **63**: 1451-1458.
- Faria, M., D. Huertas, D.X. Soto, J.O. Grimalt, J. Catalan, M.C. Riva and C. Barata. 2010. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere* **78**: 232-240.
- Faria, M.S., R.J. Lopes, J. Malcato, A.J. Nogueira and A.M. Soares. 2008. In situ bioassays with *Chironomus riparius* larvae to biomonitor metal pollution in rivers and to evaluate the efficiency of restoration measures in mine areas. *Environmental Pollution* **151**: 213-221.
- Gagné, F., C. Blaise and J. Hellou. 2004. Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated sewage municipal effluent plume for 1 year. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **138**: 33-44.
- Garcia Sampaio, F., C. de Lima Bojink, E. Tie Oba, L. Romagueira Bichara dos Santos, A. Lúcia Kalinin and F. Tadeu Rantin. 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **147**: 43-51.
- George, D., N. Ferry, E.J. Back and A.M. Gatehouse. 2008. Characterisation of midgut digestive proteases from the maize stem borer *Busseola fusca*. *Pest Management Science* **64**: 1151-1158.
- Hightower. 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* **66**: 191-197.
- Huang, Q., Y. Chen, Y. Chi, Y. Lin, H. Zhang, C. Fang and S. Dong. 2015. Immunotoxic effects of perfluorooctane sulfonate and di(2-ethylhexyl) phthalate on the marine fish *Oryzias melastigma*. *Fish & Shellfish Immunology* **44**: 302-306.
- Kalmar, B. and L. Greensmith. 2009. Induction of heat shock

- proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**: 310-318.
- Kilemade, M., M.G. Hartl, J. O'Halloran, N.M. O'Brien, D. Sheehan, C. Mothersill and F.N. van Pelt. 2009. Effects of contaminated sediment from Cork Harbour, Ireland on the cytochrome P450 system of turbot. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**(3): 747-755.
- Kim, M., K. Park, J.Y. Park and I.S. Kwak. 2013. Heavy metal contamination and metallothionein mRNA in blood and feathers of Black-tailed gulls (*Larus crassirostris*) from South Korea. *Environmental Monitoring and Assessment* **185**: 2221-2230.
- Limon-Pacheco, J. and M.E. Gonsebatt. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* **674**: 137-147.
- Lopes, P.A., T. Pinheiro, M.C. Santos, M.D.L. Mathias, M.J. Colares-Pereira and A.M. Viegas-Crespo. 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Science of the Total Environment* **280**: 153-163.
- Maria, V.L., A.C. Correia and M.A. Santos. 2003. Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp and secondary-treated effluents on *Aguilla anguilla* L. *Ecotoxicology and Environment Safety* **55**: 126-137.
- Martínez-Paz, P., M. Morales, J.L. Martínez-Guitarte and G. Morcillo. 2012. Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **155**(2): 333-343.
- Michailova, P., J. Ilkova and K.N. White. 2003. Functional and structural rearrangements of salivary gland polyene chromosomes of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) in response to freshly neutralized aluminum. *Environmental Pollution* **123**(2): 193-207.
- Ministry of Maritime Affairs and Fisheries. 2005. Maritime environment Pollutant' Testing method. p. 238-243.
- Monica, M., M. Pedro, M. Raquel, P. Rosario, U. Josune, M. Jose and M. Gloria. 2014. Transcriptional changes induced by in vivo exposure to Pentachlorophenol(PCP) in *Chironomus riparius* (Diptera) aquatic larvae. *Aquatic Toxicology* **157**: 1-9.
- Nadella, S.R., J.L. Fitzpatrick, N. Franklin, C. Bucking, S. Smith and C.M. Wood. 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **149**: 340-348.
- Nair, P.M. and J. Choi. 2011. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. *Aquatic Toxicology* **101**(3-4): 550-560.
- OECD. 2001. Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline for testing of chemicals, sediment-water *chironomid* toxicity test using spiked sediment. p. 218.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2008. Expression of *Chironomus riparius* serine-type endopeptidase gene under di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **151**(3): 349-354.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2009. Alcohol dehydrogenase gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **150**(3): 361-367.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2010. Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* **79**(9): 934-941.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2014a. Characterization and gene expression of heat shock protein 90 in marine crab *Charybdis japonica* following bisphenol A and 4-nonylphenol exposures. *Environmental Health and Toxicology* **29**: 1-7.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2014b. The effect of temperature gradients endocrine signaling and antioxidant gene expression during *Chironomus riparius* development. *Science of the Total Environment* **471**: 1003-1011.
- Park, K., H.W. Bang, J. Park and I.S. Kwak. 2009. Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere* **77**(3): 359-367.
- Park, K., J. Park, J. Kim and I.S. Kwak. 2010. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **151**(4): 439-446.
- Park, K., J.S. Lee, J. Kang, J.W. Kim and I.S. Kwak. 2015. Cascading effects from survival to physiological activities, and gene expression of heat shock protein 90 on the abalone *Haliotis discus hannai* responding to continuous thermal stress. *Fish and shellfish Immunology* **42**: 233-240.
- Rainbow, P.S. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?. *Environmental Pollution* **120**: 497-507.
- Rand, G.M., P.G. Wells and L.S. McCarty. 2003. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand GM (ed) Fundamentals of aquatic toxicology. Taylor and Francis, New York. p. 123-167.
- Rios-Sicairos, J., M. Betancourt-Lozano, B. Leal-Tarin, R. Hernandez-Cornejo, G. Aguilar-Zarate, L.M. Garcia-De-La-Parra, J.N. Gutierrez, F. Marquez-Rocha and A. Garcia-Gasca. 2010. Heat-shock protein (Hsp70) and cytochrome P-450 (CYP1A) in the white mullet *Mugil curema* (Pisces: Mugilidae) as biomarkers to assess environmental quality in coastal lagoons. *Journal of Environmental Science and Health Part A* **45**(1): 68-74.

- Rocha-e-Silva, T.A., F.T. Rantin, J.E. Matsumura-Tundisi, T. Matsumura-Tundisi, J.G. Tundisi and I.A. Degtere. 2004. Dynamics of cytochrome P450 inducers in polluted sites of São Paulo city reservoirs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **59**(1): 109-115.
- Shu, Y., Y. Du and J. Wang. 2011. Molecular characterization and expression patterns of *Spodoptera litura* heat shock protein 70/90, and their response to zinc stress. *Comparative biochemistry and physiology Part A* **158**(1): 102-110.
- Terra, W.R., B.P. Jordao and R.J. Dillon. 1996. Digestive enzymes. In: Bilingsley, P., M. Lehane, (eds.), *Biology of the Insect Midgut*. Chapman and Hall, London. p. 159-194.
- Tuikka, A.I., C. Schmitt, S. Höss, N. Bandow, P.C. von der Ohe, D. de Zwart, E. de Deckere, G. Streck, S. Mothes, B. van Hattum, A. Kocan, R. Brix, W. Brack, D. Barceló, A.J. Sormunen and J.V. Kukkonen. 2011. Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**: 123-131.
- Volpicella, M., J. Cordewener, M.A. Jongsma. R. Gallerani, L.R. Ceci and J. Beekwilder. 2006. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitorresistant *Helicoverpa zea* larval midgut. *Journal of Chromatography B* **833**: 26-32.