

오염 퇴적물 평가 기법으로서의 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 세포내 에너지 할당 (cellular energy allocation, CEA) 적용성 검토

성찬경, 강신길, 정지웅, 박동호, 이종현, 이창훈

이에이치알앤씨(주) 환경보건안전연구소

Evaluation of cellular energy allocation (CEA) in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* as a tool for assessment of contaminated sediments

Chan-Gyoung Sung, Sin-Kil Kang, Jiwoong Chung, Dong-Ho Park, Jong-Hyeon Lee and Chang-Hoon Lee

Environmental Health & Safety Research Institute, EH R&C Co. Ltd. Bucheon 14487, Republic of Korea

ABSTRACT

To evaluate the applicability of cellular energy allocation (CEA) in the bivalves as a biomarker for the assessment of environmental contamination, the energy contents and energy consumption in several tissues of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* were analyzed. The contents of lipid, glucose, protein and electron transport system (ETS) activity in the foot, siphons, gills, and body of *R. philippinarum* exposed to crude oil-spiked sediments were measured at 1, 2, 4, 7, 10 days after exposure. The reserved energy (energy available, EA) in the lipid, glucose and protein decreased as contamination level and exposure time increased. In contrast, the ETS activity (energy consumed, EC) showed the reverse tendency. The order of available energy contents were foot > siphons > gill > body. Significant differences in both EA and EC were found only at the highest contamination level (58.3 mg TPAHs/kg DW). EA decreased significantly in the foot and gill at 1 day, in the body at 2 and 7 days after exposure. EC increased significantly in the body at 4 days after exposure. CEA showed higher sensitivity to the contamination than EA or EC. Especially, CEA in the foot and body decreased significantly at lower ranges of contamination level (as low as 6.5 mg TPAHs/kg DW) during 1 to 7 days after exposure. The CEA is more useful than EA or EC alone for the assessment of sediment contamination at lower level that acute toxicity could not be detected. CEA analyses in the body of *R. philippinarum* after 4 days' exposure to contaminated sediments seem to be the most sensitive and reliable.

Key words: cellular energy allocation (CEA), *Ruditapes philippinarum*, Manila clam, contaminated sediments, crude oil

서 론

생물의 성장 과정은 주요 생리적 반응 즉, 에너지 획득 (섭식과 동화) 과 에너지 소비 (대사, 배설) 과정 사이 균형의 통합 결과로 나타난다 (Widdows and Donkin, 1992). 이러한 생리적 과정의 에너지 대사를 추정하여 성장잠재력 (scope for growth, SFG) 을 추정할 수 있다 (Goldberg and Bertine, 2000; Widdows and Donkin, 1992). 성장잠재력을 추정하기 위해서는 섭식률 (여과율) 및 동화효율, 호흡률, 배설률 등과 같은 생리적인 과정을 실험적으로 측정하여야 하고 이 과정은 많은 시간과 노력을 필요로 한다. De Coen and Janssen (1997; 2003), De Coen *et al.* (2001) 등은 세포내 에너지 할

Received: March 7, 2016; Revised: March 23, 2016;
Accepted: March 31, 2016

Corresponding author : Chang-Hoon Lee

Tel: +82 (70) 5102-4501, e-mail: c.lee@ehrc.com
1225-3480/24609

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

당 (cellular energy allocation, CEA) 을 SFG의 생화학적 대안으로 제시하였다. CEA는 생물의 세포 수준에서 일어나는 여러 가지 과정 중 흡수된 에너지와 소비된 에너지 사이의 양적 균형이 어느 정도인지를 평가하는 방법이다. CEA는 세포 내에 존재하는 지질, 글루코오스, 단백질의 함량과 세포내 전자전달계 (electron transport system, ETS) 활성을 측정하여 에너지 수지를 계산한다 (Fanslow *et al.*, 2001; De Coen and Janssen, 2003). 지질, 글루코오스, 단백질은 생물체를 구성하는 대표적인 저장물질이며, ETS 활성은 미토콘드리아의 산소 소모율로 세포 단계에서 소비하는 에너지의 양을 나타내는 지표이다.

CEA는 SFG에 비해 상대적으로 짧은 기간 내에 민감하게 반응하는 특징을 갖고 있어, SFG를 대신하여 환경의 스트레스로 인한 생리적 반응을 나타내는 훌륭한 지표가 될 수 있다. Smolders *et al.* (2004) 은 동일한 생물을 이용하여 CEA와 SFG를 함께 측정하여 이 두 지표간의 비교를 실시한 바 있다. 오염의 구배에 대하여 반응하는 정도가 CEA의 경우 지질, 글루코오스, 단백질 함량 모두 민감하게 반응하는 반면, SFG의 경우 여과율 (clearance rate) 만이 오염의 구배에 반응을 보이고, 나머지 지표 (호흡률, 비만도 지수, 건중량/습중량비) 들은 오염에 뚜렷한 상관성을 나타내지 않았다. 따라서, CEA는 SFG를 측정하는 것보다 훨씬 적은 노력과 시간으로 보다 더 민감하게 생리적 상태를 반영할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

생물이 스트레스를 받지 않은 안정적인 상태에서 충분한 먹이를 섭취하였을 경우 저장된 에너지의 양은 최대가 된다. 반면 물리적, 화학적 스트레스가 있는 경우 충분한 먹이를 섭취하였다 할지라도 획득한 에너지의 상당 부분을 스트레스를 완화시키거나 외래물질 (xenobiotics) 에 저항하기 위하여 사용하게 되므로 저장된 에너지의 양도 감소할 뿐 아니라 소모되는 에너지의 양도 증가하게 된다 (Kooijman and Bedaux, 1996; Calow, 1998; De Coen *et al.*, 2001). 일반적으로 오염 물질로 인한 개체 수준의 악영향은 개체 내 조직의 세포 또는 세포 이하 수준에서의 생화학적 시스템과의 상호 작용을 통해 나타난다 (Giesy and Grainey, 1989; Munkittrick and McCarty, 1995). 세포 수준에서 스트레스가 존재하면 개체의 성장 및 유지에 상대적으로 더 낮은 에너지가 할당되게 되고 결국 생식이나 발생 과정이 정상적으로 이루어지지 못하게 된다 (Adams and Breck, 1990; Munkittrick and McCarthy, 1995; Kooijman and Bedeaux, 1996; Adams and Greeley, 2000). 이러한 메커니즘으로 인해 CEA는 스트레스의 강도가 증가할수록 감소하는 특징을 갖고 있다. CEA의 유용성은 지각류 (De Coen and Janssen, 1997; Muyssen *et al.*, 2001; De Coen and Janssen, 2003), 어류 (Nguyen, 1997), 곤쟁이류 (Verslycke *et al.*, 2003) 등을

대상으로 검증된 바 있다.

이와 같은 여러 가지 CEA의 장점에도 불구하고, 유해화학물이 생물에게 미치는 영향이나, 현장 시료의 독성 평가 등에 보편적으로 활용된 사례는 많지 않다. 유해 화합물질에 대해서는, Hg, lindane, Cd, Cr, TBT, LAS, Na-PCP, 2,4-D (De Coen and Janssen, 1997; 2003), TBT, chlorpyrifos (Verslycke *et al.*, 2003; 2004a) 등과 같이 일부 화합물질에 대해 제한적으로 연구가 이루어졌고, 산업폐수 평가 (Smolders *et al.*, 2003), 오염구배에 따른 CEA 변화 (Smolders *et al.*, 2004), 내분비계교란물질의 영향 (Verslycke *et al.*, 2004b), 유류관련 화합물 등에 관련된 현장 평가 연구 (Olsen *et al.*, 2007) 등이 소수의 연구자들에 의해 수행되어졌다. 분류군별로는 갑각류 (De Coen and Janssen, 1997; Verslycke *et al.*, 2004a; 2004b; Erk *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2008), 어류 (Smolders *et al.*, 2003), 패류 (Smolders *et al.*, 2004; Erk *et al.*, 2011; Maranhão *et al.*, 2015), 빈모류 (Novais and Amorim, 2013; Novais *et al.*, 2013), 해삼류 (Kühnhold *et al.*, 2016) 등을 대상으로 수행되어졌다. 해산 이매패류인 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 은 오염 해수 및 퇴적물의 만성 평가, 바이오 모니터링 (Morales-Caselles *et al.*, 2008; Moschino *et al.*, 2011), 아치사 영향 연구 (Martín-Díaz *et al.*, 2005; 2007; 2008; Coughlan *et al.*, 2009; Buratti *et al.*, 2010; 2012) 등에 널리 이용된 바 있어 환경 오염 평가를 위한 좋은 지표종으로서의 가능성이 제시된 바 있다.

본 연구에서는 다양한 분류군을 대상으로 실험적으로 증명된 CEA 분석 기법을 국내 서식 바지락에 적용하여 생체 내 에너지 수치 및 CEA 평가가 오염된 현장에 적용 가능한지를 확인하고자 하였다. 이를 위하여, 깨끗한 퇴적물에 원유를 다양한 농도로 투여하여 오염 수준에 따른 바지락 체내의 생리 생화학적 변화를 노출기간별, 조직별로 분석 및 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시험 생물의 준비

바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 은 충청남도 당진시 갯벌 (경도: 126° 33' 08" 위도: 37° 02' 09") 에서 채집하였다. 채집된 바지락은 실험실로 옮긴 후 저면 여과 장치가 있는 40-L 수조에서 깨끗한 모래에 이식하여 순치하였다. 순치 기간 동안 수온은 20 ± 2°C로 유지하였고 여과된 자연해수 (30 psu) 를 배양수로 하였다. 먹이는 미세조류 3 종 (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis*, *Skeletonema costatum*) 을 같은 비율로 혼합하여 매일 급이 하였다. 주 1 회 배양수를 교환하였고 1 개월 간 순치 후 시험에 사용하였다.

2. 시험용 퇴적물의 준비

시험에 사용한 퇴적물은 충남 당진시 송악읍 소재 해안에서 채취하였다. 채취 퇴적물은 300 μm 표준체를 통과 시켜 굵은 입자와 포식성 내서생물을 제거하였다. 준비된 퇴적물에 이란산 원유 (Iranian Heavy Crude Oil) 를 5 단계의 농도로 주입하고 균질화되도록 강하게 교반시켰다. 주입된 원유의 농도는 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25 g/kg 이며 원유를 주입하지 않은 퇴적물을 대조구로 두었다. 원유를 주입한 퇴적물 시료를 6 개의 1 L 비커에 각각 나누어 담고 여과해수 (30 psu) 를 채워 하루 동안 안정시킨 후 상등 해수를 교환하였다.

시험에 사용된 퇴적물을 대상으로 유류의 대표적인 독성물질로 알려져 있는 다환방향족 탄화수소류 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 의 농도를 분석하였다. 시험 종료 후 노출 퇴적물 표층 하 5 cm 까지 취하여 균질화 하였다. 균질화된 시료 약 3 g 을 무게접시에 담아 건중량 측정에 이용하였다. 그리고 약 20 g 시료를 취하여 막자사발에 담아 450°C 에서 4 시간 동안 활성화시킨 Na_2SO_4 50 g 과 함께 혼합하여 수분을 제거 한 뒤 200 mL 의 CH_2Cl_2 로 16 시간 동안 Soxhlet 추출하였다. 추출 전 PAHs 내부 표준물질 (surrogate standards: naphthalene- d_8 , acenaphthene- d_{10} , phenanthrene- d_{12} , chrysene- d_{10} , perylene- d_{12}) 을 첨가하여 회수율을 구하였다. 추출액은 회전용매농축기로 농축하여 $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ 로 용매 치환하였다. 추출액 내 무기 S는 활성 Cu를 이용하여 제거하였고 silica column chromatograph를 이용하여 정제하였다. 정제된 시료는 고순도 질소가스 (99.999%) 를 이용하여 농축시킨 뒤 GC internal standard (terphenyl- d_{14}) 를 첨가하여 GC vial로 옮겨 기기분석 하였다. PAHs의 정량 분석에는 GC/MSD (Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph / Hewlett-Packard 5972 mass selective detector) 를 사용하였다. 퇴적물에서의 PAHs 농도는 16 PAHs와 alkylated PAHs를 구분하여 분석하였고 이들의 총 합을 TPAHs (total PAHs) 로 계산하였다.

3. 노출실험

각 농도 당 1 개의 35 L 수조를 준비하였고 수조 내에 6 개의 비커를 넣고 비커가 모두 잠기도록 여과해수를 채운 후 수조 마다 공기 공급장치를 연결하였다. 순치가 끝난 바지락 (각장 29.2 ± 2.0 mm) 을 각 비커마다 6 개체씩 투입하여 10 일간 노출시켰다. 노출 기간 동안 온도는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 염분은 30 ± 3 psu 로 유지하였다. 배양 해수는 매일 100% 환수하였다. 노출 후 1, 2, 4, 7, 10 일에 각 수조에서 비커 1 개씩 수거하여 각 노출 농도당 3 개체를 대상으로 CEA를 분석하였다.

4. CEA 분석

수거한 개체는 발, 입출수공, 아가미, 몸통의 4 부위로 구분하여 후 액체질소로 급속 냉각하여 CEA 분석 전까지 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다. 발, 입출수공, 아가미를 적출한 후 폐각근과 외투막을 제외한 나머지 부분을 몸통으로 간주하였다. CEA 분석은 EA (energy available) 와 EC (energy consumed) 로 나누어 수행하였다. EA는 지질, 글루코오스, 단백질의 세 가지 항목을 분석하였으며, EC는 electron transport system (ETS) 활성을 측정하였다. 각 분석 부위별 시료에 증류수 1 mL 를 첨가하여 균질화 하여 EA의 세 가지 항목의 분석에 사용하였다.

지질의 분석은 Bligh and Dyer (1959) 의 방법을 따랐다. 균질화된 시료 0.5 mL 에 CHCl_3 와 CH_3OH 를 각각 0.5 mL 씩 첨가 후 일정시간 동안 혼합하여 원심분리하였다. 원심분리된 시료의 하층액 0.1 mL 에 H_2SO_4 0.5 mL 를 첨가하여 200°C 로 가열하여 발색시켰다. 발색된 시료 0.2 mL 를 96-well plate에 넣고 분광광도계를 사용하여 370 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 검량선 작성을 위하여 표준시약 (tripalmitin, Sigma) 을 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 0 mg/L 의 농도로 조제하여 흡광도를 측정하였다 (Fig. 1a).

글루코오스의 분석은 Roe and Dailey (1966) 의 방법을 따랐다. 균질화된 시료 0.2 mL 에 15% $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ 용액 0.4 mL 를 첨가 후 일정시간 동안 혼합하여 -20°C 에서 반응시켰다. 반응이 완료된 후 원심분리하여 상등액 0.1 mL 에 5% $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ 0.1 mL 와 H_2SO_4 0.5 mL 를 첨가하여 발색시켰다. 발색된 시료 0.2 mL 를 96-well plate에 넣고 분광광도계를 사용하여 482 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 검량선 작성을 위하여 표준시약 (glucose, Sigma) 을 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 0 mg/L 의 농도로 조제하여 흡광도를 측정하였다 (Fig. 1b).

단백질은 BCA kit (Sigma) 를 이용하여 분석하였다. 균질화된 시료 0.2 mL 를 원심분리하여 상등액을 제거하고 하층부에 남은 침전물에 5% $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ 0.5 mL 를 첨가하여 60°C 에서 용해시켰다. 용액 0.05 mL 에 BCA working solution 1 mL 를 첨가하여 20°C 에서 발색시켰다. 발색된 시료 0.2 mL 를 96-well plate에 넣고 분광광도계를 사용하여 562 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 검량선 작성을 위하여 표준시약 (bovine serum albumin, Sigma) 을 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 0 mg/L 의 농도로 조제하여 흡광도를 측정하였다 (Fig. 1c).

ETS 활성의 측정은 De Coen and Janssen (1997) 의 방법을 따랐다. 습시료 80-120 mg 에 1 mL 의 buffer 1 (1 M Tris-HCl + 500 μM MgSO_4 + polyvinyl pyrrolidone + Triton X-100) 을 첨가한 후 균질화하였다. 균질화된 시료를 4°C 에서 5000 rpm 으로 20 분간 원심분리하였다. 원심분리

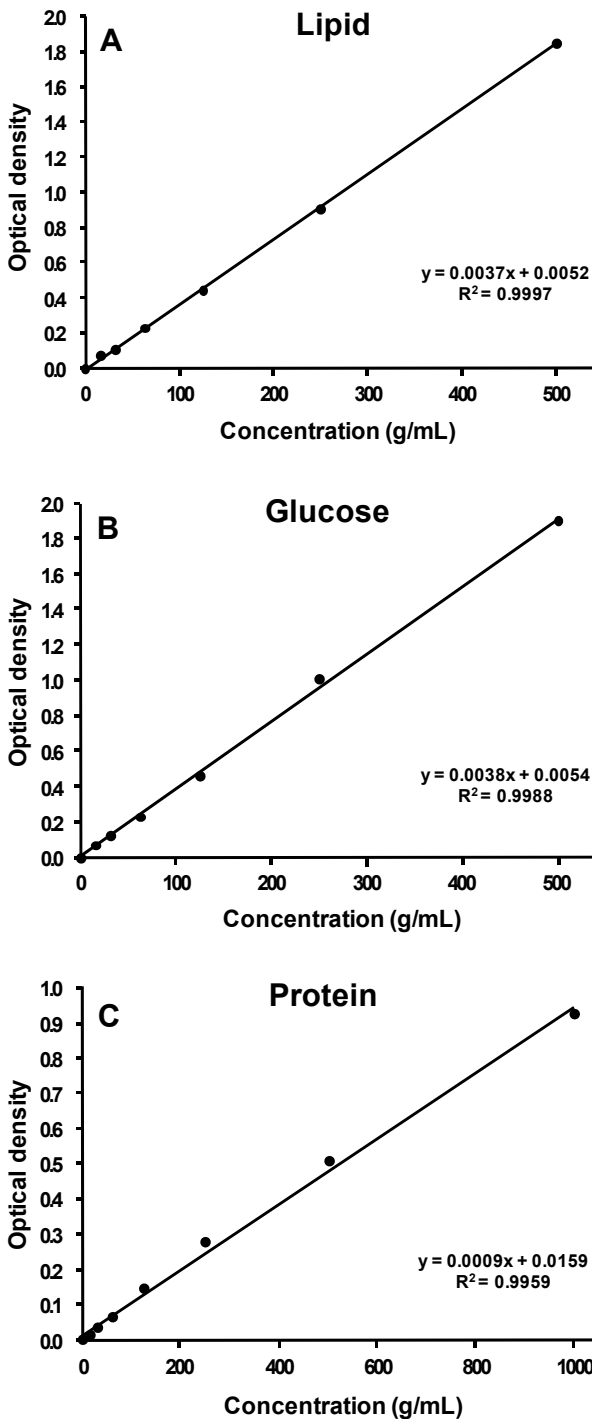


Fig. 1. Standard curves for the spectrophotometric determinations of lipid (A), glucose (B), and protein (C) in the tissues of *Ruditapes philippinarum*

된 시료 0.05 mL 를 96-well plate에 넣고 0.15 mL 의 buffer 2 (1 M Tris-HCl + Triton X-100) 와 0.05 mL 의

buffer 3 (30 mM NADPH + 100 mM NADH) 을 첨가하였다. 여기에 p-iodonitrotetrazolium 0.1 mL 를 첨가하고 20°C 에서 1 분 간격으로 10 분 동안 분광광도계를 사용하여 490 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

측정된 지질, 글루코오스, 단백질 함량, ETS 활성에 각각 39,500 mJ/mg, 17,500 mJ/mg, 24,000 mJ/mg, 484 kJ/mol O₂ (Gnaiger, 1983) 를 적용하여 에너지 단위로 환산하였다. EA는 지질, 글루코오스, 단백질 에너지 함량의 총합으로 계산하였고, CEA는 EA / EC로 계산하였다 (Verslycke *et al.*, 2003).

5. 유의성 검증

노출 농도와 EA, EC, CEA 간의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석 (one-way ANOVA) 을 실시하였고, 대조구와 실험구 간의 유의성을 검증하기 위하여 Dunnett's t-test를 실시하였다. 통계적 유의성을 확인하기 위하여 SPSS 통계 프로그램 (SPSS 12.0, SPSS Inc., USA) 을 이용하였고, 모든 검증에서 유의수준 $\alpha = 0.05$ 로 설정하였다.

결 과

1. 시험 퇴적물 내 PAHs 농도

바지락 노출시험을 위해 퇴적물에 투입한 원유의 양에 따른 퇴적물 내 다환방향족탄화수소류 (PAHs) 의 농도를 Table 1 에 나타내었다. 대조구로 사용된 퇴적물에서의 16 PAHs 및 alkylated PAHs의 농도는 각각 0.01, 0.03 mg/kg DW로, 이는 유류에 의한 오염이 없는 깨끗한 퇴적물의 배경농도 수준과 유사하였다. 원유의 투입량이 증가하면서 퇴적물내 PAHs 의 농도도 증가하는 경향을 나타내었다. 실험에 사용된 퇴적물에서 측정된 total PAHs의 최대값 (58.3 mg/kg DW) 은 실제 유류 유출사고가 발생한 해역 인근의 조간대 퇴적물에서 발견되는 농도의 최대값 보다는 낮은 값이었다. 따라서, 본 실험에서의 노출 조건은 실제 유류사고의 현장에서 흔하게 검출될 수 있는 오염수준이라고 볼 수 있다.

2. 에너지 함량 (energy available, EA)

노출된 바지락 각 부위별로 측정된 에너지 함량은 발에서 4,800-12,200 mJ/mg, 입출수공에서 4,100-13,200 mJ/mg, 아가미에서 3,400-7,400 mJ/mg, 몸통에서 2,600-9,300 mJ/mg 의 범위를 나타내었다. 전체 개체의 평균은 발 > 입출수공 > 아가미 > 몸통의 순으로 에너지 함량이 높았다. 동일 농도 조건에서 노출 기간에 따른 함량의 변화는 일정한 경향을 나타내지 않으며 변동하였다 (Fig. 2). 노출 시간이 길어지면 서, 노출 농도가 증가함에 따라 체내 에너지 함량의 평균값이

Table 1. Concentration of 16- and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the experimental sediments spiked with crude oil for cellular energy allocation analyses in the *Ruditapes philippinarum*

Crude oil loading (g/kg WW)	Sediment concentration (mg/kg DW)		
	16 PAHs	Alkylated PAHs	Total PAHs
0	0.01	0.03	0.04
0.39	0.10	3.69	3.79
0.89	0.14	6.34	6.48
1.56	0.30	19.07	19.37
3.13	0.45	30.03	30.48
6.25	0.85	57.45	58.30

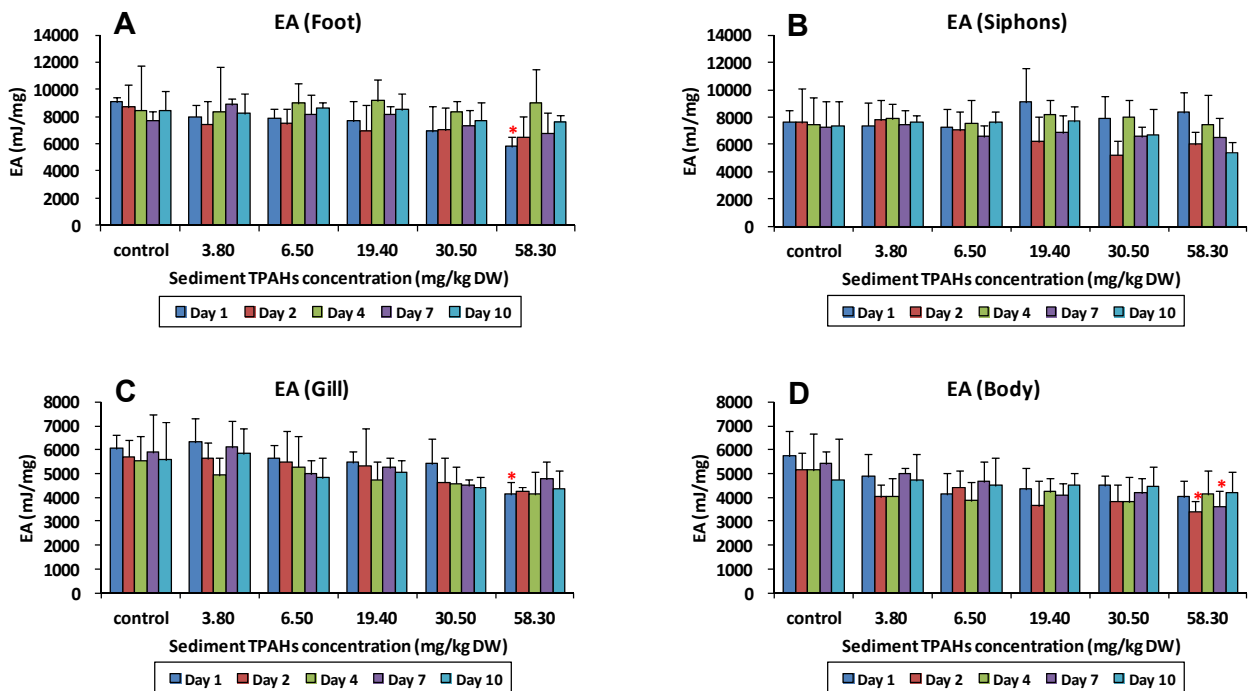


Fig. 2. The energy available (EA) values in the foot (A), siphons (B), gills (C), and body (D) of *Ruditapes philippinarum* for each concentration of total polycyclic aromatic hydrocarbons (TPAHs) in the crude oil-spiked sediments at 1, 2, 4, 7, and 10 days after exposure. Bar indicates the standard deviation (n = 3). Values with asterisk are statistically different from control.

다소 감소하는 경향을 보이는 부위가 있었지만 그 정도는 미약하였으며, 개체간의 차이가 농도간의 차이보다 더 크게 나타나, 농도에 의한 뚜렷한 경향이 있다고 판단할 수는 없었다. 동일 노출 시간에서 농도에 따른 함량의 변화는 노출 최대 농도인 58.3 mg/kg DW에서만 대조구와 유의한 차이가 발견되었다. 노출 1 일째 발과 아가미에서의 함량과 노출 2 일째와 7 일째 몸통에서의 함량이 대조구와 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (Dunnett's t-test, p < 0.05).

이상과 같이, 체내 에너지 함량은 동일 조건에서의 개체간의

변화가 크고, 오염의 정도가 아주 심각한 경우에만 그 영향이 일부 조직에서 발견되고 있어, 에너지 함량만으로는 낮은 수준의 오염을 진단하고 그 영향을 정량적으로 평가하는 것은 어려울 것으로 여겨진다.

3. 에너지 소비율 (energy consumed, EC)

노출된 바지락 각 부위별로 측정된 에너지 소비율은 발에서 220-820 mJ/mg/hr, 입출수공에서 280-1,800 mJ/mg/hr, 아가미에서 170-530 mJ/mg/hr, 몸통에서 140-680 mJ/mg/hr

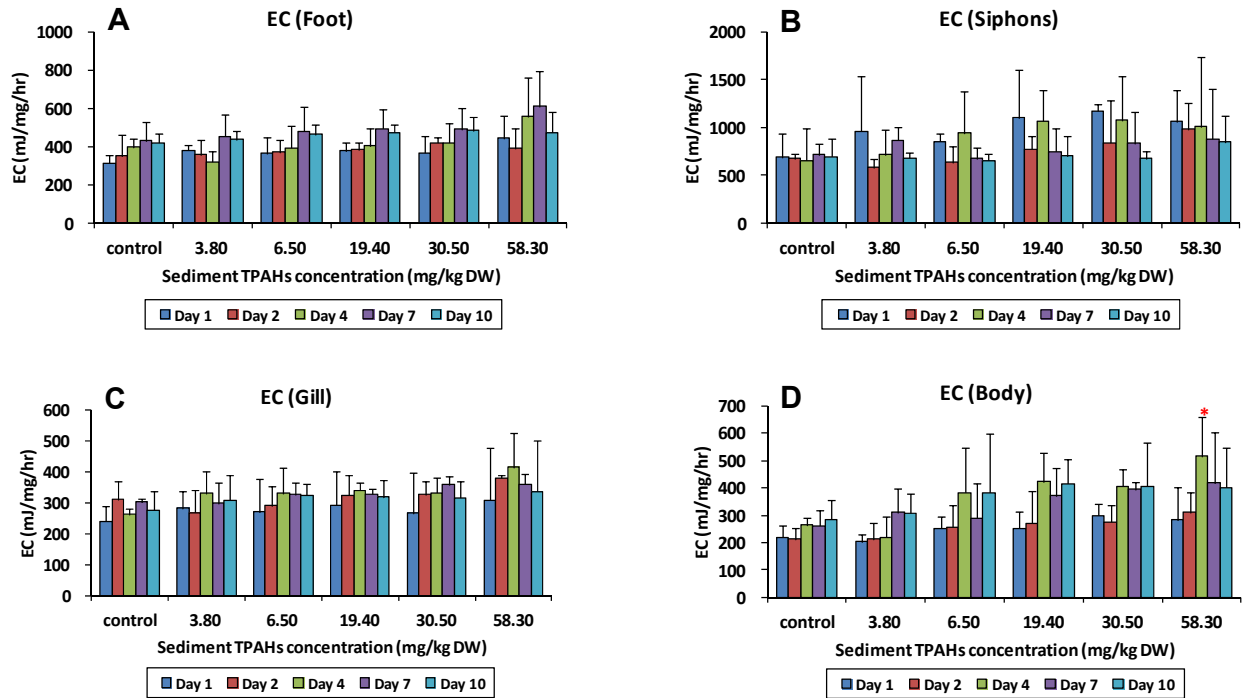


Fig. 3. The energy consumed (EC) values in the foot (A), siphons (B), gills (C), and body (D) of *Ruditapes philippinarum* for each concentration of total polycyclic aromatic hydrocarbons (TPAHs) in the crude oil-spiked sediments at 1, 2, 4, 7, and 10 days after exposure. Bar indicates the standard deviation (n = 3). Values with asterisk are statistically different from control.

의 범위를 나타내었다. 전체 개체의 평균은 입출수공 > 발 > 몸통 > 아가미의 순으로 에너지 소비율이 높았다. 동일 농도 조건에서 노출 기간에 따른 에너지 소비율의 변화는 부위별로 변화하는 경향이 다르게 나타났다 (Fig. 3). 발에서는 노출 기간이 증가하면서 에너지 소비율이 서서히 증가하는 경향을 보인 반면 입출수공에서는 노출 기간이 증가할수록 오염된 시료에 노출된 개체의 에너지 소비율이 대조구보다 낮아지는 경향이 나타났다. 한편, 아가미와 몸통에서는 노출 4 일째까지는 에너지 소비율이 증가하다가 4 일 이후부터는 다시 감소하는 변화 양상을 보여주었다. 그리고, 이러한 시간적 변화 또한 개체간의 차이가 커서 통계적으로 유의한 수준은 아니었다. 아가미와 몸통에서 노출 중간에 에너지 소비율이 다시 낮아지는 것으로 볼 때, 바지락이 유류에 의한 노출이 지속되면서 주변 환경에 적응하여 에너지 소비 패턴을 변화시켰을 가능성이 있음을 시사한다. 동일 노출 시간에서 농도가 증가함에 따라 에너지 소비율도 증가하는 경향이 모든 부위에서 나타났으나, 이 또한 개체간의 차이가 커서 농도간 에너지 소비율의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 농도에 따른 에너지 소비율 변화가 가장 크게 나타난 부위는 몸통이었으며, 노출 4 일째 최대 농도인 58.3 mg/kg DW 에서만 대조구와 유의한 차이가 발견되었다 (Dunnett's t-test, p < 0.05).

에너지 소비율 역시 동일 조건에서의 개체간의 변화가 크고, 특정 부위에서 특정 시기에만 오염의 정도가 아주 심각한 경우에 그 영향이 발견되고 있어, 에너지 소비율만으로 낮은 수준의 오염을 진단하고 평가하는 것 또한 어려울 것으로 여겨진다.

4. 세포내 에너지 할당 (cellular energy allocation, CEA)

에너지 함량과 에너지 소비율의 비율인 세포내 에너지 할당 (CEA) 은 발에서 10-33, 입출수공에서 5-21, 아가미에서 9-30, 몸통에서 7-28의 범위를 나타내었다. 전체 개체의 평균은 발 > 아가미 > 몸통 > 입출수공의 순으로 CEA가 높았다. 동일 농도 조건에서 노출 기간에 따른 CEA의 변화는 노출 농도가 낮은 조건에서는 그 변화가 뚜렷한 반면, 일정 농도 수준 이상에서는 특정한 경향을 찾을 수 없었다 (Fig. 4). 특히 발, 아가미, 몸통에서 노출 농도 0.04-3.8 mg/kg DW 범위에서 시간이 경과함에 따라 CEA가 급격하게 감소하는 것을 발견할 수 있었다. 동일 노출 시간에서는 모든 부위에서 농도가 증가함에 따라 CEA가 감소하는 경향이 나타났다. 단, 이러한 경향은 노출 시간이 길어지면서 다소 완화되었다. 가장 뚜렷한 변화를 찾을 수 있는 부위는 몸통으로, 노출 1 일째부터 7 일째까지 노출 농도 6.5-58.3 mg/kg DW 범위에서 CEA가 대조구와 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (Dunnett's t-test, p

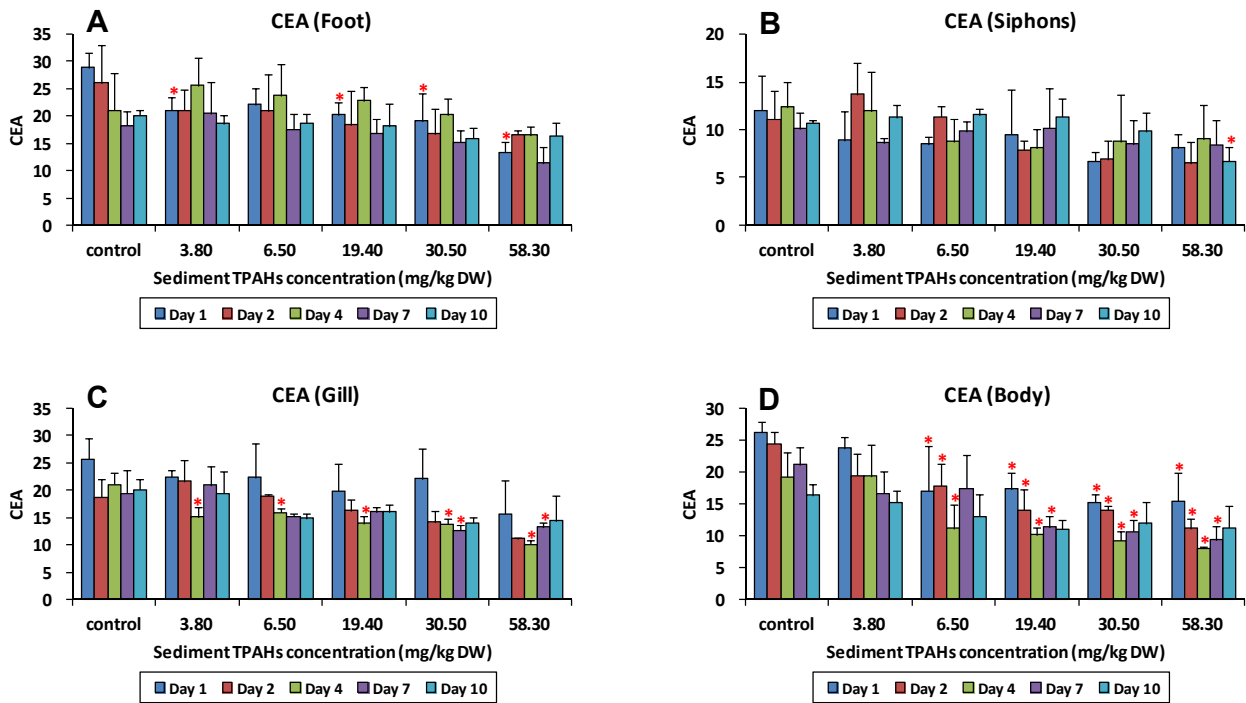


Fig. 4. The cellular energy allocation (CEA) values in the foot (A), siphons (B), gills (C), and body (D) of *Ruditapes philippinarum* for each concentration of total polycyclic aromatic hydrocarbons (TPAHs) in the crude oil-spiked sediments at 1, 2, 4, 7, and 10 days after exposure. Bar indicates the standard deviation (n = 3). Values with asterisk are statistically different from control.

< 0.05). 그리고 노출 1 일째 발과 노출 4-7 일째 아가미에서도 통계적으로 유의한 CEA의 감소가 발견되었다. 입출수공에서는 노출 10 일째 58.3 mg/kg DW 에서만 CEA의 감소가 있었다. EA와 EC에서 뚜렷하지 않았던 농도에 따른 차이가 CEA에서 뚜렷해진 이유는 EA, EC 각각의 변화는 적었으나, 이 두 변화의 비율로 나타낸 CEA에서 그 차이가 증폭되었기 때문인 것으로 여겨진다. 그러나 노출 10 일째가 되면서 발, 아가미, 몸통에서의 CEA 값이 대조구와 유의한 차이가 없어지는 것으로 보아, 이는 노출이 지속되면서 바지락이 주변 환경에 점차 적응해 나가고 있음을 알 수 있었다. 이는 EA에서도 유사한 경향이 발견된 바 있다.

CEA는 노출 농도 증가에 따라 통계적으로 유의한 감소를 관찰할 수 있었고, 관찰된 노출 농도의 범위가 급성 독성이 나타나는 범위보다 낮은 값이므로 오염 퇴적물의 잠재적 영향을 평가할 수 있는 좋은 지표로 사용 가능한 것으로 여겨진다.

고 찰

본 연구의 목적은 바지락의 CEA가 오염된 퇴적물에서 어떻게 반응하는지 그 자체를 알아보기 위함이 아니라, 바지락의

CEA가 오염된 현장 퇴적물을 평가할 수 있는 좋은 지표가 될 수 있는지 여부를 판단하기 위함이다. 따라서 본 연구를 통해 생산된 자료를 토대로 바지락의 CEA를 이용한 현장 평가 가능성과 오염퇴적물에 적용시 고려할 점에 대하여 검토해 보고자 한다.

바지락 CEA는 급성 독성이 나타나지 않은 농도 범위에서 통계적으로 유의한 감소가 나타났다. 이는 CEA가 급성 독성으로는 알아낼 수 없는 만성 독성의 지표로 활용될 가능성이 있음을 시사한다. 실제로 CEA는 생물의 성장 잠재력 (scope for growth, SFG) 을 평가하기 위한 간편한 대체 수단으로 개발된 기법이므로 성장에 대한 좋은 지표가 될 수 있을 것이다. 또한, 본 연구에서 설정된 퇴적물 내 TPAHs 농도는 Hebei Spirit호 유류사고 인근 조간대 현장에서 실제 측정되었던 농도 범위 내로 설정되었다. Exxon Valdez호 유류 유출 사고로 인한 퇴적물 독성 연구에서 단각류인 *Rhepoxynius abronius*의 급성독성 파라미터인 반수치사농도 (LC₅₀) 가 TPAHs 10.8 mg/kg DW로 보고되어 있으며 (Page et al., 2002), Hebei Spirit호 유류 유출사고 이후 퇴적물의 생태독성과 TPAHs 농도와의 관계를 분석한 연구에서 단각류인 *Monocorophium uenoi*의 LC₅₀이 36 mg/kg DW 로 보고되

어 있다 (Lee *et al.*, 2013). 본 연구에서 바지락의 CEA 반응 최소농도는 6.5 mg/kg DW 로 이는 단각류의 급성독성 값보다 낮은 값이다. 따라서 CEA 반응을 검출할 수 있는 농도 수준은 급성 독성이 나타나지 않는 오염 현장 퇴적물의 생물영향을 평가할 수 있는 수준인 것으로 여겨진다.

CEA를 구성하는 요소인 체내 에너지 함량과 에너지 소비율 각각은 오염 구배에 따른 차이가 나타나기는 하였으나 통계적으로 유의한 수준으로 뚜렷이 나타나는 경우는 많지 않았다. 반면, 이 두 요소의 조합으로 계산되는 CEA는 오염 구배에 따른 통계적 유의성이 잘 나타나고 있었다. 그러므로 바지락의 EA나 EC로는 오염 퇴적물의 평가가 불가능하지만 CEA로는 평가가 가능한 것으로 여겨진다. Smolders *et al.* (2004) 은 이매패류인 *Dreissena polymorpha*를 오염지역에 이식하여 CEA를 분석한 연구에서, EA는 서식 환경에 따라 과소 또는 과대평가 될 가능성이 있어 스트레스에 비특이적인 척도라고 하였으며, EC의 경우 그 반응이 모호하며 호흡률 변화와도 일치하지 않았다고 하였다. 반면 CEA 변화는 대조구와 비교하였을 때 유의한 차이를 나타내고 있음을 발견하였는데, 이는 본 연구의 결과와도 잘 일치하고 있다.

해산 무척추동물물을 대상으로 한 CEA 평가에서 EA의 변화는 먹이조건 등에 따라 달라질 수 있으며 개체간 차이 또한 높은 것으로 보고되어 있다 (Nguyen, 1997; Verslycke *et al.*, 2003). 해삼 (*Holothuria scabra*) 을 대상으로 한 CEA 연구에서 EA는 노출 초기에는 노출 전에 비하여 감소하였으나, 시간이 더 경과함에 따라 다시 회복되는 결과를 보였다 (Kühnhold *et al.*, 2016). 이러한 경향은 EC 에서도 관찰되었다. 본 연구에서 관찰된 바에 의하면, 노출 7 일 이상이 경과하면 주변 오염 상황에 적응하여 EC가 감소하거나, CEA가 다시 회복되는 것을 알 수 있었다. 그러므로 CEA를 현장 평가에 적용하기 위해서는 노출 기간을 최대 4 일을 넘기지 않도록 단기간으로 설정하는 것이 좋은 것으로 여겨진다. 아울러, 지속적으로 오염된 상태에 노출된 개체에서 CEA는 생물 자체적으로 적응하여 회복하려는 경향이 있기 때문에, 현장에 서식하는 개체를 대상으로 CEA를 분석하여 오염 상태를 진단하는 목적으로 사용하는 것 (exposure biomarker) 은 불가능하고, 현장에서 채취한 퇴적물에 깨끗한 환경에서 서식하는 개체를 노출시켜 오염에 의한 잠재력을 CEA로 평가하는 것 (effect biomarker) 은 가능할 것이다.

지금까지 CEA에 대한 연구 대상 생물은 주로 해산 무척추동물이었다. 어류 등 척추동물물을 대상으로 한 연구에서의 분석 대상 조직은 주로 근육이었다 (Nguyen, 1997). 개체의 크기가 작은 생물을 대상으로 부위별로 CEA를 분석한 연구는 거의 없었다. 본 연구에서는 무척추동물로 상대적으로 큰 바지락 성체를 대상으로 하여 부위별 분석을 수행하였다. CEA의 반

응이 가장 뚜렷하게 나타난 부위는 몸통이었다. 입출수공에서는 농도 및 노출기간에 따른 반응이 가장 약하게 나타났고, 발과 아가미에서는 매우 제한적으로 반응이 나타났다. 따라서 오염퇴적물의 CEA 평가는 바지락의 경우 몸통을 대상으로 하는 것이 바람직하다.

본 연구에서 관찰된 뚜렷한 특징 중의 하나가 EA, EC, CEA 모두 동일 조건에 노출된 개체간의 차이가 매우 크다는 점이다. 따라서 이와 같은 개체간의 차이를 충분히 반영하기 위해서는 CEA 분석을 위한 노출 개체의 수를 증가시킬 필요가 있다. 본 연구에서는 각 조건별로 3 개체씩 분석을 하였는데, 향후 현장 평가를 위한 분석에서는 보다 많은 개체로부터 CEA를 측정할 필요가 있다.

본 연구에서는 바지락 성체를 대상으로 암수 구분 없이 무작위적으로 시험에 사용되었으나 해산 무척추동물은 성 (sex) 특이적 지질대사 (Erk *et al.*, 2008) 가 이루어지므로 이러한 요인이 개체간의 차이를 더욱 크게 하였을 가능성이 있다. 그러므로 성 성숙이 이루어져 있는 성체를 대상으로 분석하는 것보다는 성 성숙이 일어나지 않은 어린 개체를 대상으로 부위별 그리고 전체 (whole body) 에 대한 평가가 더욱 바람직할 것으로 여겨진다.

향후 본 종이 다양한 독성물질에 노출되었을 때 CEA의 변화가 기존의 급, 만성 지표와의 민감도는 얼마나 차이 나는지 등을 비교하는 연구가 이루어진다면 본 종이 해양환경 오염 평가를 위한 표준 시험종으로서의 가능성을 보다 명확히 판단할 수 있을 것으로 여겨진다.

요 약

환경오염 평가를 위한 생물지표로 세포내 에너지할당 (CEA) 의 적용성을 검토하기 위해 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 조직을 대상으로 에너지 함량과 에너지 소비율을 분석하였다. 원유를 인위적으로 오염시킨 퇴적물에 바지락을 1, 2, 4, 7, 10 일간 노출 후 일부 조직 (발, 입출수공, 아가미 그리고 몸통) 내 지질, 글루코오스, 단백질 함량, 그리고 전자전달계 (electron transport system, ETS) 활성을 측정하였다. 바지락의 체내 지질, 글루코오스, 단백질 에너지 함량 (energy available, EA)은 오염의 수준과 노출시간이 증가함에 따라 감소하였으나, 이와 대조적으로 ETS 활성은 그 반대의 경향을 보였다. 바지락의 조직별 EA는 발 > 입출수공 > 아가미 > 몸통 순이었다. EA와 EC의 분석에서 통계적으로 유의한 차이는 노출 최고 농도 (58.3 mg TPAHs/kg DW) 에서만 발견되었다. 노출 1 일째 발과 아가미에서, 노출 2, 7 일째 몸통에서 EA가 감소하였고, 노출 4 일째 몸통에서 EC가 증가하였다. CEA는 EA 또는 EC 보다 오염에 더 민감하게 반응하

였다. 특히, 노출 1-7 일 기간 동안 몸통에서 CEA는 오염 수준이 낮은 (6.5 mg TPAHs/kg DW) 범위에서도 크게 감소하였다. CEA는 급성독성이 나타나지 않는 낮은 수준의 퇴적물 오염 평가에서 EA 또는 EC보다 더 민감하였다. 바지락을 이용한 오염 퇴적물 평가시 노출은 4 일간, 그리고 몸통부위에서 CEA를 측정하는 것이 가장 민감하고 신뢰할 수 있을 것으로 여겨진다.

사 사

본 연구의 화학분석에 도움을 주신 한국해양과학기술원 임운혁 박사님, 김문구 박사님, 하성용 선생님께 감사 드립니다. 이 논문은 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구이며 (해양환경 유해물질의 평가 및 관리기술 개발) 연구비 지원에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Adams, S.M. and Breck, F.E. (1990) Bioenergetics. *In*: Methods for Fish Biology. (ed by Schreck, C.B., Maylme, P.B.). American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA.
- Adams, S.M. and Greeley, M.S. (2000) Ecotoxicological indicators of water quality: Using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *Water Air and Soil Pollution*, **123**(1): 103-115.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**(8): 911-917.
- Buratti, S., Fabbri, E., Pereira, C.D.S., Ramos-Gomez, J., Del Valls, T.A., and Martín-Díaz, M.L. (2010) Application of neutral red retention assay in the clam *Ruditapes philippinarum* and the crab *Carcinus maenas* as a screening tool for sediment quality assessment in marine environment. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A157, S27.
- Buratti, S., Ramos-Gomez, J., Fabbri, E., Del Valls, T.A. and Martín-Díaz, M.L. (2012) Application of neutral red retention assay to caged clams (*Ruditapes decussatus*) and crabs (*Carcinus maenas*) in the assessment of dredged material. *Ecotoxicology*, **21**(1): 75-86.
- Calow, P. (1998) Ecological risk assessment: Risk for what? How do we decide? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **40**(1-2): 15-18.
- Coughlan, B.M., Moroney, G.A., van Pelt, F.N.A.M., O'Brien, N.M., Davenport, J. and O'Halloran, J. (2009) The effects of salinity on the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) using the neutral red retention assay with adapted physiological saline solutions. *Marine Pollution Bulletin*, **58**(11): 1680-1684.
- De Coen, W.M.I. and Janssen, C.R. (1997) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new biomarker to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Stress and Recovery*, **6**(1): 43-55.
- De Coen, W.M.I., Janssen, C.R. and Giesy, J.P. (2001) Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology. *In*: New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring. (ed by Persoone, G., Janssen, C. and De Coen, W.), Kluwer Academic, Dordrecht. The Netherlands.
- De Coen, W.M.I. and Janssen, C.R. (2003) The missing biomarker link: relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population parameters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**(7): 1632-1641.
- Erk, M., Muysen, B.T.A., Ghekiere, A. and Janssen, C.R. (2008) Metallothionein and cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* exposed to cadmium at different salinities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **357**(2): 172-180.
- Erk, M., Ivanković, D. and Strizak, Ž. (2011) Cellular energy allocation in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the stratified estuary as a physiological biomarker. *Marine Pollution Bulletin*, **62**(5): 1124-1129.
- Fanslow, D.L., Nalepa, T.F. and Johengen, T.H. (2001) Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia*, **448**(1): 61-70.
- Giesy, J.P. and Graney, R.L. (1989) Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hydrobiologia*, **188/189**: 21-60.
- Gnaiger, E. (1983) Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. *In*: Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications. (ed by Gnaiger, E. and Forstner, H.), pp. 337-345. Springer Verlag, Berlin.
- Goldberg, E.D. and Bertine, K.K. (2000) Beyond the mussel watch - New directions for monitoring marine pollution. *Science of the Total Environment*, **247**(2-3): 165-174.
- Kooijman, S.A.L.M. and Bedaux, J.J.M. (1996) Analysis of toxicity tests on fish growth. *Water Research*, **30**(7): 1633-1644.
- Kühnhold H., Kamyab, E., Novais, S., Indriana, L., Kunzmann, A., Slater, M. and Lemos, M. (2016) Thermal stress effects on energy resource allocation and oxygen consumption rate in the juvenile sea cucumber, *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833). *Aquaculture*, in press.
- Lee, C.H., Lee, J.H., Sung, C.G., Moon, S.D., Kang, S.K.,

- Lee, J.H., Yim, U.H., Shim, W.J. and Ha, S.Y. (2013) Monitoring toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in intertidal sediments for five years after the Hebei Spirit oil spill in Taean, Republic of Korea. *Marine Pollution Bulletin*, **76**(1-2): 241-249.
- Maranho, L.A., Andre, C., Del Valls, T.A., Gagne, F. and Martín-Díaz, M.L. (2015) Adverse effects of wastewater discharges in reproduction, energy budget, neuroendocrine and inflammation processes observed in marine clams *Ruditapes philippinarum*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **164**: 324-334.
- Martín-Díaz, M.L., Blasco, J., Canales, M.L.G., Sales, D. and Del Valls, T.A. (2005) Bioaccumulation and toxicity of dissolved heavy metals from the Guadalquivir Estuary after the Aznalcollar mining spill using *Ruditapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **48**(2): 233-241.
- Martín-Díaz, M.L., Blasco, J., Sales, D. and Del Valls, T.A. (2007) Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **53**(1): 66-76.
- Martín-Díaz, M.L., Jimenez-Tenorio, N., Sales, D. and Del Valls, T.A. (2008) Accumulation and histopathological damage in the clam *Ruditapes philippinarum* and the crab *Carcinus maenas* to assess sediment toxicity in Spanish ports. *Chemosphere*, **71**(10): 1916-1927.
- Morales-Caselles, C., Riba, I. and Sarasquete, C. (2008) Sublethal responses in caged organisms exposed to sediments affected by oil spills. *Chemosphere*, **72**(5): 819-825.
- Moschino, V., Delaney, E., Meneghetti, F. and Ros, L.D.A. (2011) Biomonitoring approach with mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) and clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in the Lagoon of Venice. *Environmental Monitoring and Assessment*, **177**(1-4): 649-663.
- Munkittrick, K.R. and McCarty, L.S. (1995) An integrated approach to aquatic ecosystem health: top-down, bottom-up or middle out? *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, **4**(2): 77-90.
- Muyssen, B.T.A., Janssen, C.R. and Bossuyt, B.T.A. (2001) Tolerance and acclimation to zinc of field-collected *Daphnia magna* populations. *Aquatic Toxicology*, **56**(2): 69-79.
- Nguyen, T.H.L. (1997) Potential and Limitations of Early Life Stage Toxicity Tests with Fish. PhD Thesis, University of Ghent, Ghent, Belgium.
- Novais, S. and Amorim, M. (2013) Changes in cellular energy allocation in *Enchytraeus albidus* when exposed to dimethoate, atrazine, and carbendazim. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **32**(12): 2800-2807.
- Novais, S., Soares, A., De Coen, W. and Amorim, M. (2013) Exposure of *Enchytraeus albidus* to Cd and Zn - Changes in cellular energy allocation (CEA) and linkage to transcriptional, enzymatic and reproductive effects. *Chemosphere*, **90**(3): 1305-1309.
- Olsen, G.H., Sva, E., Carroll, J., Camus, L., Coen, W.D., Smolders, R., Overaas, H. and Hylland, K. (2007) Alterations in the energy budget of arctic benthic species exposed to oil-related compounds. *Aquatic Toxicology*, **83**(2): 85-92.
- Olsen, G.H., Carroll, J., Sva, E. and Camus, L. (2008) Cellular energy allocation in the Arctic sea ice amphipod *Gammarus wilkitzkii* exposed to the water soluble fractions of oil. *Marine Environmental Research*, **66**(1): 213-214.
- Page, D.S., Boehm, P.D., Stubblefield, W.A., Parker, K.R., Gilfillan, E.S., Neff, J.M. and Maki, A.W. (2002) Hydrocarbon composition and toxicity of sediments following the Exxon Valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(7): 1438-1450.
- Roe, J.H. and Dailey, R.E. (1966) Determination of glycogen with the anthrone reagent. *Analytical Biochemistry*, **15**(2): 245-250.
- Smolders, R., De Boeck, G. and Blust, R. (2003) Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**(4): 890-899.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W. and Blust, R. (2004) Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution*, **129**(1): 99-112.
- Verslycke, T., Vercauteren, J., Devos, C., Moens, L., Sandra, P. and Janssen, C.R. (2003) Cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following tributyltin exposure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **288**(2): 167-179.
- Verslycke, T., Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B. and Janssen, C.R. (2004a) Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure; a method comparison. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **306**(1): 1-16.
- Verslycke, T., Poelmans, S., Wasch, K.D., De Brabander, H.F. and Janssen, C.R. (2004b) Testosterone and energy metabolism in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following exposure to endocrine disruptors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**: 1289-1296.
- Widdows, J. and Donkin, P. (1992) Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. *In*: The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. (ed by Gosling, E.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.