

# 11. 식물플랑크톤 5종에 대한 benzo[a]pyrene의 독성에 관한 연구

김선주· 장 만· 신경순  
한국해양연구원 남해연구소

## 요 약

본 연구는 해양 식물플랑크톤에 지속성 유기오염물질의 영향을 이해하기 위한 목적으로, 연안역에서 우점하는 식물플랑크톤 주요 5종 즉, 규조류 *Skeletonema costatum*, 침편모조류 *Heterosigma akashiwo*, 와편모류 *Prorocentrum dentatum*, *Prorocentrum minimum*, *Akashiwo sanguinea*를 이용하여 benzo[a]pyrene (PAHs)에 72시간동안 노출시킨 다음 각 종의 성장 및 저해, 회복능력 등을 조사하였고, benzo[a]pyrene의 농도 0.1, 1, 5, 10  $\mu\text{g/l}$ 에 *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae)를 노출시켜 시간에 따른 광합성률의 변화를 측정하였다. benzo[a]pyrene에 72시간 노출시킨 후 *S. costatum*, *P. minimum*, *P. dentatum*, *H. akashiwo*의 세포수는 1-10  $\mu\text{g/l}$ 의 농도범위에서 극적인 감소를 보인 반면, *A. sanguinea*는 0.1-1  $\mu\text{g/l}$ 의 낮은 농도범위에서 지수함수적인 감소를 나타냈다. 성장저해 농도 ( $\text{IC}_{50}$ )는 *A. sanguinea*가 0.43  $\mu\text{g/l}$ 로 가장 낮았고, *H. akashiwo*(1.17  $\mu\text{g/l}$ ) *S. costatum* (3.34  $\mu\text{g/l}$ ), *P. dentatum* (3.97  $\mu\text{g/l}$ ), *P. minimum* (7.24  $\mu\text{g/l}$ )의 순서로 증가하였다. Benzo[a]pyrene의 낮은 농도(1  $\mu\text{g/l}$ )에 노출되었던 세포들은 5종 모두 시간이 경과함에 따라 회복하는 경향을 나타냈으나 고농도(10, 100  $\mu\text{g/l}$ )에 노출시에는 *P. minimum*을 제외하고는 회복되지 않았다. 이러한 결과들은 조사된 5종 중에서 유각 와편모류 *P. minimum*이 benzo[a]pyrene에 가장 내성이 강하며, 무각 와편모류 *A. sanguinea*가 가장 약함을 의미한다. benzo[a]pyrene의 여러 농도수준에 노출시켰을 때 *H. akashiwo*의 광합성 능력은 낮은 농도들에서는 대조구와 유사하였으나, 5  $\mu\text{g/l}$ 의 높은 농도에서는 초기에 매우 낮은 광합성 능력을 보이다가 시간이 경과하면서 대조군보다 더 높은 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 식물플랑크톤이 benzo[a]pyrene의 낮은 농도에서 노출될 때는 이 물질을 탄소원으로 사용할 가능성이 있음을 시사한다. 본 연구의 결과들은 연안해역에 benzo[a]pyrene과 같은 지속성 유기오염물질이 유입되었을 때 내성여부에 따라 식물플랑크톤 군집내 종 천이와 일차생산력에 크게 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

## 서 론

우리나라 남해안은 해안선이 복잡하고 해수 순환이 원활하지 않는 반폐쇄적인만으로 이루어져 있다. 또한 많은 공단과 대형 항구들이 위치하고 있어 정화되지 않은 오폐수의 유입과 더불어 PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)를 비롯한 다양한 지속성 유기오염물질들이 유입되고 빈번한 선박유류 유출 사고로 인해 오염이 더 가중되고 있는 실정이다. 특히, PAHs와 같은 유기 오염물질은 소수성으로 해수 중에 유입되었을 때 분해가 잘 되지 않고, 유기 탄소에 대한 높은 친화력을 가지고 있어 부유 입자물질에 쉽게 흡착되거나 생물체내의 지방층에 농축되는 특성을 가지고 있다 (Karickhoff and Morris, 1985; Wu and Gschwend, 1986; Chiou *et al.*, 1987). 해양생태계의 기초생산자인 식물플랑크톤 세포의 지질함량에 비례하여 이러한 유기오염물질을 농축하여 표영생태계의 먹이사슬 (pelagic food chain)을 통해 고차 단계생물로의 생물농축 (bioaccumulation)이 일어난다 (Swackhamer and Skoglund, 1991). 따라서 부영양화로 오염된 연안역에서 매년

발생되는 미세조류의 대번식은 이러한 오염물질을 다량 흡착 또는 흡수하여 저층으로 가라앉아 퇴적되어 저서생물의 피해를 유발시킬 수 있다.

최근 이러한 PAHs가 식물플랑크톤의 군집 및 일차생산력에 미치는 영향 (Kelly et al., 1999), 부영양화된 해역에서 benzo[a]pyrene의 식물플랑크톤 세포내 축적에 관한 연구 (Gunnarsson et al., 1996)와 benzo[a]pyrene의 생물농축에서 고농도의 식물플랑크톤이 blue mussel (*Mytilus edulis*)에 미치는 영향 (Okay et al., 2000)등 PAHs와 식물플랑크톤의 연관관계에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

PAHs 중 대부분의 물질들은 돌연변이와 암을 유발시키는 물질로 알려져 있으며, 그 중 benzo[a]pyrene은 가장 독성이 강한 발암물질 중 하나이다 (Menzie et al., 1992). 본 연구는 연안역에 주로 우점하는 식물플랑크톤 5종을 대상으로 benzo[a]pyrene의 농도구배에 따라 72시간 노출 후 각 종의 성장저해농도 (72h IC<sub>50</sub>)와 *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae)의 성장단계에 따른 탄소동화율에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험생물 배양

적조원인종 *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae), *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), *Akashiwo sanguinea* (= *Gymnodinium sanguineum*, Dinophyceae), *Prorocentrum dentatum* (Dinophyceae), *P. minimum* (Dinophyceae) 5종을 f/2 medium에 접종하여 20°C, 150 ~ 233 $\mu$ E m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>의 광도 하에서 배양하였다 (Table 1).

Table 1. Characteristics of test algae.

species	class	theca	bloom time
<i>Skeletonema costatum</i>	Bacillariophyceae	silica	spring, autumn
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Raphidophyceae	unarmed	spring, autumn
<i>Prorocentrum dentatum</i>	Dinophyceae	armed	summer
<i>P. minimum</i>	Dinophyceae	armed	summer
<i>Akashiwo sanguinea</i>	Dinophyceae	unarmed	summer

### Benzo[a]pyrene 노출

DMSO에 녹인 benzo[a]pyrene (Sigma Chemical, Co. Ltd. UK)을 10<sup>-2</sup> ~ 10<sup>2</sup>  $\mu$ g l<sup>-1</sup>의 농도범위가 되도록 f/2 medium (0.01% v/v DMSO)에 첨가한 후 medium 29 ml에 지수성장기 세포 1 ml을 접종하여 72시간동안 노출시켜 DMSO만을 첨가한 대조군의 성장률의 변화와 비교분석하였다.

### 72h IC<sub>50</sub> (조류 성장 저해 농도)

IC<sub>50</sub>은 benzo[a]pyrene의 각 농도에 72h동안 노출시킨 다음 5종의 식물플랑크톤의 성장률 (식 1 참고)를 측정하여 대조군의 성장률을 기준으로 성장이 저해된 비율(%)을 계산한 다음, 유의한 성장저해농도범위를 기준으로 회귀분석하여 측정하였다 (OECD, 1998).

$$\mu = \ln (N_1/N_0)/(t_1-t_0) \quad (1)$$

$\mu$  = growth rate

$N_0$  = biomass at the beginning of the selected time ( $t_1$ )

$N_1$  = biomass at the end of the selected time ( $t_0$ )

### 회복가능성 (Recovery potential of cells exposed to benzo[a]pyrene)

Benzo[a]pyrene 10<sup>0</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>  $\mu\text{g/l}$  농도에서 72시간동안 노출시킨 5종의 식물플랑크톤 5ml을 새로운 f/2 medium 145 ml에 접종한 다음 7일동안 배양하여 성장회복속도를 측정하였다. 7일 경과한 세포 중 5 ml을 다시 새로운 f/2 medium에 접종하여 회복속도를 측정하였다.

### 광합성률 (<sup>14</sup>C-uptake rate)

Benzo[a]pyrene을 2l f/2 medium에 0.1, 1, 5, 10  $\mu\text{g/l}$  (0.01% v/v DMSO)의 농도가 되게 첨가한 후 지수성장기의 세포 *Heterosigma akashiwo*를 접종하였다. 세포의 성장단계에 따라 각 농도에 노출시킨 세포 50 ml을 취해 10 ml 씩 5개의 scintillation glass vial에 나누어 담은 후 그 중 vial 2개는 알루미늄 호일로 감싸서 빛을 차단시켰다. vial내 최종 활동도가 0.25  $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ 이 되게  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 을 첨가하여 2시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 10% HCl 250  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 남은 무기 탄소를 날려보낸 다음, 각 vial에 scintillation cocktail 10 ml을 첨가하여 액체섬광계수기 (liquid scintillation counter)를 이용하여 방사능 (radioactivity, dpm)을 측정하였다. dark control의 <sup>14</sup>C 활동도 (activity)를 light bottle에서 제한수치를 Parsons *et al* (1984)에 따라 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 72h 노출

*Heterosigma akashiwo*, *Skeletonema costatum*, *Prorocentrum minimum*, *P. dentatum*은 1 ~ 10  $\mu\text{g/l}$ 의 농도범위에서 세포수 (cells/ml)의 극적인 감소를 나타내었다. *Akashiwo sanguinea*의 경우 0.1 ~ 1  $\mu\text{g/l}$ 의 농도에서 지수함수적인 감소를 나타내었다 (Fig. 1).

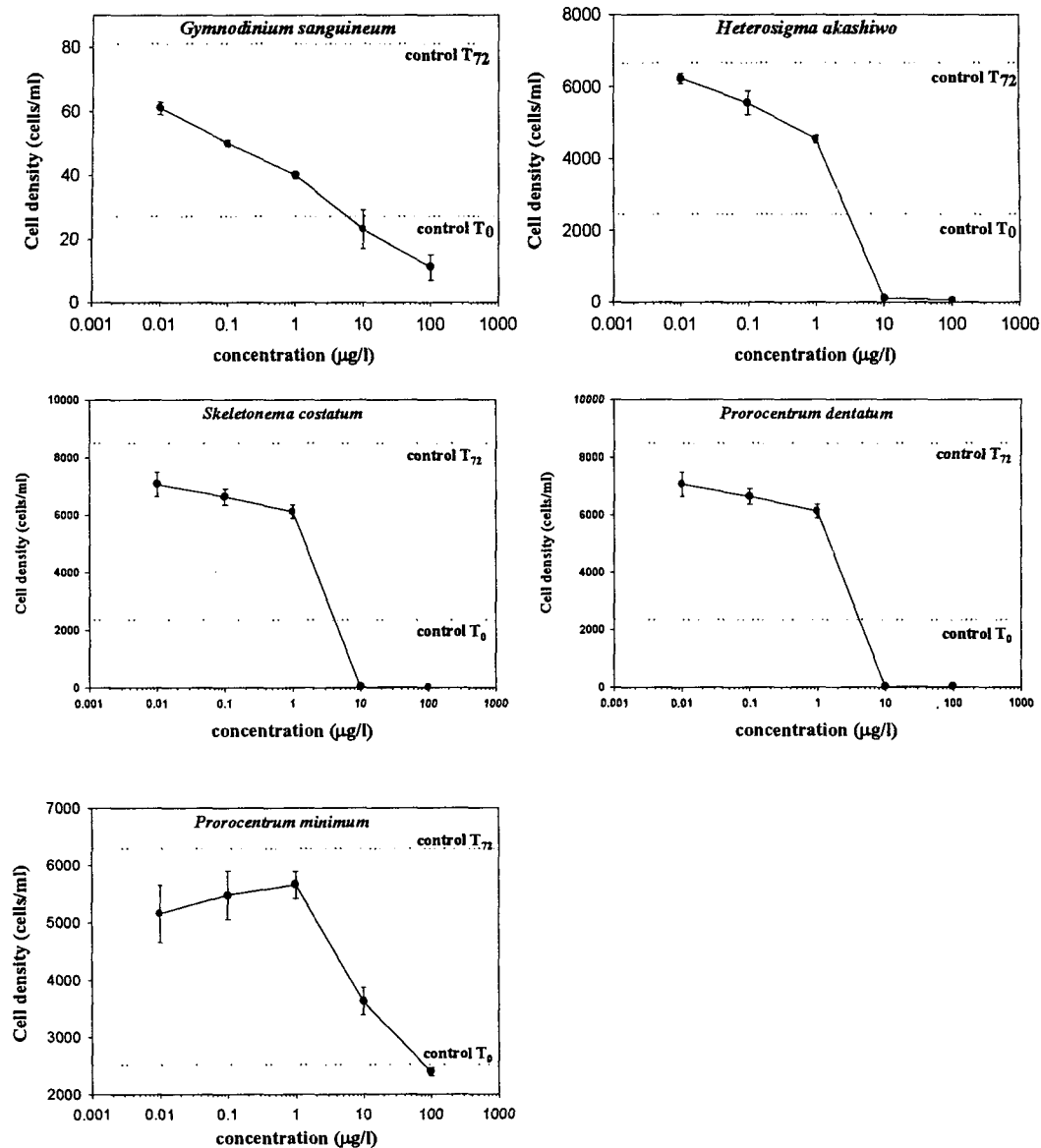


Fig. 1. Effect of a 72-h exposure period to benzo[a]pyrene on growth of 5 phytoplankton species. Dotted lines shows the values of control at time 0 and 72-h.

### 성장저해농도 (72h IC<sub>50</sub>)

식물플랑크톤 5종을 benzo[a]pyrene의 72시간 노출시킨 후 성장저해된 IC<sub>50</sub>의 농도는 와편모조류 *Akashiwo sanguinea*가 0.43 µg/l로 가장 낮은 농도에서 성장저해가 나타났고, 침편모조류 *Heterosigma akashiwo*는 1.17, 규조류인 *Skeletonema costatum*의 경우 3.34 µg/l를 나타내었고, 와편모조류 *Prorocentrum*

*dentatum*은 3.97  $\mu\text{g/l}$ , *P. minimum*의 경우 7.24  $\mu\text{g/l}$ 로 가장 높은 농도에서 성장 저해가 나타났다 (Fig. 2). 따라서 각(theca)이 없는 무각종이 유각종보다 상대적으로 독성에 약한 것으로 나타났다.

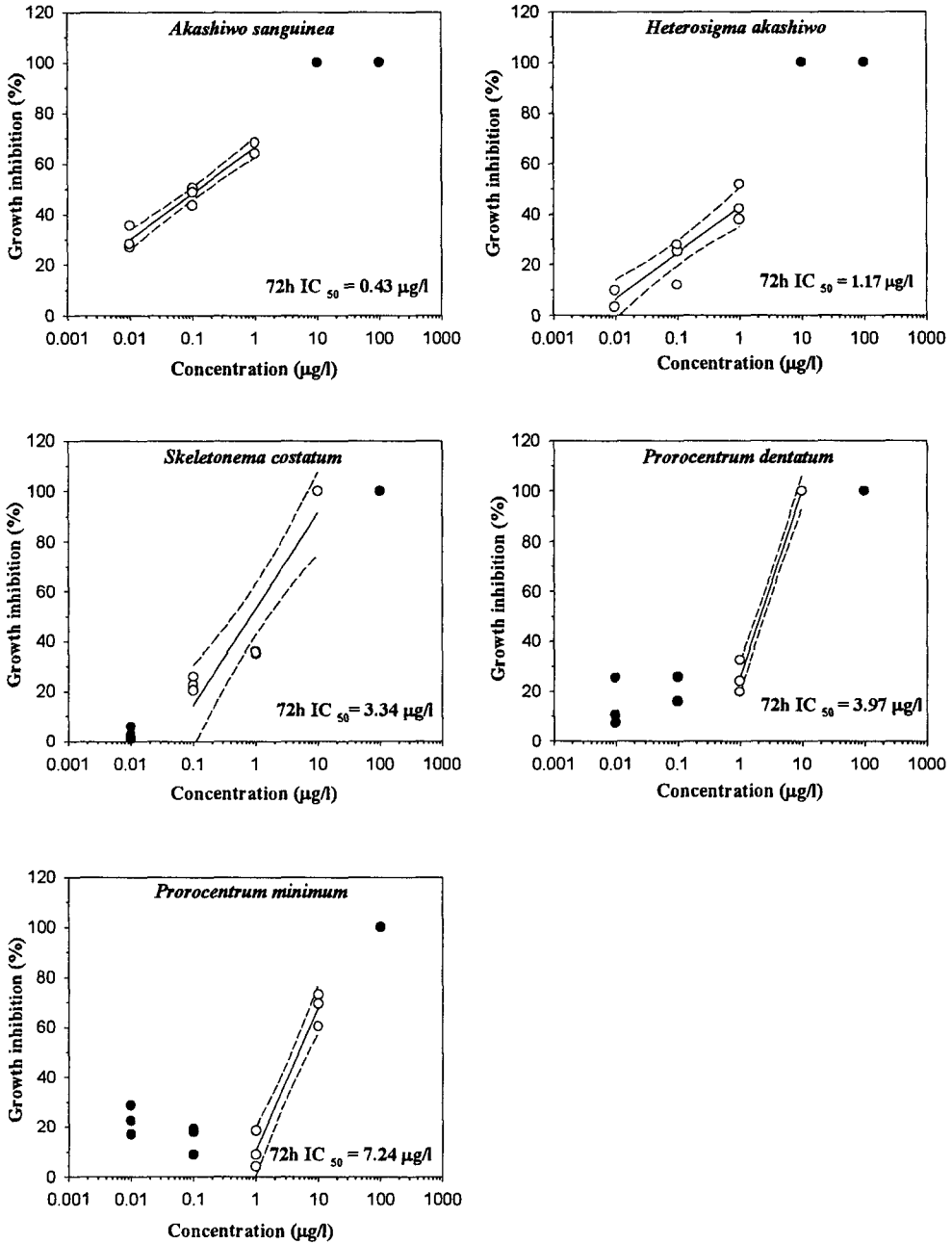


Fig. 2. Percent growth inhibition of 5 species after 72-h exposure period to benzo[a]pyrene.

### 회복능력 (recovery potential)

72시간동안 benzo[a]pyrene의 농도구배에 따라 노출시킨 세포 중 성장하지 못하고 세포의 mortality가 일어나는 농도인 1, 10, 100  $\mu\text{g/l}$ 에 노출된 세포 일정량을 새로운 신선한 배지에 첨가하여 7일 경과 후 전체 개체수의 증감을 조사하였다. 5종 모두 1  $\mu\text{g/l}$ 의 농도에 노출되었던 세포는 시간이 지남에 따라 전체 개체수 증가를 나타내었으나 10, 100  $\mu\text{g/l}$ 의 농도에 노출되었던 세포는 회복되지 않았다. 반면 *Prorocentrum minimum*의 경우 10  $\mu\text{g/l}$ 의 농도에 노출시켰던 세포도 차츰 개체수가 회복되는 양상을 나타내었다. *Akashiwo sanguinea*의 경우 느린 성장으로 인해 7일 경과 후 개체수 회복양상을 구분하기 어려웠다.

### 성장률에 따른 광합성률의 변화

Benzo[a]pyrene이 생태계 일차생산력의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 *Heterosigma akashiwo*의 성장단계에 따라 광합성률의 변화를 측정하였다.

*Heterosigma akashiwo*를 benzo[a]pyrene 0.1, 1, 5, 10  $\mu\text{g/l}$ 의 농도에 노출시켜 대조군 (0.01% v/v DMSO)의 성장률과 비교했을 때 0.1  $\mu\text{g/l}$ 의 농도에서는 대조군과 유사한 성장곡선을 나타내었으나, 1  $\mu\text{g/l}$ 의 농도에서는 약간 느린 성장을 보이면서 12일째에 대조군과 유사한 최대성장률을 나타내었다 (Fig. 4). 반면 5  $\mu\text{g/l}$ 와 10  $\mu\text{g/l}$ 의 농도에서는 초기세포농도에서 시간이 지남에 따라 세포수의 감소가 일어났으나 12일째에 5  $\mu\text{g/l}$ 의 농도에 노출시킨 세포의 성장률 증가를 나타내었다.

각 노출농도에서 광합성률의 변화양상은 대조군의 경우 지수성장기로 갈수록 탄소동화율이 증가하다 12일째 최대 광합성률을 보였으며, 이 때 0.1  $\mu\text{g/l}$ 에 노출시킨 세포가 대조군보다 높은 최대광합성률을 나타내었다 (Fig. 5). 일부 연구보고에 따르면 New Jersey 하구의 식물플랑크톤의 일차생산력에 phenanthrene (PAHs)이 미치는 영향을 알아본 결과 첨가한 농도 중 가장 낮은 농도 0.1 ppm을 첨가한 실험에서 일차생산력이 증가한 것으로 나타났고, 이는 phenanthrene이 광합성기구의 한 과정을 자극시켜 광합성을 증가시킨다고 보고하였다 (Kelly *et al.*, 1999).

한편, 본 연구에서 1  $\mu\text{g/l}$ 에 노출시킨 세포는 초기 낮은 광합성률을 보이다가 20일째에 증가하였다. 5  $\mu\text{g/l}$ 의 농도에 노출시킨 세포는 초기에 매우 낮은 동화율을 나타내다가 20일째 대조군의 최대 광합성률보다 높은 동화율을 나타내었다. 따라서 향후 benzo[a]pyrene이 낮은 농도로 존재할 때 식물플랑크톤에 의해 흡수되거나 분해되는지를 규명하기 위해 동위원소를 이용한  $^{14}\text{C}$ -benzo[a]pyrene의 식물플랑크톤 흡수속도에 관한 연구가 요구된다.

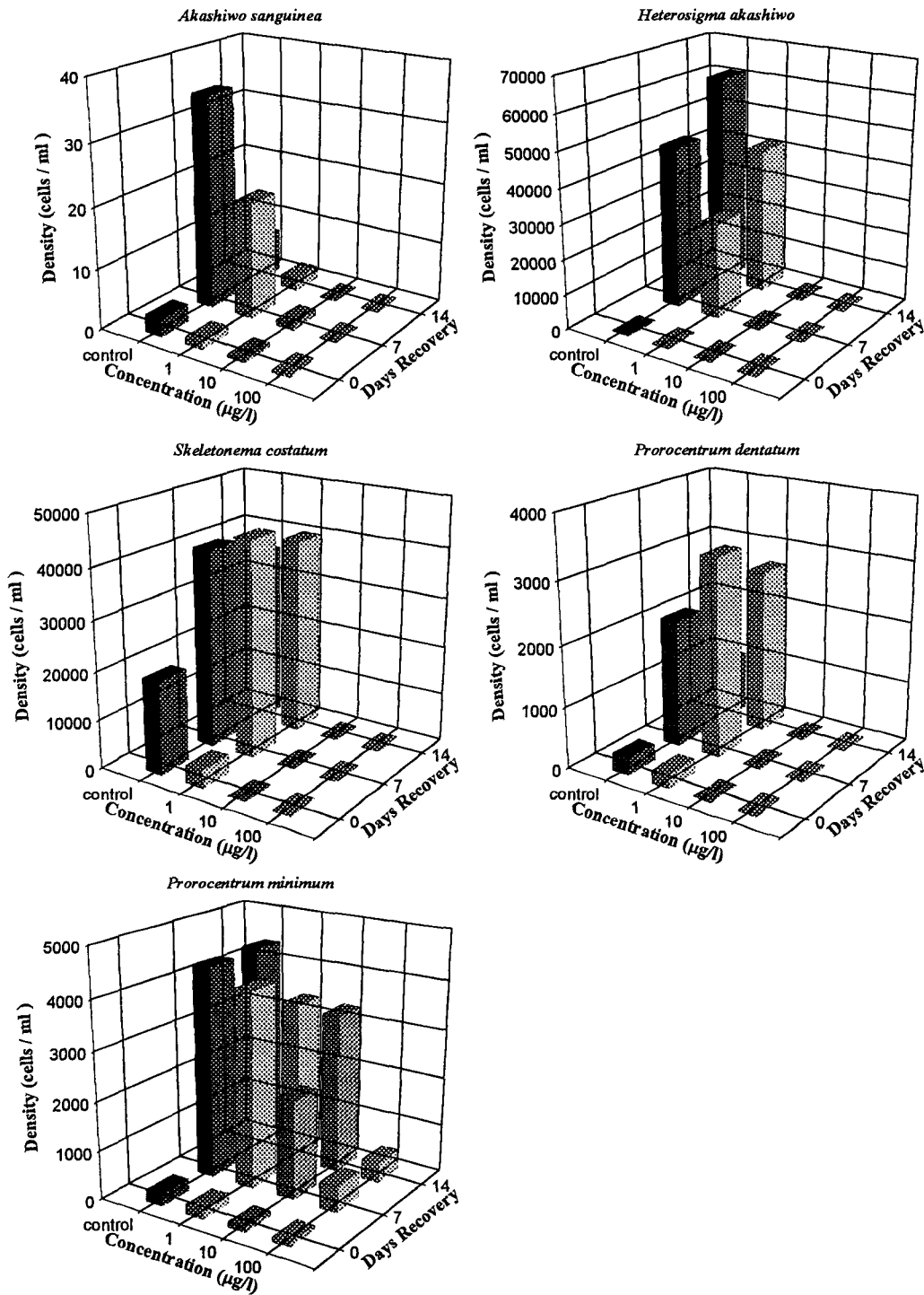


Fig. 3. Recovery of total abundance of phytoplankton after a 72-h exposure period to benzo[a]pyrene.

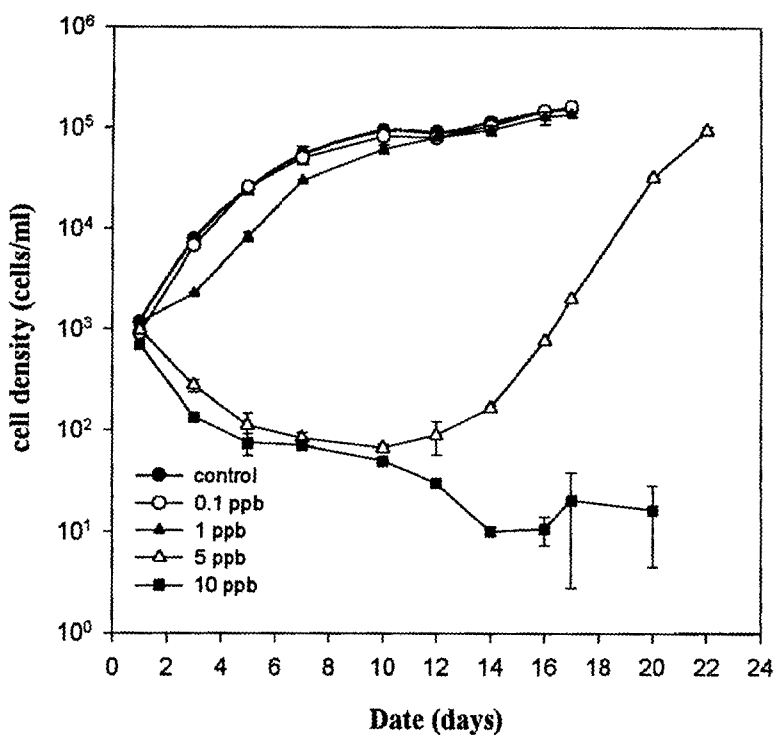


Fig. 4. Effects of benzo[a]pyrene on growth of *Heterosigma akashiwo*.

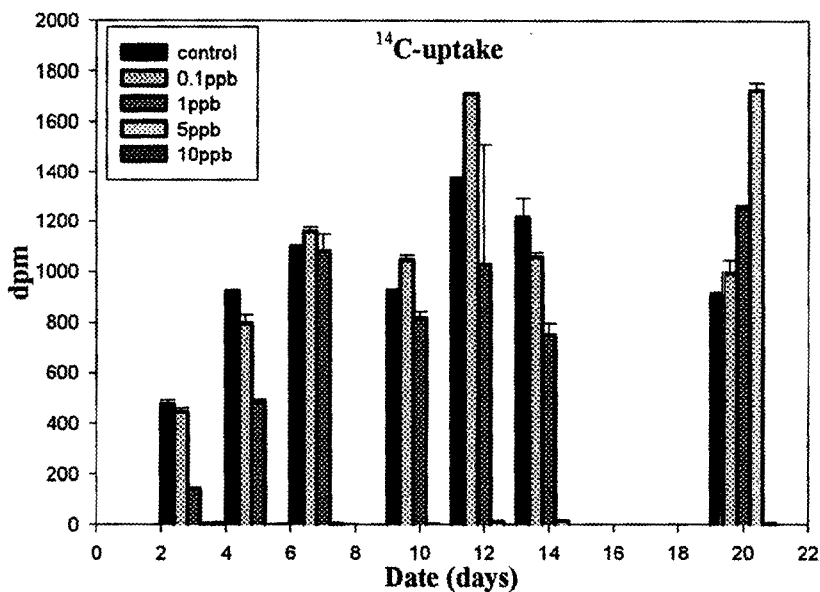


Fig. 5. Time-course changes in photosynthesis of *Heterosigma akashiwo* after a exposure period to benzo[a]pyrene.



## 참 고 문 헌

- Chiou CT, Kile DE, Brinton TI, Malcolm RL, and Leenheer JA 1987. A comparison of water solubility engancements of organic solutes by aquatic humic materials and commercial humic acids. *Environmental Science and Technology* 21, 1231-1234.
- Gunnarsson JS, MT Schaanning, K Hylland, M Skold, D Eriksen, JA Berge, and J Skei. 1996. Interactions between eutrophication and contaminats. III. Mobilization and bioaccumulation of benzo[a]pyrene from marine sediments. *Marine pollution Bullentin.* 33:80-89.
- Karickoff SW and Morris KR 1985. Sorption dynamics of hydrophobic pollutants in sediment suspensions. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 4: 469-479.
- Kelly LD, LR McGuinness, JE Hughes SC Wainright. 1999. Effects of phenanthrene on primary production of phytoplankton in two New Jersey estuaries. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63:646-653.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., and Santodonato, J. 1992. Exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. *Environmental Science and Technology* 26:1278-1284.
- OECD. 1998. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances (Draft).
- Okay OS, P Donkin, LD Peters, DR livingstone. 2000. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environmental pollution.* 110:103-113.
- Swackhamer DL and Skoglund RS 1991. The role of phytoplankton in the partitioning of hydrophobic organic contaminants in water. *In Organic Substances and Sediments in Water*, ed. R. Baker, pp. 91-105. Lewis, Chlsea, MI.
- Wu SC and Gschwend PM 1986. Sorption kinetics of hydrophobic organic compounds to natural sediments and soils. *Environmental Science and Technology* 20:717-725.