Korean J. Environ. Biol. 20(2) : 136~145 (2002)

Ag과 Cu로 오염된 퇴적물이 이매패류 *Macoma balthica*의 체내 금속축적과 만성독성에 미치는 영향

유 훈 · 이 인 태 · 이 병 권*

전남대학교 해양학과

Influence of Ag and Cu Contaminated Sediments on the Bioaccumulation and Chronic Toxicity to the Clam *Macoma balthica*

Hoon Yoo, In-Tae Lee and Byeong-Gweon Lee*

Department of Oceanography, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Abstract - A laboratory microcosm experiment was conducted to evaluate a major metal uptake route as well as chronic toxic effects of the clam, *Macoma balthica* exposed to Ag and Cu contaminated sediments. Twenty five clams were exposed to the sediments contaminated with four levels of Ag (0.01~0.87 μmol g^{-1}) and Cu (0.75~5.55 μmol g^{-1}) for 90 days. AVS (acid volatile sulfide) concentration in the sediments, considered as major factor controlling metal geochemistry and bioavailability, was manipulated to evaluate its effects on Ag and Cu bioaccumulation in *M. balthica*. Following 90-d exposure, the tissue Ag and Cu in *M. balthica* increased linearly with the Ag and Cu concentrations in sediments extracted with 1 N HCl (SEM, simultaneously extracted metals with AVS). The bioaccumulation of Ag and Cu in *M. balthica* was little influenced by difference in [SEM]-[AVS] values, suggesting a minor contribution of pore water metals to bioaccumulation. Tissue Ag and Cu concentrations directly influenced on the clearance rate and glycogen content of the clams. The clams with highest tissue Ag (1.0 ±0.2 μmol g^{-1}) and Cu concentrations (2.7±0.3 μmol g^{-1}) had only 18~43% of clearance of the clams exposed to uncontaminated sediments. Similarly, glycogen content of the exposed clams had a inverse relationship with tissue Ag and Cu concentrations. These results suggest that *M. balthica* exposed to Ag and Cu contaminated sediments accumulates metals largely by ingestion of contaminated sediments and can display chronic effects as reduced clearance rate and glycogen content.

Key words : *Macoma balthica*, metal, Ag, Cu, AVS, clearance rate, glycogen, chronic toxicity

서 론

육상이나 연안으로부터 해양환경으로 유입된 중금속은 흡착, 탈착, 리간드교환 같은 복잡한 생지화학적 과정

* Corresponding author: Byeong-Gweon Lee, Tel. 062-530-3467, Fax. 062-530-3469, E-mail: blee@chonnam.ac.kr

을 겪는다. 특히, 중금속은 입자태와 친화도가 매우 높기 때문에, 퇴적물에 해수보다 수천 배 이상 높은 농도로 분포한다. 따라서, 오염된 퇴적물에 서식하는 저서생물은 중금속에 직, 간접적인 악영향을 받을 수 있다(Luoma and Fisher 1997). 저서생물의 중금속 축적과 독성에 대한 기존의 연구들은 수층이나 공극수에 용존하는 용존태 중금속으로부터 생물체내 흡수와 독성작용에 미치는 지화학적 인자를 규명하는데 편중되어 왔다. 최근 들어 오염된 먹이섭식을 통한 저서생물의 중금속 축적경로의 중요성이 인식되고 있으며(Wang and Fisher 1999; Lee *et al.* 2000a), 오염된 먹이나 퇴적물을 섭취한 저서 생물들이 만성독성을 발현할 수 있다고 보고되고 있다(Woodward 1994; Fisher and Hook 1997; Wallace *et al.* 2000). 따라서 연안환경의 위해도를 평가하는데 용존 중금속에 의한 영향 뿐만 아니라, 먹이섭식을 통한 노출경로도 포함시켜야 한다고 제시되고 있다(Schlekat *et al.* 2002). 그러나 섭식을 통한 저서생물의 중금속 축적경로의 규명과 그 독성효과에 대한 연구는 아직도 미흡한 실정이다.

연안환경의 중금속 오염을 모니터링하기 위해, 주로 많은 양의 물을 여과하는 고착성 패류에 축적된 체내 중금속 농도가 활용되어지고 있다. 미국에서 시작된 Mussel Watch 프로그램의 경우 담치와 굴을 오염 지시종으로 선택하여 세계 여러 연안의 중금속 및 유기독성물질의 오염수준을 파악하고 있다(Goldberg *et al.* 1983; Beliaeff *et al.* 1997; O'Connor 2002). 여러 매질이나 생물내 오염물질의 농도분석을 실시하는 궁극적인 목적은 오염물질이 생물에 미치는 잠재적 악영향을 예측하고 평가하는 것이다. 이를 위해서는 환경 내 존재하는 오염물질의 농도수준과 생물체내 농도수준, 그리고 생물에 미치는 독성효과 사이의 관계를 규명하는 것이 필요하다.

저서생물에 대한 중금속의 독성효과는 만성보다는 주로 급성독성효과가 더 잘 알려져 있다. 급성독성실험은 일반적으로 해수를 노출매질로 사용하여 사망률을 평가기준으로 채택하는데, 결과의 재현성과 반복성이 좋고, 비교적 실험을 하기가 용이하기 때문에 오염물질의 독성을 평가하는데 널리 이용되어지고 있다. 그러나, 실제 중금속으로 오염된 해양 환경에서 저서생물들은 급성농도수준보다는 더 낮은 농도에서 더 오랜 기간동안 노출되어 독성을 발현하기 때문에 급성독성실험 기법과 결과를 환경평가에 적용하는 것은 그 효용성이 떨어진다. 따라서, 오염의 정도가 낮은 환경에서 장기간에 걸쳐 중금속에 노출된 생물의 독성효과를 평가하기 위해서는 만성독성효과를 통해서 이루어져야 할 것이다. 하지만, 중금속으로 오염된 퇴적물을 평가하기 위한 만성독성실험 방법과 만성독성 지시자의 개발 역시 미흡한 단계에 있다.

오염물질에 노출된 생물의 만성효과는 분자수준에서 군집수준에 이르기까지 모든 생물수준에서 나타날 수 있다. 예를 들어 metallothionein (MT)은 중금속이 생물체내로 들어왔을 때, 이를 무독화시키기 위해 유도되는 대표적인 단백질이다(Petering *et al.* 1990). 또, 생물 체내에 축적된 글리코겐 함량은 에너지 대사를 나타내는 한 지시자이고 외부에서 받은 스트레스에 의해 감소한다고 알려져 있다(Luca-Abbott SD 2001). 개체수준에서 나타나는 반응은 분자수준에서의 영향을 종합적으로 반영하는데, 여수율(filtration rate)은 이매패류의 생리적인 영향을 평가하는 지시자로서 활용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 중금속으로 오염된 퇴적물에 노출된 이매패인 *Macoma balthica*의 체내 금속농도와 만성독성효과간의 관계를 설정하기 위해, Ag와 Cu로 오염된 퇴적물에 *M. balthica*를 90일간 노출시킨 후 체내 금속농도, 글리코겐 농도와 여수율을 비교 분석하였다. 또한 공극수 내 중금속 농도를 조절한다고 알려진 퇴적물 내 AVS (acid volatile sulfides)와 SEM (simultaneously extracted metal)의 비율(Di Toro *et al.* 1992)을 다양하게 변화시켜 Ag와 Cu의 생물내 흡수 경로를 규명하였다. Ag와 Cu는 높은 독성을 갖는 중금속이며, 이들에 오염된 퇴적물은 *M. balthica* 개체군에 영향을 미칠 수 있을 것이라 제시된 바 있다(Hornberger *et al.* 2000).

재료 및 방법

1. 실험 퇴적물

실험에 사용된 퇴적물은 조간대 갯벌에서 채취하여 현장에서 1 mm체를 통과시킨 후 실험실로 이송하였다. 채취된 퇴적물의 평균 입도는 8.1 이었으며, 평균 조성은 모래, 실트, 점토가 각각 0.4%, 43.8%, 55.8%를 차지하였다. 실험실에서 약 60 kg의 퇴적물을 80 L 버킷에서 염분이 20 psu인 해수 30 L와 균질하게 혼합시킨 후 4개의 20 L 버킷에 옮겼다. 금속염($AgNO_3$, $CuSO_4$)을 증류수에 녹여 만든 Ag와 Cu 용액을 4개의 버킷에 각각 일정량씩 첨가하여 오염되지 않은 대조군을 포함하여 4개의 Ag+Cu 농도구배를 갖도록 하였다(Fig. 1). 퇴적물 내 Ag와 Cu의 표적 농도와 실측된 농도는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). 넣어준 금속용액이 퇴적물 내에서 균일하게 재분배될 수 있도록 혼합기를 이용하여 주기적으로 섞어주며, 실험전까지 저온실(4°C)에서 6주간 보관

하였다. 6주간 금속용액과 반응시킨 퇴적물을 4 kg씩 채취하여 처리군별로 각 2개의 6 L 플라스틱 용기에 옮겨, 해수 2 L와 함께 일주일간 안정화시켰다.

2. 실험생물과 노출

실험생물로 쓰인 *Macoma balthica*는 기수종의 이매패류로 대서양과 태평양 동부 연안의 갯벌에 널리 분포하고 있으며, 환경독성학적 연구에 많이 사용되어 왔다 (Cain and Luoma 1985; Timmermans *et al.* 1996; Thomas *et al.* 1998). *M. balthica*는 퇴적물의 약 8 cm 깊이에서 서식하며, 먹이의 가용성에 따라 퇴적물섭식이나 여과섭식을 하는 이매패류이다(Hummel 1985). 실험생물은 조간대 갯벌에서 채집하여 일주일간 실험실 조건에 순응시켜 사용하였다. 순응시킨 실험생물은 노출이 시작되기 48시간 전 비슷한 크기분포(20～27 mm)를 갖는 9개 그룹(각 25마리)으로 나누었다. 여덟 개 생물 그룹을 4개의 처리군(Control, M1, M2, M3)마다 2개의 반복수로 임으로 넣어준 후, 150 L의 수조에 넣었다(Fig. 1). 각 노출용기를 수조 내 해수에 잠기도록 하여, 모든 처리군은 표층 해수를 공유하였다. 마지막 여분의 그룹은 글리코겐 함량과 체내 중금속 농도의 초기값을 얻는데 사용되었다. 실험해수의 수질을 일정하게 유지하기 위해서 수조에 순환펌프(시간당 4회 회전율)와 여과장치(모래, 암모니아, 활성탄소)를 장착하였다. 실험기간 동안 일주일에 한 번씩 전체 해수의 1/2를 새로운 해수로 교환하였으며, 염분은 20±1 psu 그리고 수온은 15±1°C로 유지시켰다.

90일간의 실험기간동안 배양먹이로서 Ag와 Cu에 오염된 규조류, *Phaeodactylum tricornutum*이, *M. balthica* 개체당 10 ml씩 ($1\sim2\times10^6$ cells ml^{-1}) 매일 공급되었다. *P. tricornutum* 체내 Ag와 Cu농도는 각 처리군의 퇴적물 내 농도와 유사하게 축적시킨 후, 퇴적물과 혼합시켜 제공되었다.

3. 여수율 측정

*M. balthica*를 90일간 노출시킨 후, 각 노출그룹에서 채집하여 체내의 오염된 퇴적물을 제거하기 위해 24시간 동안 깨끗한 해수에서 장 내용물을 배설하도록 유도하였다. 실험생물 중 입수공을 활발히 움직이는 개체만을 선택하여 여수율을 측정하였다. 이것은 예비실험결과 대조군에서도 조개의 건강상태에 따라 여수율이 다르게 나타났기 때문이다. 1 L 비커에 950 ml 해수와 50 ml 식물플랑크톤 *P. tricornutum* (1×10^6 cells ml^{-1})을 넣어준 다음, 교반기(stirrer)를 이용하여 플랑크톤이 균일하게 분포하게 하였다. 이후, 각 처리군에서 작은 개체 4마리 (20.3±0.7 mm)를 비커에 넣어준 후, 30분 간격으로 해수를 채수하여 플랑크톤 밀도에 따른 형광량(fluorescence) 변화를 측정하고, 이로부터 시간에 따른 식물플랑크톤 감소율을 계산하였다. 실험생물의 여수율은 다음식을 이용하여 구하였다(Coughlancence 1969).

$$Clearance\ rate\ (ml\ g^{-1}\ hr^{-1}) = b\ V\ B^{-1}$$

b : *specific loss rate*

V : *volume of seawater in experimental beaker*

B : *dry weight of clam*

*M. balthica*로 여수율을 측정하기 전에, 형광량과 플랑크톤 농도와의 관계를 구하여, 실험에서 얻은 형광량을 플랑크톤 농도로 환산하는데 사용하였다. 작은 개체를 이용한 실험이 끝난 후, 큰 개체 3마리(26.4±1.0 mm)를 이용하여 동일한 실험을 수행하였다.

4. 글리코겐 (Glycogen) 함량

여수율 측정에 사용된 *M. balthica*를 크기별(패각길이 20 mm vs. 26 mm)로 나누어, 동결 건조시켜 조직분쇄기 Rotomixer®로 분쇄하였다. 이렇게 준비된 건조시료는 글리코겐 분석과 체내 중금속 분석용으로 나뉘어 사용되었다. *M. balthica* 체내의 글리코겐 함량은 효소 가수분해법 (enzymatic hydrolyzation)으로 측정하였다 (Roehrig and Allred 1974). 분석 하루 전, 약 20 mg의 건조된 시료에 1 ml 증류수를 넣어 가수분해시킨 후, 교반기를 이용하여 주기적으로 섞어 주었다. 다음날 100 µl amyloglucosidase (in 0.05 M sodium acetate at pH 4.5)를 첨가한 다음, 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후, 10분 동안 5000 rpm에서 원심분리 시킨 뒤, 상등액 10 µl를 3 ml Trinder®가 담겨 있는 5 ml 시험관에 넣어 다시 10분 동안 37°C에서 반응시켰다. 흡광도는 spectrophotometer를 이용하여 504 nm에서 측정하였다.

5. 시료의 채취 및 화학분석

중금속 분석을 위한 시료는 배양의 처음과 마지막에서 채취하였다. 화학분석에 쓰인 실험용기는 모두 10% 염산과 3차 증류수로 세척한 후, 실험에 사용하였다. 퇴적물 시료는 표층(<0.5 cm)과 저층(4～8 cm)으로 구분해서 채취하였다.

AVS 농도는 Boothman and Helmstetter (1992)의 방법에 따라 분석하였다. 각 배양용기에서 얻어진 5～10 g의 퇴적물(습중량)을 60 ml의 1 N HCl이 담긴 둥근 플라스크에 넣어준 후, 40분 동안 교반기에서 진탕시켜 황

화수소(H_2S)를 발생시켰다. 발생된 황화수소는 산화억제제인 SAOB (sulfide anti-oxidant buffer)을 이용하여 포집하였다. 포집된 황화물의 농도는 S^{2-}전극(Orion®)을 이용하여 측정하였다. AVS 분석과정에서 약산에 의해 퇴적물로부터 추출된 중금속(SEM, simultaneously extracted metal)은 0.45 μm PVDF 필터로 거른 후, 20 ml 유리병에 보관하였다.

M. balthica 체내에 축적된 중금속의 농도는 건조된 시료에 14 N HNO_3을 첨가하여 120°C에서 추출시켜 측정하였다(Brown and Luoma 1995). 퇴적물 내 Ag와 Cu 농도는 각 처리군에서 실험시작 전후에 퇴적물 1 g을 채취한 뒤, 14 N HNO_3으로 2주간 추출시켜 농도를 분석하였다. 중금속 농도 분석에는 ICP-AES를 사용하였다. 표준물질(SRM, standard reference material)인 NBS Oyster tissue 1566a와 Estuarine sediment 1646a를 분석과정에 포함시켜 각각 생물시료와 퇴적물 시료의 QA/QC를 확인하였다. 표준물질을 이용한 생물시료의 회수율은 Ag이 104.5±0.1%, Cu가 85.1±0.1%, 퇴적물 시료의 회수율은 Ag이 98.4±0.2%, Cu가 100.3±0.2%이었다.

결 과

1. 퇴적물 내 지화학 특성

퇴적물 내 AVS의 농도는 표층과 저층 그리고 처리군간 큰 변화를 보였다(Table 1). 표층 퇴적물의 AVS 농도는 모두 0.5 μmol g^{-1} 이하 값을 나타냈는데, 이것은 산소를 풍부히 함유한 표층 해수에 의해 산화되었기 때문일 것이다. 실제 *Macoma balthica*가 서식했던 저층 퇴적물(4~8 cm)의 AVS 농도는 대조구에서 평균 13.8 μmol g^{-1}이었지만, 퇴적물에 첨가한 중금속의 양이 증가할수록 감소하여 M3 실험구에서는 평균 1.7 μmol g^{-1}이었다. 실험 초기와 90일간 노출 후 AVS 농도 변화는 비교적 작았다. 1 N HCl에 의해 추출된 Ag 또는 Cu SEM 농도의 초기값과 최종값의 차이는 대조군을 제외하고 23% 이하였다(Table 2). SEM은 퇴적물 깊이에 따라 변화를 보여, 저층 퇴적물의 Ag와 Cu 농도는 표층 퇴적물 농도의 52.1±17.5%와 52.1±14.3%에 불과하였다. SEM과 AVS의 몰농도 차([SEM]-[AVS])는 공극수 중 중금

Table 1. AVS concentrations and [ΣSEM-AVS] in sediments at the beginning (t = 0d) and the end of exposure (t = 90d) (μmol g^{-1})

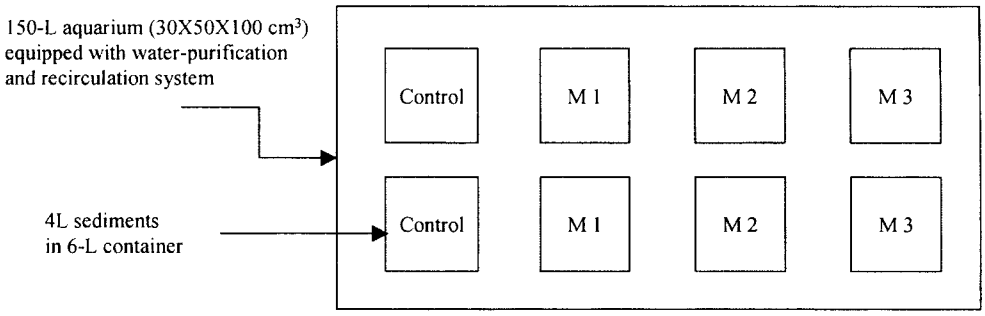
Treatment	Depth	t = 0d		t = 90d		[ΣSEM-AVS]	
		Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.
Control	surface [a]	0.537	0.322	0.006	0.399	0.177	0.614
	deep [b]	11.554	0.889	15.983	0.214	−11.357	−15.739
M1	surface	0.163	0.073	0.006	0.868	0.610	0.822
	deep	8.518	0.420	9.437	0.509	−7.973	−9.058
M2	surface	0.027	0.004	0.004	2.510	2.542	2.465
	deep	4.515	0.013	4.265	1.594	−3.276	−2.780
M3	surface	0.004	0.002	0.001	5.012	5.326	5.490
	deep	0.982	0.046	2.381	3.875	2.382	1.027

[a] Sediments was collected at the surface (< 0.5 cm).
[b] Sediments was collected 4~8 cm depth and homogenized before analysis.

Table 2. Ag and Cu SEM concentrations (μmol g^{-1}) in sediments at the beginning (t = 0d) and the end of exposure (t = 90d)

Treatment	Depth	t = 0d				t = 90d			
		Ag		Cu		Ag		Cu	
		Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.
Control	surface	0.004	0.000	0.711	0.038	0.012	0.000	0.615	0.156
	deep	0.002	0.000	0.196	0.001	0.002	0.000	0.243	0.008
M1	surface	0.036	0.000	0.755	0.001	0.039	0.001	0.808	0.010
	deep	0.027	−[a]	0.531	−[a]	0.017	0.002	0.370	0.054
M2	surface	0.124	0.003	2.507	0.168	0.153	0.000	2.392	0.028
	deep	0.060	0.001	1.209	0.021	0.083	0.005	1.443	0.094
M3	surface	0.588	0.078	5.036	0.044	0.627	0.011	5.178	0.028
	deep	0.408	0.018	3.159	0.059	0.399	0.017	3.208	0.018

[a] No replication was used



Total metal concentration in sediment (μmol g^{-1})

Ag	target	-	0.05	0.19	0.93
	measured	0.01	0.06	0.18	0.87
Cu	target	-	0.79	3.93	7.87
	measured	0.75	1.25	3.05	5.55

Fig. 1. Schematic diagram of experimental design. Each treatment with different concentration of Ag and Cu (Control, M1, M2, M3) had two replicate exposure containers and was submerged in the 150-L aquarium equipped with the water-purification and recirculation system. Each exposure container had 25 *Macoma balthica* with similar size range.

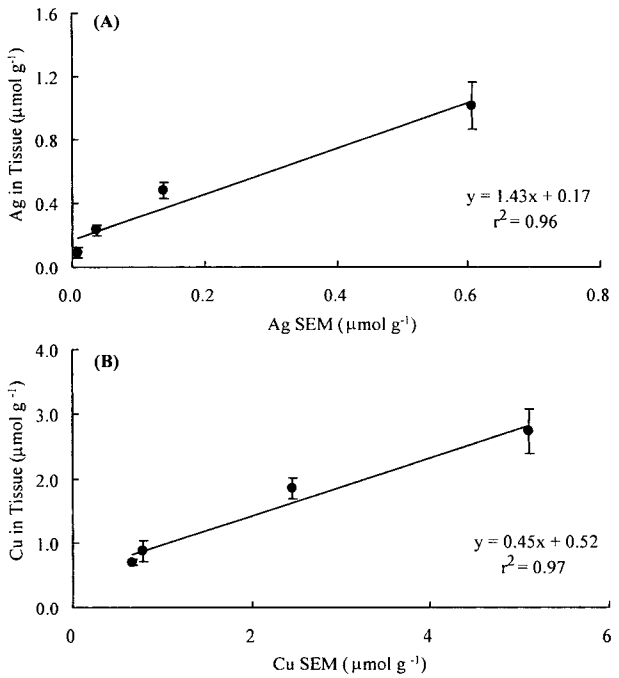


Fig. 2. The relationship between the mean tissue Ag (A) or Cu concentration (B) in *Macoma balthica* (μmol g^{-1}) and the mean metal concentrations in sediments (μmol g^{-1}) extracted with 1 N HCl (SEM). The mean Ag and Cu SEM concentration is depth-weighted and time-averaged value to represent mean exposure condition of *M. balthica* during 90 d exposure period and over entire sediment depth. The error bar represents standard deviation around mean (N = 6) (***: $p < 0.005$).

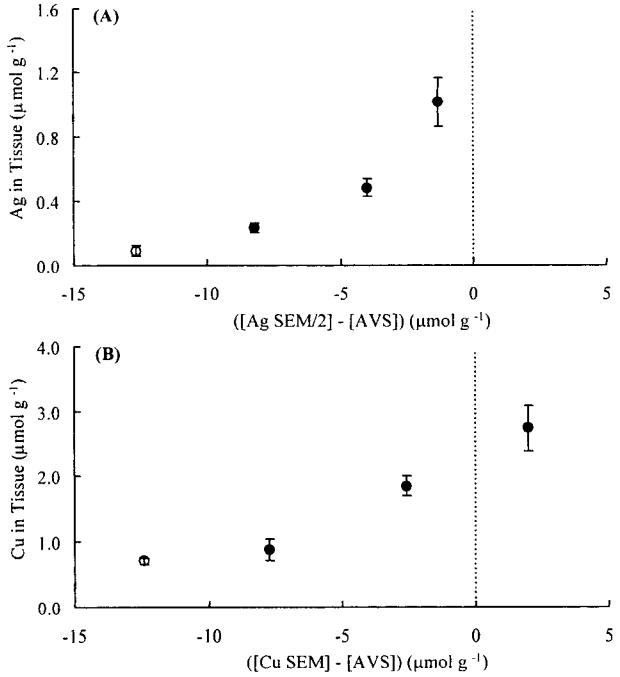


Fig. 3. The relationship of tissue Ag (A) or Cu (μmol g^{-1}) (B) with [SEM-AVS] (μmol g^{-1}). The SEM and AVS concentration used for the [SEM-AVS] calculation is depth-weighted and time-averaged value to represent mean exposure condition of *Macoma balthica* during 90 d exposure period and over entire sediment depth. The vertical line represents ([SEM]-[AVS]) = 0. The open symbol is data from control treatment and the closed from metal contaminated treatment

속 농도와 금속의 생물축적을 제어하는 중요한 인자로 인식되고 있다(Di Toro 1992). [SEM]-[AVS] 값은 각 금속황화물의 안정도 상수를 고려하여 기존의 방법(Lee *et al.* 2000b)에 따라 계산하였다. [SEM]-[AVS] 값은 표층에서 모두 양의 값을 나타냈고, 저층에서는 가장 많은 중금속을 첨가시킨 M3 실험구에서만 양의 값을 보였다. 강한 질산(14 N HNO_3)으로 추출된 퇴적물 내 Ag의 총 농도는 대조군, M1, M2, M3에서 각각 0.01, 0.06, 0.18, 0.87 μmol g^{-1}, Cu는 0.75, 1.25, 3.05, 5.55 μmol g^{-1}을 보여 표적 농도와 유사하였다(Fig. 1).

2. 체내 중금속 축적

*M. balthica*의 체내 Ag와 Cu의 농도는 약산으로 추출된 퇴적물 내 Ag와 Cu의 농도(SEM)와 양의 상관관계를 보여, 최대 축적농도는 퇴적물 내 금속농도가 가장 높은 M3 처리군에서 1.01 μmol Ag g^{-1} (= 109.3 μg Ag g^{-1}) 와 2.73 μmol Cu g^{-1} (= 173.7 μg Cu g^{-1})를 나타냈다(Fig. 2). 생물축적계수(BAF, bioaccumulation factor)는 생물체내 금속농도와 퇴적물 내 금속농도의 비로써 퇴적물로부터 생물이 각 금속을 축적하는 정도를 나타내는 지수이다. 본 실험에서 체내 금속농도와 퇴적물 중 금속농도간 관계식의 기울기가 Ag와 Cu의 생물축적계수에 해당된다(Fig. 2). Ag의 생물축적계수는 Cu보다 3배 정도 높았다(BAF of Ag = 1.43 vs. BAF of Cu = 0.45). AVS이론은([SEM]-[AVS])이 음의 값을 가질 때 생물체내 금속축적이 일어나지 않을 것이라고 예측하지만, 본 실험에서는([SEM]-[AVS])이 음의 값을 가질 경우에도 처리군 *M. balthica*는 대조군 생물보다 훨씬 더 많은 Ag와 Cu를 축적하였다(Fig. 3).

3. 여수율

실험에 사용된 *M. balthica*의 여수율은 퇴적물의 중금속 오염도와 생물체내 금속농도를 뚜렷하게 반영하였다. *M. balthica*가 여과한 해수의 양은 퇴적물 내 중금속 농도가 증가할수록 감소하였다(Fig. 4A). 대조군에서 작은 개체(20 mm)와 큰 개체(26 mm)의 여수율은 각각 74 ml $clam^{-1}$ hr^{-1}와 112 ml $clam^{-1}$ hr^{-1}이었는데, 중금속 농도가 가장 높은 M3 처리군에서 각각의 여수율은 대조군의

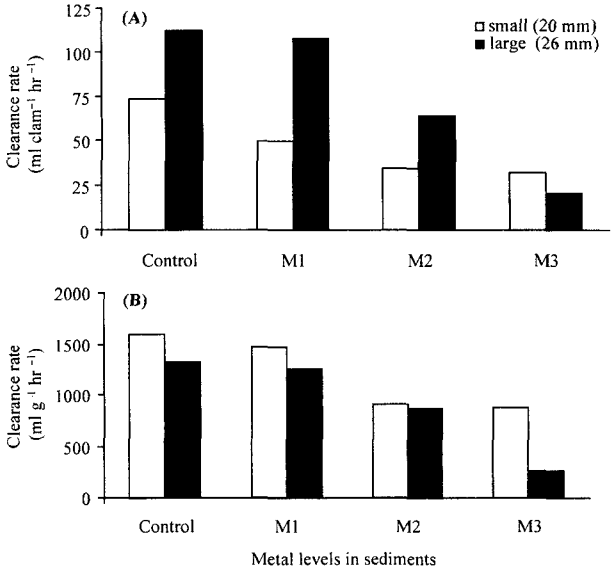


Fig. 4. Variations of water clearance rates in the *Macoma balthica* following exposure for 90 days to the sediment having different level of Ag and Cu concentrations. Clearance rate is represented based on either individual clam (A) or clam dry weight (B). See figure 1 for Ag and Cu concentrations in the Control, M1, M2, M3 and M4 treatment.

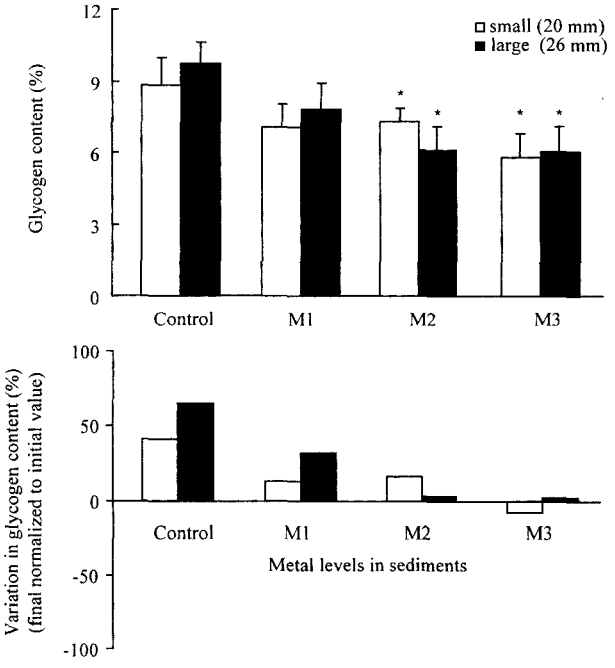


Fig. 5. Variations of glycogen content in the *Macoma balthica* exposed for 90 days to the sediments having different levels of Ag and Cu concentrations. Glycogen content is represented as % glycogen in the *M. balthica* following 90-d exposure (A) or this value is normalized to the glycogen content of the *M. balthica* before exposure (B). See figure 1 for Ag and Cu concentrations in the Control, M1, M2, M3 and M4 treatment. The error bar represents standard deviation around mean (N = 4). * indicates significant difference between the control and the treatment at ($p < 0.05$).

43%와 18%에 불과하였다. 여수율을 건중량으로 환산하면, 생물 개체 크기에 따른 여수율 차이는 감소하였다(Fig. 4B). 실험생물 수가 충분하지 않아 여수율을 측정하는데 각 크기별 반복수가 없어 통계처리를 하지 않았지만, 크기별 여수율의 변화 경향은 체내 금속농도에 따라 일정하였다.

4. 글리코겐 함량

생물 크기에 관계없이 90일간 M2, M3 처리군 퇴적물에 노출시킨 *M. balthica*의 글리코겐 함량은 대조군의 글리코겐 함량보다 낮았다(Fig. 5A). 90일간의 노출 후, 대조군 *M. balthica*의 글리코겐 함량은 초기보다 작은 개체가 47%, 큰 개체가 65% 증가하였다(Fig. 5B). 하지만, 이런 증가경향은 퇴적물 내 중금속의 오염도가 높아질수록 약화되었으며, 가장 높은 농도로 오염된 처리군 M3에서는 오히려 초기보다 7% 감소하였다.

토 의

퇴적물 내 중금속에 의한 생물영향을 평가, 예측하기 위해서는 퇴적물 내 중금속의 농도와 노출된 생물이 축적한 중금속의 농도, 그리고 체내농도와 생물에 미치는 영향 사이의 관계를 밝혀야 한다(Chapman 1995). 본 연구에서는 퇴적물 내 지화학 특성에 따른 *Macoma balthica*의 체내 중금속 축적을 관찰하였고, 특별히 SEM과 AVS의 비율을 조절하여 퇴적물 내 중금속의 독성을 조절한다고 알려진 AVS가 퇴적물 내 금속 분포와 생물체내 축적에 미치는 영향을 알아보았다. 생물에 축적된 Ag와 Cu가 생물에 미치는 영향은 생화학적 수준에서 글리코겐 함량과 개체수준에서 여수율 측정을 통하여 평가하였다.

AVS의 농도는 퇴적물에 첨가한 Ag와 Cu의 농도가 증가할수록 현저히 감소하는 경향을 보였다. 퇴적물에서 황화수소(H_2S, HS^-)는 주로 Fe^{2+}과 결합하여 철황화물(amorphous FeS, mackinawite, greigite)을 형성하며(Morse *et al.* 1987), 철보다 황과의 안정도가 더 높은 금속황화물을 생성하는 금속(금속황화물 안정도: Hg>Ag>Cu>Pb >Cd>Zn>Ni>Fe)이 존재할 경우, 이들 금속이 철황화물 중의 Fe^{2+}를 치환하여 보다 안정한 형태의 금속황화물을 형성한다. AVS는 1 N HCl로 금속황화물을 용해시켜 발생한 황화수소를 말하는데, 금속황화물의 안정도가 높아질수록 황화수소 발생율이 낮아진다(Simpson *et al.* 1998). 따라서 본 실험에서는 넣어준 금속의 양이 증가할수록, 퇴적물 내 Ag_2S와 CuS의 양이 증가하고 이들 금속황화물은 1 N HCl에서 부분적으로 추출되어 AVS의 농도가 감소한 것으로 보여진다. 다른 연구(Lee *et al.* 2001; Berry *et al.* 1999)에서도 퇴적물에 첨가된 Ag의 양과 추출된 AVS 농도는 반비례한다고 보고한 바 있다. 이처럼 Ag와 Cu의 황화물이 1 N HCl에서 부분적으로 추출되는 현상은 표층과 저층의 Ag와 Cu의 농도가 다른 이유를 설명하는데 이용될 수 있다. 즉, 표층 퇴적물 내 Ag와 Cu는 대부분 약산에 의해 쉽게 용출될 수 있는 산화철이나 산화망간과 결합하여 존재하므로, 결합력이 강한 Ag_2S와 CuS로 존재하는 저층 퇴적물에서보다 1 N HCl로 더 많이 추출된 결과이다. 이와 유사하게, Lee *et al.*(2000b)은 퇴적물 내 1 N HCl로 추출된 Cu의 농도는 AVS 농도와 역의 관계가 있다고 보고하였다.

중금속으로 오염된 퇴적물에 서식하는 저서생물의 중금속 흡수경로를 이해하는 것은 독성학적 측면에서 뿐만 아니라, 오염된 환경의 규제와 관리에서도 매우 중요하다. *M. balthica*의 중금속 축적은 아가미를 통한 용존태 중금속의 흡수경로와 오염된 퇴적물과 먹이의 섭식을 통한 흡수경로로 이루어진다고 할 수 있다. 용존태 금속의 흡수는 다시 공극수나 표층수에 용존하는 금속으로 세분할 수 있다. 본 실험에서는 모든 처리군의 노출 용기들이 표층수를 공유하였고, 표층수는 순환펌프(시간당 4회 회전율)와 여과장치(모래, 암모니아, 활성탄소)를 통과하였기 때문에, 각 처리군의 생물들은 표층해수로부터 동일한 Ag와 Cu 농도에 노출되었다고 볼 수 있다. 공극수로부터 Ag와 Cu의 체내 흡수 역시 미미할 것으로 보여진다. AVS는 유기물질과 함께 공극수 내 용존 중금속의 농도를 조절하는 중요한 인자로 인식되고 있다. 지금까지 많은 연구들(Lee *et al.* 2000b; Di Toro 1992; Hansen *et al.* 1996)은 퇴적물에서 추출된 AVS 농도가 AVS와 함께 추출된 금속의 농도(SEM)보다 높을 때, 공극수 내 중금속 농도는 매우 낮다고 보고하고 있다. 본 실험에서 실험생물인 *M. balthica*는 대부분 AVS의 농도가 Ag나 Cu의 SEM보다 높은 조건의 퇴적물에 노출되었기 때문에, 공극수로부터 Ag와 Cu의 흡수는 미미했을 것으로 추정된다. *M. balthica*가 체내에 축적한 Ag와 Cu 농도는 1 N HCl으로 추출된 퇴적물 내 Ag와 Cu 농도와 매우 좋은 상관관계를 나타냈는데, 다른 패류에서도 체내 금속농도와 가장 좋은 상관성을 나타내는 퇴적물 내 지화학적 금속 존재형태는 약산으로 추출된 금속이라고 보고된 바 있다(Luoma and Jenne 1977). 약산에 의한 금속의 추출과정은 생물의 소화기관에서 금속이 추출되는 과정과 유사성을 가지고 있다(Mayer *et al.* 1996). *M. balthica*는 오염된 퇴적물이나 먹이를 섭취

하여 소화기관을 통하여 다른 중금속(Cd, Ni, Cr, Zn)도 체내로 흡수할 수 있다(Lee *et al.* 2000a; Griscom *et al.* 2002). Lee *et al.*(2000a)은 같은 생물종을 이용하여 오염된 퇴적물로부터 생물체내 Cd, Ni, Zn의 축적은 AVS 농도나, 공극수 내 금속농도에 관계없이, 주로 퇴적물 섭식을 통해서 이루어진다고 보고하였으며, 이는 본 실험의 결과와 동일하다. 본 실험과 다른 연구 결과로부터 *M. balthica*의 금속축적은 일반적으로 섭식이 다른 흡수경로보다 우세한 것이라고 결론지을 수 있다.

오염물질이 생물에 미치는 잠재적 악영향을 예측하고 평가하는데 있어 가장 중요한 단계는 생물체 내 농도수준과 생물에 미치는 독성효과 사이의 관계를 규명하는 것이다. 본 실험에서 Ag와 Cu를 많이 축적한 *M. balthica*는 그 독성영향으로서 여수율과 글리코겐 함량이 현저히 감소함을 알 수 있었다. *M. balthica*의 여수율은 퇴적물 내 Ag와 Cu의 오염정도가 증가하고, 체내 농도가 증가할수록 뚜렷이 감소하는 경향을 나타내었다. Sze and Lee (2000)는 50 ppb Cu에 노출된 *Perna viridis*의 여수율이 90일간 노출 후에 10.3~18.5% 감소하였다고 보고하였다. 중금속이 이매패류의 여수율에 미치는 내적 및 외적요인에 대해서는 비교적 잘 알려져 있는데, 대표적으로 외부에서 받는 스트레스를 피하기 위해 패각을 장시간 닫아 놓는 기작이 이에 포함된다(Patel and Anthony 1991). 또한, Cu가 이매패류의 아가미 필라멘트를 분열시키거나, 섬모활동을 저해시켜 여수율을 감소시킬 수 있다(Sunila 1986; Brown and Newell 1972).

먹이섭식의 결과 생물체내로 유입된 에너지는 글리코겐이나 지질의 형태로 저장되며, 생활, 성장 그리고 생식 등에 쓰인다. 생물은 외부에서 받는 스트레스를 방어하거나 손상된 대사활동을 회복시키기 위해 저장된 에너지가 사용되기 때문에, 글리코겐 함량의 증가나 감소는 오염물질 등에 의한 영향을 반영한다(Sobral and Widdow 1997). 그러나, 글리코겐 함량의 변화는 생물의 장기적인 에너지대사를 반영하기 때문에, 단기적으로 관찰되기 힘들다. 담수조개인 *Lamellidens corrianus*를 100~400 ppb Cu에 96시간 동안 노출시킨 실험에서 처리군간 체내 글리코겐 농도의 차이가 관측되지 않았다(Rajalekshmi and Mohandas 1993). 실험생물을 90일 동안 노출시킨 본 실험에서는 글리코겐 함량에서 유의한 차이가 나타났으며, 특히 실험이 수행되기 이전의 값과 비교하면, 생물 체내 금속농도가 증가할수록 현저하게 감소하였다.

Di Toro *et al.* (1992)이 제안한 평형분배(equilibrium partitioning)이론은 자유이온 활성도 모델(free ion activity model)에 근거한 것으로, 공극수나 해수에 용존태로 존재하는 중금속만이 생물에게 영향을 미친다고 주장하였다. 이들의 주장은 대부분 중금속에 오염된 퇴적물을 이용한 급성독성실험의 결과에 기초하고 있다. 본 실험에서는 오염된 퇴적물에 장기간 노출된 *M. balthica*가 용존태 금속보다는 주로 오염된 퇴적물의 섭식을 통해서 Ag와 Cu를 흡수할 수 있음을 밝혔다. 또한, 섭식을 통해 체내에 축적된 금속이 그 만성독성효과로써 여수율과 글리코겐 함량에 영향을 줄 수 있음을 보여주었다. 본 실험의 결과로부터 중금속으로 오염된 퇴적물의 환경영향평가에서 용존태 금속에 의한 영향 뿐만 아니라, 먹이 섭식을 통한 노출을 고려해야 한다고 제시할 수 있다.

적 요

Ag와 Cu로 오염된 퇴적물이 이매패류 *Macoma balthica*에 미치는 만성독성영향과 주요한 중금속 흡수경로를 평가하기 위해, 실험실에서 미소생태계 실험이 수행되었다. 실험생물인 *M. balthica*는 4개의 농도구배를 갖는 Ag (0.01~0.87 μmol g^{-1})와 Cu (0.75~5.55 μmol g^{-1})로 오염된 퇴적물에서 90일 동안 배양되었다. 퇴적물 내 중금속의 지화학적 분포 특성과 생물이용도를 조절한다고 알려진 AVS (acid volatile sulfide)의 농도를 변화시켜, AVS가 *M. balthica*의 Ag와 Cu의 체내축적에 미치는 영향을 평가하였다. 90일간 노출된 후, *M. balthica*가 축적한 Ag와 Cu의 농도는 1 N HCl로 추출된 퇴적물 내 중금속의 농도(SEM, simultaneously extracted metal)와 양의 상관성을 보이며 증가하였다. Ag와 Cu의 체내 축적은 [SEM]-[AVS] 값에 큰 영향을 받지 않았는데, 이것은 공극수 내 용존태로 존재하는 Ag와 Cu가 생물 체내 축적에 크게 기여하지 않았다는 것을 암시한다. 체내 축적된 Ag와 Cu는 *M. balthica*의 여수율과 글리코겐 함량에 직접적인 영향을 미쳤다. 최대 1.0±0.2 μmol Ag g^{-1}와 2.7±0.3 μmol Cu g^{-1}를 축적한 *M. balthica*의 여수율은 오염되지 않은 퇴적물에 노출된 실험조개의 18~43%에 불과하였다. 이와 유사하게, 중금속 처리군에 노출된 *M. balthica*의 글리코겐 함량은 체내 Ag와 Cu의 농도와 음의 상관성을 나타내었다. 본 연구의 결과는 Ag와 Cu로 오염된 퇴적물에 노출된 *M. balthica*는 주로 퇴적물의 섭식을 통해 중금속을 축적하며, 여수율과 글리코겐 함량의 감소와 같은 만성독성영향을 나타낼 수 있다는 것을 암시한다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 전남대학교 학술연구비에 의하여 연구되었습니다. 본 논문을 정성껏 심사해주신 두 분 최광식 박사님과 최희선 박사님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

Beliaeff B, TP O'Connor, DK Daskalakis and PJ Smith. 1997. U.S. Mussel watch data from 1986 to 1994: Temporal trend detection at large spatial scales. Environ. Sci. Technol. 31:1411-1415.

Berry WJ, MG Cantwell, PA Edward, JR Serbst and DJ Hansen. 1999. Predicting toxicity of sediments spiked with silver. Environ. Toxicol. Chem. 18:40-48.

Boothman WS and A Helmstetter. 1992. Vertical and seasonal variability of acid volatile sulfides in marine sediments. Research Report. U.S. Environmental Protection Agency, Narragansett, RI.

Brown BE and RC Newell. 1972. The effect of copper and zinc on the metabolism of the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 16:108-118.

Brown CL and SN Luoma. 1995. Use of the euryhaline bivalve *Potamocorbula amrensis* as a biosentinel species to assess trace metal contamination in San Francisco Bay. Mar. Ecol. Prog. Ser. 124:129-142.

Cain DJ and SN Luoma. 1985. Copper and silver accumulation in transplanted and resident clams (*Macoma balthica*) in South San Francisco Bay. Mar. Environ. Res. 15:115-3

Chapman PM. 1995. Ecotoxicology and pollution-key issues. Mar. Pollut. Bull. 31:167-177.

Coughlan J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. Mar. Biol. 2:356-358.

Di Toro DM, JD Mahony, DJ Hansen, KJ Scott, AR Carson and GT Ankely. 1992. Acid volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. Environ. Sci. Technol. 26:96-101.

Fisher NS and SE Hook. 1997. Silver accumulation and toxicity in marine and fresh-water zooplankton, in Proceedings: Fifth International Conference on the Transport, Fate, and Effects of Silver in the Environment, Hamilton, Ontario, Canada.

Goldberg ED, M Koide, V Hodge, AR Flegal and J Martin. 1983. U.S. Mussel Watch: 1977-1978 result on trace metals and radionuclides. Est. Coast. Shelf. Sci. 16:69-93.

Griscom SB, NS Fisher, RC Aller and BG Lee. 2002. Effects of gut chemistry in marine bivalves on the assimilation of metals from ingested sediment particles. J. Mar. Res. 60:101-120.

Hansen DJ, JD Mahony, WJ Berry, SJ Benyi, JM Corbin, SD Prarr, DM Di Toro and MB Abel. 1996. Chronic effect of cadmium in sediments on colonization by benthic marine organisms: an evaluation of the role of interstitial cadmium and acid-volatile sulfide in biological availability. Environ. Toxicol. Chem. 15:2126-2137.

Hornberger MI, SN Luoma, DJ Cain, F Parchaso, CL Brown, RM Bouse, C Wellise and JK Thomson. 2000. Linkage of bioaccumulation and biological effects to changes in pollutant loads in South San Francisco bay. Environ. Sci. Technol. 34:2401-2409.

Hummel H. 1985. Food intake and growth in the laboratory. Neth. J. Sea. Res. 19:77-83.

Lee BG, SB Griscom, JS Lee, SN Luoma, HJ Choi, CH Koh and NS Fisher. 2000a. Influence of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments. Science. 287:282-284.

Lee JS, BG Lee, H Yoo, CH Koh and SN Luoma. 2001. Influence of reactive sulfide (AVS) and supplementary food on Ag, Cd, and Zn bioaccumulation in the marine polychaete, *Neanthes anrenaceodentata*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 216:129-140.

Lee JS, BG Lee, SN Luoma, HJ Choi, CH Koh and CL Brown. 2000b. Influence of acid-volatile sulfides and metal concentrations on metal partitioning in contaminated sediments. Environ. Sci. Technol. 34:4511-4516.

Luca-Abbott SD. 2001. Biomarker of sublethal stress in the soft-sediment bivalve *Austrovenus stutchburyi* exposed in-situ to contaminated sediment in an urban New Zealand harbour. Mar. Pollut. Bull. 42:817-825.

Luoma SN and EA Jenne. 1977. The availability of sediment-bound cobalt, silver, and zinc to a deposit-feeding clam. In Biological Implications of Metals in the Environment, edited by Wildung RE & H Drucker. NTIS CONF-750920, Springfield, VA:213-20.

Luoma SN and NS Fisher. 1997. Uncertainties in assessing contaminant exposure from sediments. In Ecological risk assessment of contaminated sediments, edited by Biddlinger GR, T Dillon and CG Ingersoll, Pensacola, FL.

Mayer LM, Z Chen, RH Findlay, J Fang, S Sampson, RFL Self, PA Jumars, C Quetel and OFX Donald. 1996. Bioavailability of sedimentary contaminants subject to deposit-feeder digestion. Environ. Sci. Technol. 30: 2641-2645.

Morse JW, FJ Millero, JC Cornwell and D Rickard. 1987.

The chemistry of the hydrogen sulfide and iron sulfide systems in natural waters. Earth-Sci. Review. 24: 1-42.

O'Connor TP. 2002. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. Mar. Pollut. Bull. 53:117-143.

Patel B and K Anthony. 1991. Uptake of cadmium in tropical marine lamellibranchs, and effects on physiological behavior. Mar. Biol. 108:457-470.

Petering DH, WH Goudrich, S Krezoski, D Weber, CF Shaw, R Spieler and L Zettergren. 1990. Metal-binding proteins and peptides for the detection of heavy metals in aquatic organisms. In: Biomarkers of environmental contamination, edited by McCarthy JF & LR Shugart, Boca Raton, Florida, pp. 239-254.

Rajalekshmi P and A Mohandas. 1993. Effect of heavy metals on tissue glycogen levels in the freshwater mussel, *Lamellidens corrianus*. Sci. Total Environ, supplement: 617-630.

Roehrig, L Karla and JB Allred. 1974. Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. Analytical Biochemistry, 58:414-421.

Schlekat CE, BG Lee and SN Luoma. 2002. Dietary metals exposure and toxicity to aquatic organisms: Implications for ecological risk assessment. In: Coastal and estuarine risk assessment edited by Newman MC, MH Roberts & Jr. RC Hale, Boca Raton, Florida, pp. 151-188.

Simpson SL, SC Apte and GE Batley. 1998. Effect of short-term resuspension events on trace metal speciation in polluted anoxic sediments. Environ. Sci. Technol. 32: 620-625.

Sobral P and J Widdows. 1997. Effects of copper exposure on the scope for growth of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. Mar. Pollut. Bull. 34: 992-1000.

Sunila I. 1986. Chronic histopathological effects of short-term copper and cadmium exposure by environmental pollutants. J. Invert. Path. 47:125-142.

Sze PWC and SY Lee. 2000. Effects of chronic copper exposure on the green mussel *Perna viridis*. Mar. Biol. 137: 379-392.

Thomas CA and IL Bendell-Young. 1998. Linking the sediment geochemistry of an intertidal region to metal bioavailability in the deposit feeder *Macoma balthica*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 173:197-213.

Timmermans BMH, H Hummel and RH Bogaards. 1996. The effect of polluted sediment on the gonadal development and embryogenesis of bivalves. Sci. Total Environ. 187:231-236.

Wallace WG, TM Hoexum Brouwer, TM Marius Brouwer and GR Lopez. 2000. Alterations in prey capture and induction of metallothioneins in grass shrimp fed cadmium-contaminated prey. Environ. Toxicol. Chem. 19: 962-971.

Wang WX and NS Fisher. 1999. Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. Sci. Total Environ. 237/238:459-472.

Woodward DF. 1994. Effects on rainbow trout fry of a metals-contaminated diet of benthic invertebrates from the Clark Fork River, Montana. Trans. Am. Fish. Soc. 127:51-62.

(Received 21 March 2001, accepted 15 May 2002)