

## 유류 오염에 의한 요각류 *Tigriopus japonicus*의 섭식반응

이균우\*

한국해양과학기술원 생태기반연구센터

### Ingestion Responses of the Copepod *Tigriopus japonicus* Exposed to the Water Accommodated Fraction (WAF) and Chemically Enhanced WAF (CEWAF) of Crude Oil

Kyun-Woo Lee\*

Korea Institute of Ocean Science and Technology, Ansan 15627, Korea

#### Corresponding Author

Kyun-Woo Lee  
 Korea Institute of Ocean Science and Technology, Ansan 15627, Korea  
 E-mail : kyunu@kiost.ac.kr

Received : October 08, 2016  
 Revised : October 10, 2016  
 Accepted : October 22, 2016

본 연구는 유류오염에 의한 요각류 *Tigriopus japonicus*의 먹이섭식능력의 감소가 먹이회피에 의한 것인지 오염된 해수의 독성에 의한 것인지를 알아보기 위해, 유류(WAF 또는 CEWAF)에 오염된 먹이에 대한 *T. japonicus*의 먹이 섭식력을 조사하였다. WAF가 없는 배양수 조건에서는 모든 실험구에서 섭식량의 차이를 보이지 않았지만 WAF가 배양수에 있는 조건에서는 WAF의 농도가 증가할수록 섭식량이 줄어드는 경향을 보여 WAF 100% 농도에서는 대조구에 비해 유의하게 감소하였다. *T. japonicus*가 CEWAF에 오염된 환경에서 먹이의 종류에 따른 먹이선택성 여부를 조사한 결과, 오염된 먹이를 공급했을 때, 배양수에 CEWAF가 존재하는 상태에서, 먹이로 *Tetraselmis suecica*를 공급한 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 낮은 부착규조류 섭식률을 보였다. 결과적으로, 유류오염에 의한 *T. japonicus*의 먹이 섭식력의 감소는 오염된 먹이회피에 의한 섭식력의 감소가 아니라 해수에 존재하는 유류독성에 의한 것으로 판단된다.

This study examined the feeding response of the harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus* exposed to WAF or CEWAF to understand whether decreased feeding of the copepod by oil exposure is induced by food avoidance or medium toxicity. In the medium without WAF, there was no difference in the ingestion rate of the copepod among all polluted diets those were exposed to different concentrations of WAF. The present of WAF in the medium however caused a decrease in the ingestion rate at 100% WAF treatment. In the mixed diet treatment with adhesive diatoms and *Tetraselmis suecica*, *T. japonicus* had significantly lower ingestion rate on adhesive diatoms than on others in the medium with CEWAF. As a result, decreased ingestion of *T. japonicus* by oil exposure was caused by oil toxicity in medium, which may not have directly related with an avoidance of polluted food organisms.

**Keywords:** Copepod(요각류), *Tigriopus japonicus*, WAF, CEWAF, Oil toxicity(유류독성)

#### 서론

해양에서 유류유출사고는 드물게 발생하지만 한 번 사고가 발생하면 장기간에 걸쳐서 해양생태계에 치명적인 손상을 입힌다(Lyons et al., 2011). 따라서 이러한 유류유출사고의 피해를 최소화하기 위해 즉, 유류의 해안가로의 확산을 방지 또는 완화하기 위해 일반적으로 사고발생 직후 유화제를 사용한다(George-Ares and Clark, 2000). 이 유화제는 주로 계면활성제 성분으로 유류를

신속히 해수 중으로 확산시키는 역할을 하며, 결과적으로 해수 내 미생물에 의해 잘 분해되도록 도와주는 역할을 한다(Tiehm, 1994; Jung et al., 2009). 그러나 최근 이 유화제와 유화제에 의해 화학적으로 분산된 유류(CEWAF)는 해양생물에 대해 오히려 분산제를 쓰지 않고 자연적으로 수화된 WAF 보다 더 독성이 강한 것으로 보고되고 있다(Lee et al., 2013).

일반적으로 유류오염은 해양생물의 먹이섭식능력을 감소시킨다. 예를 들어, Nordtug et al. (2011)은 어류의 먹이소화에 영향을 미

치는 total-PAH의 농도(EC<sub>50</sub>)를 보고하였고, Bechmann et al. (2010)은 갑각류가 유류에 장기적으로 노출되었을 경우 섭식능력이 감소됨을 증명한 바 있다. 여과섭식을 하는 요각류의 경우, 50 µm 이하의 유류입자는 섭취가 가능할 뿐 아니라 소화시스템을 통한 생물학적 이용가능성이 있기 때문에 이들의 먹이섭식능력의 감소를 예상할 수 있으나(Hansen et al., 2009, 2012), 이러한 먹이섭식 감소가 유류에 오염된 해수 내 독성에 의한 것인지, 섭식회피 즉, 오염된 먹이는 먹지 않는지에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

한편, 요각류는 모든 해양에 분포하며 해양생태계에서 생산자와 소비자의 에너지 흐름을 이어주는 가교역할을 한다(Ohman and Hirche, 2001). 따라서 먹이사슬을 통한 해양 오염물질의 상위 포식자로의 전달에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 배양이 쉽고 짧은 생활사를 가지기 때문에 최근 해양생태독성평가를 위한 독성실험생물로 사용되고 있다(Raisuddin et al., 2007; Kusk and Wollenberger, 2007). 특히, harpacticoid 요각류인 *Tigriopus japonicus*는 크기가 작고 암수 및 발달단계 구분이 가능하며 짧은 생활사와 높은 번식력을 가지기 때문에 최근 해양환경연구에서 실험생물에 적합한 것으로 알려져 있다(Kwok and Leung, 2005; Lee et al., 2008).

따라서 본 연구는 유류오염에 의한 요각류의 먹이섭식능력의 감소가 먹이섭식회피에 의한 것인지 오염된 해수의 독성에 의한 것인지를 알아보기 위해, 유류(WAF 또는 CEWAF)에 오염된 먹이에 대한 *T. japonicus*의 먹이 섭식력을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. WAF에 오염된 먹이에 대한 *T. japonicus*의 섭식률

#### 1.1. 실험농도의 결정

*T. japonicus*의 섭식을 실험에 앞서, 먹이밀도에 영향을 주지 않는 WAF의 노출농도를 결정하기 위해 예비실험을 실시하였다. 실험에 사용된 먹이는 담녹조강(Prasinophyta)에 속하는 미세조류인 *Tetraselmis suecica*를 사용하였다. 우선, *Te. suecica*의 밀도가 감소하는 WAF 농도를 제외하기 위해 0, 10, 30, 50, 70, 100%의 WAF에 노출시킨 다음 24시간 후 운동성 변화를 관찰하였다. 실험은 50 ml conical tube(배양수: 50 ml)에 5×10<sup>5</sup> cells/ml를 수용하여 수온 20°C, 염분 33 psu 및 암조건에서 배양하였다. 실험결과, 모든 농도에 노출된 *Te. suecica*는 대조구와 비교해서 배양밀도 및 운동성의 차이가 없었기 때문에 섭식실험을 위한 실험농도를 0, 10, 50, 100%로 결정하였다.

#### 1.2. *Tigriopus japonicus*의 섭식률

요각류의 먹이섭식능력감소가 먹이자체의 오염여부에 의한 것

**Table 1.** Diets used in this study

	Diet	Medium	Tank number
Polluted	D	FSW	1
	D + T	FSW	2
	D	CEWAF	3
	D + T	CEWAF	4
Non-polluted	D	FSW	5
	D + T	FSW	6
	T	FSW	7

D: Adhesive diatoms; T, *Tetraselmis suecica*; FSW, filtered clean sea water; CEWAF, chemically enhanced water-accommodated fraction

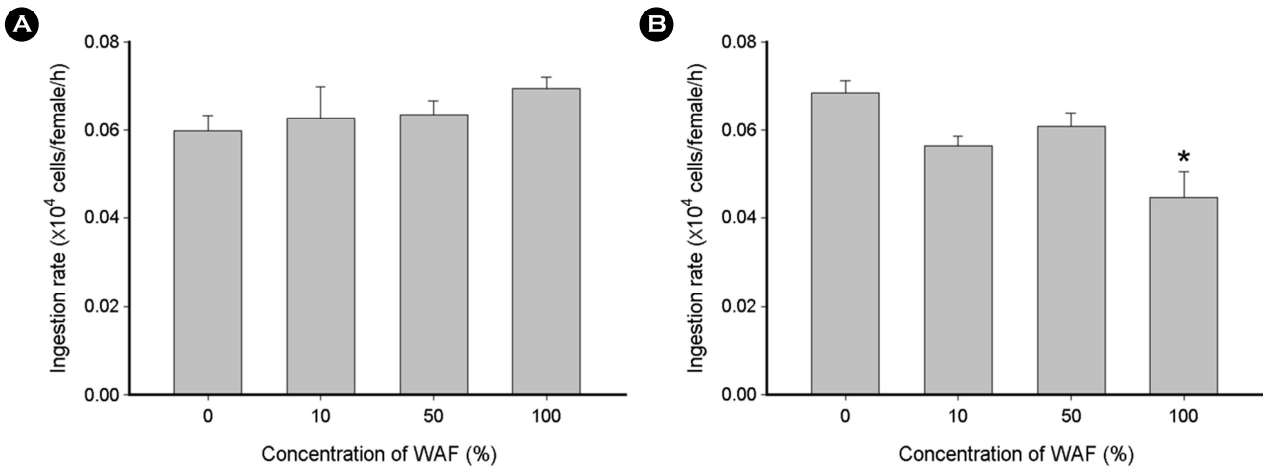
인지, 아니면 배양수 자체의 오염에 의한 것인지를 증명하기 위한 섭식 실험을 하였다. 실험은 크게 배양수 내에 WAF가 포함된 것과 포함되지 않은 것으로 구분하였고, 각각 먹이의 오염정도를 달리하여 실시하였다. 6 wells culture plate(배양수: 10 ml, 먹이 포함)에 well 당 24시간 동안 굵긴 성체 암컷 20개체를 넣고 수온 20°C, 염분 32~33 psu 및 암조건에서, WAF 농도별로 24시간 동안 노출된 *Te. suecica*를 4×10<sup>4</sup> cells/ml로 공급하였다. 배양수 내에 WAF가 없는 실험구는 *T. japonicus*에 공급하기 전, *Te. suecica*를 3회 세척(원심분리)한 후, 여과해수에 재 수용한 다음 먹이로 공급하였다. 24시간 후 *Te. suecica* 농도변화를 hemacytometer를 이용하여 측정하였다.

#### 1.3. *Tetraselmis suecica*의 배양

먹이로 사용된 *Te. suecica*는 수온 18~23°C, 염분 33~34 psu 및 조도 4,000 lx(광주기 12L:12D)의 조건에서 f/2 배지를 공급하여 배양하였다. 배양수는 자연해수를 여과(1 µm)한 것으로 멸균기(autoclave)를 사용하여 멸균 후 사용하였다.

### 2. CEWAF에 오염된 먹이에 대한 *T. japonicus*의 섭식률

5 ℓ 사각수조(배양수: 4 ℓ)에 약 10,000개체의 *T. japonicus*(C4~성체)를 수용하고 수온 20°C, 염분 32~33 psu 및 암조건에서 48시간 동안 배양하였다. 먹이는 CEWAF에 오염된 먹이와 오염되지 않은 먹이로 나누어 공급하였으며 실험구는 Table 1에 표시하였다. 실험먹이로 *Te. suecica*와 부착규조류를 사용하였는데, 부착규조류는 4×17×0.5 cm의 아크릴부착기판을 수용하는 해양 부착 미소생물 배양장치(Baek et al., 2012)를 이용하여 배양한 다음, 9일 동안



**Fig. 1.** Ingestion rates of adult female *Tigriopus japonicus* for *Tetraselmis suecica* exposed at different concentrations (%) of WAF in the conditions of the medium without WAF (A) and with WAF (B).

20% CEWAF에 노출시킨 후 실험먹이로 사용하였다. *Te. suecica*는 100% CEWAF에 24시간 동안 노출시킨 다음 공급하였는데, 배양수 내에 CEWAF가 없는 실험구는 *T. japonicus*에 공급하기 전, *Te. suecica*를 3회 세척(원심분리)한 후, 여과해수에 재 수용한 다음  $17 \mu\text{g chl a/l}$  ( $4 \times 10^4$  cells/ml)를 초기 실험먹이로 공급하였다. 48시간 배양 후, 수조 내 남아 있는 부착규조류와 *Te. suecica*의 Chlorophyll a 변화량을 측정하여 *T. japonicus* 섭식량 계산에 사용하였다.

### 3. 데이터 분석

*T. japonicus*의 섭식을 결과의 통계분석을 위해 One-way ANOVA test를 실시하였으며, 처리평균간의 유의성( $p < 0.05$ )은 Duncan의 다중검정법(Duncan's multiple range test)으로 분석하였다. 모든 통계 분석은 SPSS Version 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하여 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. WAF에 오염된 먹이에 대한 *T. japonicus*의 섭식률

WAF가 없는 배양수 조건에서는 모든 실험구에서 섭식량의 차이를 보이지 않았지만 WAF가 배양수에 있는 조건에서는 WAF의 농도가 증가할수록 섭식량이 줄어드는 경향을 보여 WAF 100% 농도에서는 대조구에 비해 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ; Fig. 1). 이러한 섭식량의 감소결과는 100% WAF에 의한 요각류의 폐사개체 발생이 원인이 될 수 있으나 모든 실험구에서 폐사개체는 확인되지 않았으며 이것은 Lee et al. (2013)의 연구에서 확인된 바 있

다. 결과적으로, *T. japonicus*는 WAF에 오염된 *Te. suecica*를 잘 섭취하는 것으로 보아 먹이의 오염여부에 의한 선택성의 문제는 배제할 수 있으며 오히려 섭식량의 감소는 배양수 내의 WAF에 기인된 것으로 판단된다. 예를 들면, 저서성 요각류인 *T. brevicornis*와 부유성 calanoid 요각류인 *Calanus helgolandicus*, *Pseudocalanus elongatus* 및 *Centropages hamaus*는 유류에 노출된 뒤 다시 오염되지 않은 새로운 해수에 노출되었을 때, 감소되었던 먹이 섭식률이 다시 회복하는 것으로 알려져 있다(Spooner and Corkett, 1979; Cowles and Remillard, 1983). WAF 내의 석유계 탄화수소(petroleum hydrocarbon)는 해양 요각류에 노출되었을 경우, 그들의 섭식과 번식에 영향을 미치는데, 유류입자를 직접 섭취하거나 체벽을 통한 탄화수소의 흡수가 그 원인으로 알려져 있다(Cowles, 1983).

### 2. CEWAF에 오염된 먹이에 대한 *T. japonicus*의 섭식률

*T. japonicus*가 CEWAF에 오염된 환경에서 먹이의 종류에 따른 먹이선택성여부를 조사한 결과, 오염된 먹이를 공급했을 때, 배양수에 CEWAF가 존재하는 상태에서, 먹이로 *Te. suecica*를 공급한 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 낮은 부착규조류 섭식률을 보였다( $p < 0.05$ ). 이때, *Te. suecica*의 섭식량도 CEWAF에 오염되지 않은 배양수 실험구에 비해 감소하였으나 통계적인 차이는 없었다( $p > 0.05$ ; Fig. 2A). 한편, 오염되지 않은 먹이를 공급한 경우, 섭식률은 모든 실험구에서 차이를 보이지 않았다( $p > 0.05$ ; Fig. 2B). 따라서 *T. japonicus*는 오염원이 없는 조건에서 먹이에 대한 선택성은 없는 것으로 나타났다. 그러나 CEWAF에 배양수가 오염된 경우는 먹이로 *Te. suecica*가 공존할 때 부착규조류의 섭식량이 줄어드는 것으로 보아 먹이선택성이 나타나는 것으로 판단된다. 이

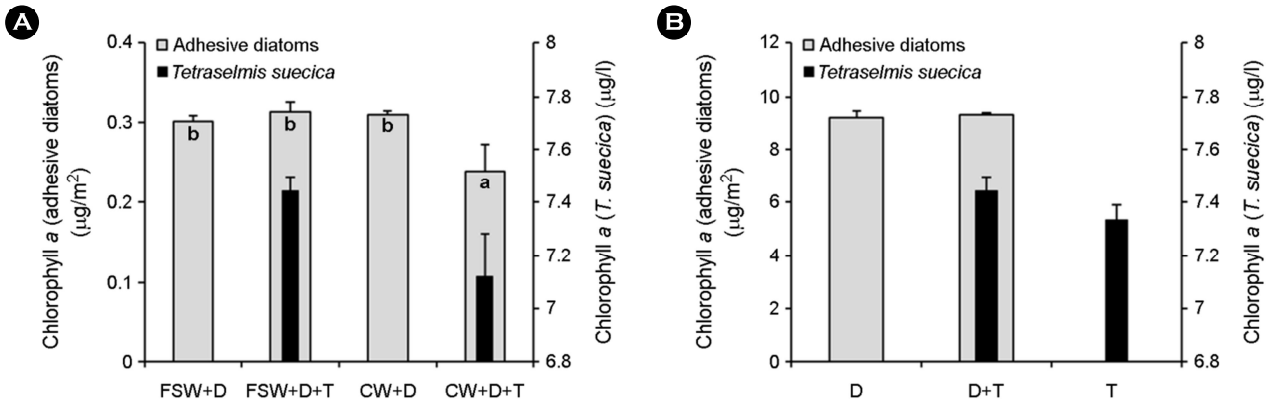


Fig. 2. Ingestion (chlorophyll a) of *Tigriopus japonicus* (C4~adult) on the different diets and culture conditions. (A) polluted diets, (B) non-polluted diets.

러한 이유는 CEWAF에 의한 chemoreceptor의 교란이나 신경계의 마비 등으로 인한 먹이 인식의 기능저하(Cowles, 1983)로, 운동성이 적은 부착규조류보다는 운동성이 상대적으로 큰 *Te. suecica*를 우선적으로 인식하여 섭취한 결과로 추측할 수 있다. 차후 이것을 증명할 세밀한 연구가 이루어 질 필요가 있을 것으로 판단된다. 이러한 현상을 유발하는 CEWAF 내의 원인물질로 PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons)를 들 수 있는데, 일반적으로 PAHs는 유류의 구성성분 중 가장 독성이 강하며 생물에 대해 유전독성, 암발생 및 번식에 영향을 미친다(Pane et al., 2005). 특히, 유류 내의 PAHs가 다양한 요각류(*Acartia pacifica*, *Acartia spinicauda*, *Calanopia thompsoni*, *Calanus sinicus*, *Centropages dorsispinatus*, *Eucalanus subcrassus*, *Euchaeta concinna*, *Euchaeta marina*, *Harpacticus uniremis*, *Labidocera euchaeta*, *Paracalanus aculeatus*, *Paracalanus parvus*, *Sinocalanus tenellus*, *Tortanus spinicaudatus* and *Tortanus vermiculus*)의 유영력 저하, 불안정성, 균형상실, 무호흡성 혼수상태 및 폐사와 같은 악영향의 원인물질로 알려져 있다(Jiang et al., 2012). 따라서 본 연구에서 CEWAF에 노출된 *T. japonicus*의 먹이선택성은 유류 내 PAHs의 영향에 의한 것으로 추측할 수 있다.

본 실험을 종합하여 보면, 유류오염에 의한 *T. japonicus*의 먹이 섭취력의 감소는 오염된 먹이를 회피하는 것에 의한 섭취력의 감소가 아니라 해수에 존재하는 유류독성에 의한 것으로 나타났으며, 이러한 독성은 *T. japonicus*의 활성능력을 저하시켜, 먹이섭식 및 먹이선택에도 영향을 미칠 수 있는 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Baek SH, Son M, Jung SW, Kang JH, Kim YO, Shim WJ. 2012. The development of monitoring method of attached micro-algae using artificial substrates in coastal water - ecological risk assessments for oil pollutant. Korean J Environ Biol 30: 71-76.
- Bechmann RK, Larsen BK, Taban IC, Hellgren LI, Moller P, Sanni S. 2010. Chronic exposure of adults and embryos of *Pandalus borealis* to oil causes PAH accumulation, initiation of biomarker responses and an increase in larval mortality. Mar Pollut Bull 60: 2087-2098.
- Cowles TJ. 1983. Effects of exposure to sublethal concentrations of crude-oil on the copepod *Centropages hamatus*. 2. Activity Patterns Mar Biol 78: 53-57.
- Cowles TJ, Remillard JF. 1983. Effects of exposure to sublethal concentrations of crude-oil on the copepod *Centropages hamatus*. 1. Feeding and egg production. Mar Biol 78: 45-51.
- George-Ares A, Clark JR. 2000. Aquatic toxicity of two Corexit(R) dispersants. Chemosphere 40: 897-906.
- Hansen BH, Altin D, Olsen AJ, Nordtug T. 2012. Acute toxicity of naturally and chemically dispersed oil on the filter-feeding copepod *Calanus finmarchicus*. Ecotoxicol Environ Saf 86: 38-46.
- Hansen BH, Nordtug T, Altin D, Booth A, Hessen KM, Olsen AJ. 2009. Gene expression of GST and CYP330A1 in lipid-rich and lipid-poor female *Calanus finmarchicus* (Copepoda: Crustacea) exposed to dispersed oil. J Toxicol Environ Health, Part A 72: 131-139.
- Jung JH, Yim UH, Han GM, Shim WJ. 2009. Biochemical changes in rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to dispersed crude oil. Comp Biochem Physiol C 150: 218-223.
- Kusk KO, Wollenberger L. 2007. Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. Ecotoxicology 16: 183-195.

- Kwok KWH, Leung KMY. 2005. Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): Effects of temperature and salinity. *Mar Pollut Bull* 51: 830-837.
- Lee KW, Raisuddin S, Hwang DS, Park HG, Dahms HU, Ahn IY, Lee JS. 2008. Two-generation toxicity study on the copepod model species *Tigriopus japonicus*. *Chemosphere* 72: 1359-1365.
- Lee KW, Shim WJ, Yim UH, Kang JH. 2013. Acute and chronic toxicity study of the water accommodated fraction (WAF), chemically enhanced WAF (CEWAF) of crude oil and dispersant in the rock pool copepod *Tigriopus japonicus*. *Chemosphere* 92: 1161-1168.
- Lyons MC, Wong DKH, Mulder I, Lee K, Burrige LE. 2011. The influence of water temperature on induced liver EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to crude oil and oil dispersants. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 904-910.
- Nordtug T, Olsen AJ, Altin D, Overrein I, Storøy W, Hansen BH, Laender FD. 2011. Oil droplets do not affect assimilation and survival probability of first feeding larvae of North-East Arctic cod. *Sci Total Environ* 412-413: 148-153.
- Ohman MD, Hirche HJ. 2001. Density-dependent mortality in an oceanic copepod population. *Nature* 412: 638-641.
- Pane L, Boccardo S, Bonfiglioli F, Mariottini GL, Priano F, Conio O. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, seston and copepods in a harbour area in the Western Mediterranean (Ligurian Sea). *Mar Ecol-Evol Persp* 26: 89-99.
- Raisuddin S, Kwok KWH, Leung KMY, Schlenk D, Lee JS. 2007. The copepod *Tigriopus*. A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat Toxicol* 83: 161-173.
- Singer MM, Aurand D, Bragin GE, Clark JR, Coelho GM, Sowby ML, Tjeerdema RS. 2000. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. *Mar Pollut Bull* 40: 1007-1016.
- Spooner MF, Corkett CJ. 1979. Effects of Kuwait oils on feeding rates of copepods. *Mar Pollut Bull* 10: 197-202.
- Tiehm A. 1994. Degradation of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons in the Presence of Synthetic Surfactants. *Appl Environ Microb* 60: 258-263.