

동근성게(*Mesocentrotus nudus*)와 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 수정 및 정상 배아발생률을 이용한 Phenanthrene의 독성영향

최 훈^{1,2}, 이주욱¹, 박윤호¹, 이승민¹, 최윤석¹, 허 승¹, 황운기^{1,*}

¹국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해평가센터, ²국립인천대학교 생명과학과

Toxic effects of phenanthrene on fertilization and normal embryogenesis rates of *Mesocentrotus nudus* and *Hemicentrotus pulcherrimus*

Hoon Choi^{1,2}, Ju-Wook Lee¹, Yun-Ho Park¹, Seung-Min Lee¹, Yoon-Seok Choi¹, Seung Heo¹ and Un-Ki Hwang^{1,*}

¹Marine Ecological Risk Assessment Center, West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science (NIFS), Incheon 22383, Republic of Korea

²Department of Life Science, Incheon National University, Incheon 22012, Republic of Korea

*Corresponding author

Un-Ki Hwang
Tel. 032-745-0680
Fax. 032-745-0686
E-mail : vngi1@korea.kr

Received: 9 June 2020

Revised: 15 July 2020

Revision accepted: 20 July 2020

Abstract: The aim of this study was to define the toxic effects of phenanthrene (PAHs) on the fertilization and normal embryogenesis rates in the two species of sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus* and *Mesocentrotus nudus*). The sperm and fertilized eggs of both sea urchin species were exposed to serial dilutions of phenanthrene for 10 min and 48 hours, respectively. The fertilization rate and normal embryogenesis rate of *H. pulcherrimus* and *M. nudus* were decreased in a concentration-dependent manner. The EC₅₀ for the fertilization rate of *H. pulcherrimus* and *M. nudus* was 17.48 mg L⁻¹ and 16.21 mg L⁻¹, and the EC₅₀ for the normal embryogenesis rate was 2.99 mg L⁻¹ and 0.36 mg L⁻¹, respectively. Between the two species, *H. pulcherrimus* was more sensitive to phenanthrene exposure, and 48 h normal embryogenesis was the more sensitive endpoint. Therefore, the results of this study demonstrated that the exposure of both sea urchin species to phenanthrene caused alterations in egg fertilization and the early developmental stages.

Keywords: phenanthrene, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Mesocentrotus nudus*, toxicity test

서 론

Phenanthrene과 같은 다환방향족탄화수소류 (Polycyclic

Aromatic Hydrocarbons; PAHs)는 일반적으로 2환 이상의 벤젠 고리로 구성된 화합물의 총칭으로, 유기물질의 불완전 연소에 의하여 주로 발생하며, 자연적으로는 식물과 미

생물의 대사 및 화산활동에 의하여 생성되고, 인위적으로는 자동차 배기가스, 주거난방시설, 소각장과 발전소 및 유류의 사용 과정 등에서 생성된다(Beak *et al.* 1991; Park *et al.* 2009). PAHs는 환경 내의 주요한 오염물질로서, 생물에게 노출되었을 때 돌연변이 및 발암 등을 유발하기 때문에, 2001년 5월 채택된 스톡홀름 협약에서 잔류성 유기오염물질(Persistent Organic Pollutants; POPs) 중의 한 그룹으로 논의된 바 있으며(UNEP 2003), 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer; IARC)에서 Group 1(인체발암물질)로 지정한 바 있다. 또한, PAHs에는 200여 종의 이성질체가 존재하며, 환경 내에서 주로 검출되는 2환에서 6환까지의 16종(2환: Naphthalene, 3환: Acenaphthylene, acenaphthene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, 4환: Fluoranthene, Pyrene, Benz[a]anthracene, 5환: Chrysene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Dibenz[a,h]anthracene, 6환: Indeno[1,2,3-c,d]pyrene, Benzo[g,h,i]perylene)의 경우, 미국 환경보호청(US-EPA)에서 우선관리 대상물질로 지정하여 모니터링하고 있다(Macias-Zamora *et al.* 2002; Lee *et al.* 2019; Honda and Suzuki 2020).

환경 중으로 배출된 PAHs는 기체 또는 분진에 흡착되어 대기 중으로 쉽게 확산되며, 대기 중의 PAHs는 해수면을 통하여 해양으로 직접 유입되거나, 토양에 침적되어 강우시에 하천을 통하여 해양에 유입된다. 또한, 도시화 및 산업화에 의하여 형성된 하수종말처리장으로부터 많은 양의 PAHs가 점 오염원의 형태로 해양에 유입되기도 한다(Nikolaou 1984; Botello *et al.* 1998; Latimer and Zheng 2003; Kanaki *et al.* 2007; Lim *et al.* 2007; Qiu *et al.* 2009; Chen and Chen 2011; Castro-Jiménez *et al.* 2012). 해양으로 유입된 PAHs는 물에 대한 용해도가 낮고, 난분해성으로 비극성인 특징으로 인하여, 연안 및 기수 역의 저질과 저질 내 유기물에 잔류·축적되어 지속적으로 증가하여 저서생태계에 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Berardescok *et al.* 1998; Bartlett *et al.* 2000; Sung *et al.* 2014).

Phenanthrene은 3환의 저분자량 PAHs로, 4개 미만의 탄소고리 이루어진 저분자량 다환방향족탄화수소류(Low molecular weight PAHs; LPAHs)로, 수용해도가 크고 입자친화력이 작으며, 생물에게 유전독성 및 발암성을 포함하여 생물에게 급·만성독성을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한, Phenanthrene은 해양환경 내에서 다른 PAHs보다

고농도로 존재하는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.* 2003; Sung *et al.* 2014; Honda and Suzuki 2020). 하지만, 연안서식생물 중 무척추동물인 성게에 미치는 영향에 대한 연구는 전무한 수준이다. 또한, Phenanthrene의 해양 유입은 해수와 퇴적물 같은 환경 중의 농도 증가와 더불어 수산생물 체내 축적되어, 수산생물을 이용하는 인류의 보건과도 밀접한 연관을 지니고 있기에 시급한 연구가 필요한 실정이다.

성게류는 전 세계 연안 역에서 흔히 볼 수 있는 수산생물로, 산란 유도를 통한 생식세포의 획득으로 인공수정을 통한 수정 및 배아 발생 과정을 손쉽게 관찰할 수 있는 유용한 시험생물이다. 또한, 초기 배아 발생 과정에서 난할의 분할 및 유생의 골격 형성 등을 쉽게 관찰할 수 있어서 오염물질에 대한 생태위해성을 판단할 수 있는 시험생물로도 널리 이용되고 있다(Jackim and Nacci 1986; Hwang *et al.* 2014). 또한, 성게의 수정률과 정상 배아 발생률은 해양 환경으로 유입되는 오염물질 등에 대한 위해성을 짧은 시간에 판단할 수 있을 뿐만 아니라, 급성과 만성독성을 동시에 평가할 수 있는 장점을 지니고 있다(Kobayashi 1980; Greenwood 1983; Pagano *et al.* 1989; Hwang *et al.* 2020).

본 연구에서는 해양 생태계 내 1차 소비자를 대표하는 둥근성게(*Mesocentrotus nudus*)와 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 수정과 정상 배아발달에 미치는 Phenanthrene의 영향을 조사하였으며, 반수영향농도(50% Effects concentration; EC₅₀), 무영향농도(No observed effective concentration; NOEC) 및 최소영향농도(Lowest observed effective concentration; LOEC) 등을 산출하여 Phenanthrene의 해양환경 기준농도 설정을 위한 귀중한 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시험생물

시험생물인 둥근성게(*Mesocentrotus nudus*)와 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)는 현장에서 채집하여 사용하였다. 둥근성게는 2019년 7월 충청남도 태안군 모항리 연안(36°46'38"N, 126°07'26"E)에서, 말뚝성게는 2020년 2월에 전라북도 부안군 격포리 연안(35°38'04"N, 126°27'41"E)에서 채집하였다. 채집한 시험생물은 저온상태에서 이송하여, 자연채광 상태의 유수식 수조에서 15±

Table 1. Information on phenanthrene used in this study

Toxicants	Species	Linear formula	CAS no.	Endpoint	Target concentration (mg L ⁻¹)	Manufacturer
Phenanthrene	<i>Mesocentrotus nudus</i>	C ₁₄ H ₁₀	85-01-8	10 min Fertilization rate (%)	0-100	Sigma-aldrich (USA)
				48 h Normal embryogenesis rate (%)	0-20	
	10 min Fertilization rate (%)			0-50		
	64 h Normal embryogenesis rate (%)			0-2.5		

1°C로 순치한 후 시험에 사용하였다. 배양액은 자연해수를 membrane filter (pore size 0.45 µm)로 여과하여 사용하였다.

2. 생식세포 획득

*M. nudus*의 경우 직경 10 cm, *H. pulcherrimus*는 직경 3.5 cm 이상으로 충분히 성장한 개체, 각 6마리 이상을 선별하여 사용하였다. 선별된 성체의 표면을 해수로 세척하여 성체 표면의 이물질을 제거한 후, 체강 내에 0.5 M KCl 용액 1 mL을 주입시켜 생식세포의 방란 및 방정을 유도한 후, 배양액이 담긴 비이커에 생식공이 충분히 잠기도록 담구어 정자 및 난자를 포집하였다. 수집한 생식세포 중에서 정자는 1회, 난자는 3회 이상 충분히 세정한 후에 시험에 사용하였다.

3. 시험용액 조성

본 시험에 사용된 Phenanthrene (C₁₄H₁₀, Cas No. 85-01-8)의 시험농도 범위는 예비실험을 통하여 설정되었다. 모든 시험간 대조군은 0.45 µm membrane filter로 여과된 자연해수를 사용하였으며, 시험용액농도 조성을 위해, DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma-aldrich, USA)를 carrier solution으로 사용하여, 고농도의 stock solution을 제작한 뒤 0.45 µm membrane filter로 여과된 자연해수를 희석하여 사용하였다. 이때 시험생물에게 노출되는 DMSO의 최종농도는 NOEC 값인 0.1% 이하로 노출되도록 조성하였다 (Manzo *et al.* 2006). 시험물질의 기본정보 및 종말점별 시험농도는 Table 1과 같다.

4. 수정률 및 정상유생 발생률

수정률의 경우 6 well plate에 시험용액을 농도별로 10 mL씩 4반복으로 분주한 뒤, 시험용액당 1 µL의 정자를 분주하여 노출시켰다. 30 min 동안 노출시킨 후, 정자가 주입된 시험용액에 100~150개의 난자를 넣고, 10 min 뒤 수정막의 형성 유·무로 수정률을 판단하였다.

정상유생 발생률의 경우 6 well plate에 시험용액을 농도별로 10 mL씩 4반복으로 분주하였다. 시험용액당 수정란은 mL당 10~15개씩 넣어주었다. 이 후 *M. nudus*는 20 ± 0.5°C로, *H. pulcherrimus*는 16 ± 0.5°C로 형광등을 이용하여 100 ± 10 µmol photons m² s⁻¹, 광주기 8 Light : 16 Dark하에서 배양하였다. 측정시기는 *M. nudus*와 *H. pulcherrimus*가 인공수정 후 pluteus 유생으로 발달 되는 시기인 48 h, 64 h에 각각 측정하여 정상유생 발생률을 측정하였다 (Hwang *et al.* 2014). 정상 유생발생은 4-armed pluteus stage 유생의 4개의 arm이 정상으로 발달하였는지의 유무로써 판단한다. 시험방법의 경우, 해양환경공정시험기준의 해양생물 공정시험기준 제 25항, 성체를 이용한 해양생태독성 시험방법에 의거하여 수행되었다 (Table 2).

5. 통계분석

대조군과 실험군의 유의성 검정은 SigmaPlot software (SigmaPlot 2001, SPSS Inc., USA)의 Student's t-test로 비교하였으며 *p*가 0.05 혹은 0.01 이하인 것을 유의한 것으로 판단하였다. 정상유생발생률에 대한 EC₅₀와 95% 신뢰구간 (95% Confidence Interval; 95% CI)은 Toxicalc 프로그램 (Toxicalc 5.0, Tidepool scientific software, USA)의 probit 통

Table 2. Experimental conditions for fertilization and normal embryogenesis rates of both sea urchin species (*Mesocentrotus nudus* and *Hemicentrotus pulcherrimus*)

Class	Condition
Endpoint	10 min Fertilization rate (both species) 48 h Normal embryogenesis rate (<i>M. nudus</i>) 64 h Normal embryogenesis rate (<i>H. pulcherrimus</i>)
Culture type	Static non-renewal
Photoperiod	Ambient light condition and 8 L : 16 D period
Temperature	20°C ± 0.5°C (<i>M. nudus</i>) 16°C ± 0.5°C (<i>H. pulcherrimus</i>)
Salinity	32 ± 1.0
pH	8.0 ± 0.5
Test-solution volume	10 mL (6 well plate)
Culture medium	Filtrated sea water (0.45 µm membrane filter)
Number of repeats	Over the 3 replicate
Initial fertilized egg density	10–15 Fertilized egg mL ⁻¹
Acceptability criterion	Over the 90% fertilized eggs and normal pluteus larva at control

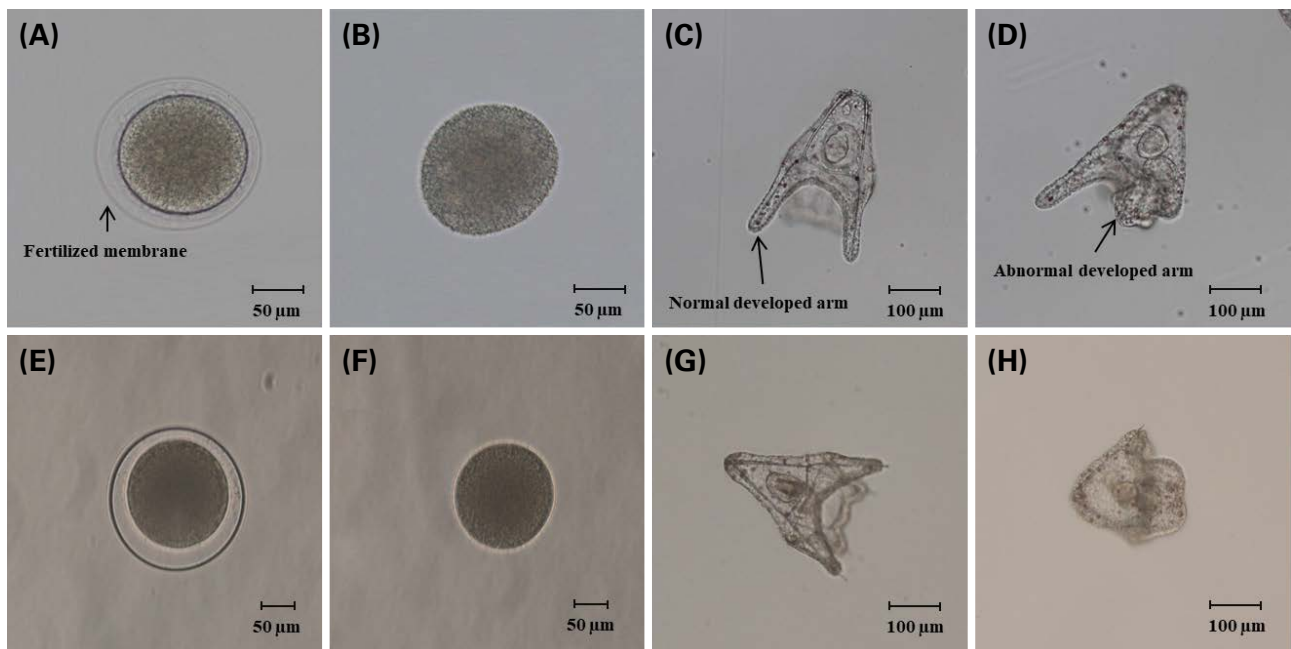


Fig. 1. Normal fertilized egg (A, E) and abnormal fertilized egg (B, F) of *Mesocentrotus nudus* and *Hemicentrotus pulcherrimus*, respectively. Normal and abnormal fertilized eggs were determined by the presence or absence of a fertilized membrane, which is indicated in (A). Normal and abnormal pluteus larva (C, G) and abnormally developed larva (D, H) of *M. nudus* and *H. pulcherrimus*, respectively. Normal and abnormal pluteus larva was determined by skeletogenesis, especially arm development.

계법을 이용하여 분석하였다. NOEC 및 LOEC는 Toxicalc 프로그램의 Dunnett's test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. Phenanthrene 노출에 따른 수정률의 변동

*M. nudus*와 *H. pulcherrimus*의 정자를 Phenanthrene 농

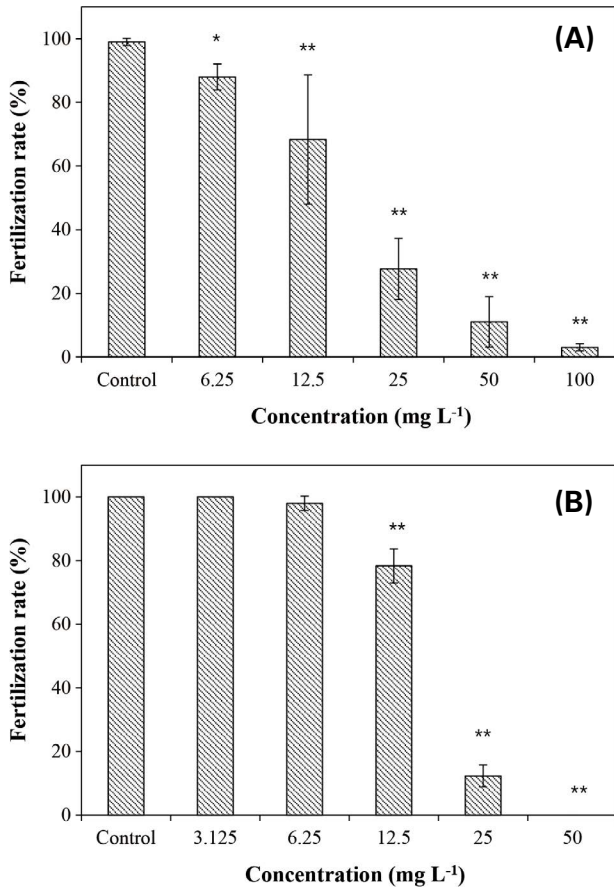


Fig. 2. Fertilization rate of *Mesocentrotus nudus* (A) and *Hemicentrotus pulcherrimus* (B) exposed to phenanthrene. The vertical bars represent the 95% CI of the mean (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

도 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg L⁻¹과 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 mg L⁻¹에 30 min 간 노출시킨 후, 각각 난자와 10 min 동안 수정한 결과를 관찰하였다 (Fig. 1A, B, E, F). Phenanthrene에 노출된 *M. nudus*와 *H. pulcherrimus*의 수정률은 농도가 높아짐에 따라, 농도 의존적인 감소를 나타냈다. *M. nudus*의 경우 대조구에서 수정률이 $99 \pm 1.49\%$ 로 나타났으나, 최소농도인 6.25 mg L⁻¹에서 $88.00 \pm 5.36\%$ 로 수정률의 감소가 관찰되었으며 ($p < 0.01$), 농도 의존적으로 감소해, 최고 농도인 100 mg L⁻¹에서는 $3.00 \pm 1.49\%$ 로 감소하였다 ($p < 0.01$) (Fig. 2A). *H. pulcherrimus*의 경우 대조구에서는 수정률이 100%로 나타났으나, 12.5 mg L⁻¹에서 $78.33 \pm 7.03\%$ 로 감소하였으며 ($p < 0.01$), 50 mg L⁻¹에서 수정률이 0%로 나타났다 (Fig. 2B).

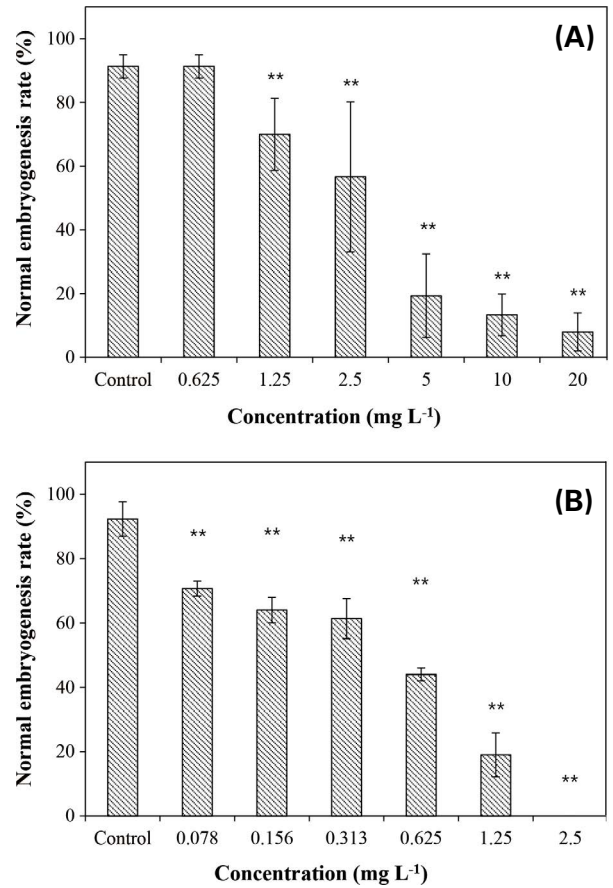


Fig. 3. Changes in the normal embryogenesis rate of *Mesocentrotus nudus* and *Hemicentrotus pulcherrimus* exposed to phenanthrene for 48 h and 64 h, respectively. All the points were significantly different from the control group according to the Student's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

2. Phenanthrene 노출에 따른 정상 배아발생률의 변동

*M. nudus*와 *H. pulcherrimus*의 정상 배아발생률에 미치는 Phenanthrene의 영향을 확인하기 위하여, 각각 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg L⁻¹과 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5 mg L⁻¹에 48 h과 64 h 동안 노출시킨 후, 정상 배아발생 결과를 관찰하여 백분율로 나타내었다 (Fig. 3). *M. nudus*의 경우, 대조구의 정상 배아발생률은 $91.33 \pm 4.78\%$ 로 나타났으나, 최소농도인 1.25 mg L⁻¹에서 $70 \pm 14.87\%$ 로 감소하였다 ($p < 0.01$). 정상 배아발생률은 Phenanthrene의 농도가 높아질수록 농도 의존적으로 감소하여, 최고농도인 20 mg L⁻¹에서는 $8.00 \pm 7.87\%$ 로 정상유생을 거의 관찰할 수 없었다 ($p < 0.01$) (Fig. 3A). *H. pulcherrimus*의 경우, 대조구의 정상 배아발생률은 $92.33 \pm 7.03\%$ 로 나타났으며, 0.078

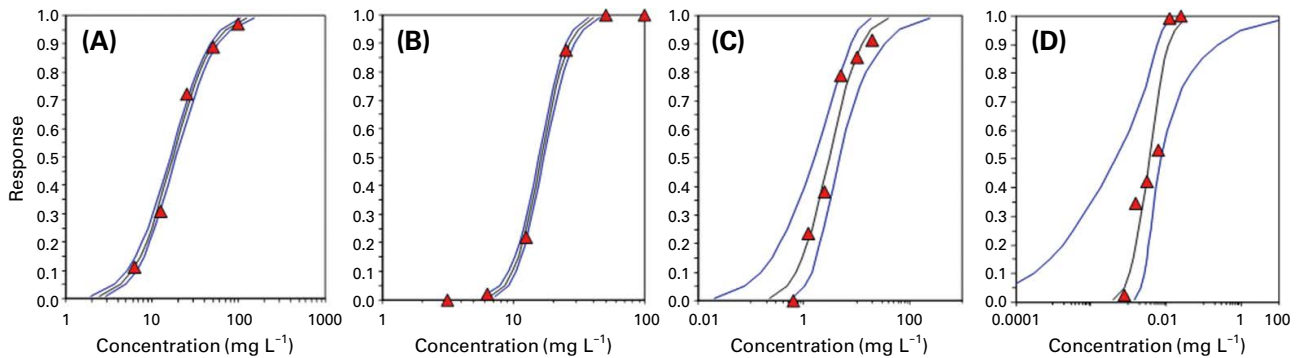


Fig. 4. Dose-response curve of Fertilization rate (A) and Normal embryogenesis rate (B) using *M. nudus* and *H. pulcherrimus* (C, D) exposed to phenanthrene.

mg L⁻¹부터 농도의존적으로 감소하기 시작해, 최고농도인 2.5 mg L⁻¹에서는 정상유생을 관찰할 수 없었다(Fig. 3B).

3. 독성값

Phenanthrene이 *M. nudus*와 *H. pulcherrimus*의 수정률과 정상 배아발생률에 미치는 독성 영향의 경우, Phenanthrene의 농도가 증가할수록 수정률과 정상 배아발생률이 농도 의존적으로 감소하는 sigmoid 곡선 형태를 나타냈다(Fig. 4). 수정률의 EC₅₀ 값은 각각 17.48 mg L⁻¹, 16.21 mg L⁻¹이었으며, 정상 배아발생률은 2.99 mg L⁻¹, 0.36 mg L⁻¹으로 나타나, 수정률과 정상 배아발생률 변동의 경우 정상 배아발생률이 더 민감한 지표인 것으로 나타났다.

*M. nudus*와 *H. pulcherrimus*의 수정률과 정상 배아발생률에 대한 Phenanthrene의 영향을 독성값으로 나타내면, 수정률에 대한 무영향농도(NOEC)는 각각 <6.25 mg L⁻¹와 6.25 mg L⁻¹으로 나타났으며, 최소영향농도(LOEC)는 각각 6.25 mg L⁻¹와 12.5 mg L⁻¹으로 나타났다. 또한, 정상 배아발생률에 대한 무영향농도는 0.63 mg L⁻¹와 <0.08 mg L⁻¹로 나타났으며, 최소영향농도는 1.25 mg L⁻¹과 0.08 mg L⁻¹로 나타났다(Table 3).

고 찰

연안환경에서 성체는 암반에 부착하여 생육하는 저서 생물로서, 퇴적물과 해수의 영향을 동시에 받을 수 있는 생물이다. 일반적으로, 둥근성게(*M. nudus*)는 조하대에서, 말뚝성게(*H. pulcherrimus*)는 조간대에서 생육하는 무척추동물로서, 생태학적으로 1차 소비자의 역할을 담당하

는 것으로 알려져 있다(Hwang *et al.* 2011). 본 연구에서는 Phenanthrene의 독성학적 영향의 규명을 위하여, 두 종 성체의 초기생활사에 해당하는 수정률과 정상배아 발생률을 이용하여 독성값을 조사하였다. 반수영향농도(EC₅₀)를 기준으로 정상배아발생률은 수정률에 비하여 민감하게 나타났으며, 이는 분화 정도가 진전된 pluteus 유생시기가 독성이 증폭되어 표현되기 때문이다(Hwang *et al.* 2008, 2009). 또한, *H. pulcherrimus*가 *M. nudus*보다 독성에 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 이는, 일반적으로 같은 종이라 할지라도 환경·생태학적인 특이성에 의하여 차이를 나타낼 수 있기에(Yu 1998), 직접적인 이유를 확인하기 어렵다. 하지만, 두 성계종의 초기배아단계의 생육 적정수온의 경우, *H. pulcherrimus*는 16°C이며, *M. nudus*는 20°C로 차이가 존재하고, 수정란에서 pluteus 유생으로 발달하는 데 필요한 시간도 각 64h, 48h로 차이가 존재한다. 두 생물 간의 민감도 차이는, 이러한 생리·생태학적 특징을 기반으로 작성된 시험법의 차이에서 기인하는 것으로 사료된다.

성체와 연안에 서식하는 생물 종의 독성 민감성을 비교하기 위하여, US-EPA의 ECOTOX 데이터베이스에 등록된 생물종의 EC₅₀값을 비교해 본 결과, 녹조류, 규조류, 해산 로티퍼, 풍년새우, 다모류, 이매패류, 어류(*S. capricornutum*, *S. costatum*, *N. palea*, *B. plicatilis*, *A. salina*, *N. arenaceodentata*, *M. galloprovincialis*, *C. variegatus*)를 포함한 7종에게 미치는 Phenanthrene의 EC₅₀값은 0.05~136.13 mg L⁻¹으로 나타난 바 있다. 연안환경에서 다양한 생태적 지위를 가진 생물 종과의 비교를 통해서, *M. nudus* (2.99 mg L⁻¹)와 *H. pulcherrimus* (0.36 mg L⁻¹)의 배아발생률 시험은 비교적 민감한 것으로 나타났다. 특히, *H. pulcherrimus*의 배아 발생률 시험은 *M. galloprovincialis*를 제외한 모든 시험보다 민

Table 3. Toxicity evaluation using fertilization and normal embryogenesis rates in both sea urchins compared to other organisms commonly used in aquatic toxicity testing

Toxicant	Group / Common name	Species	Endpoint	Toxicity value (mg L ⁻¹)					Reference	
				NOEC	LOEC	EC ₅₀	95% CI			
Phenanthrene	Echinoidea / Sea urchin	<i>Mesocentrotus nudus</i>	10 min Fertilization rate (%)	<6.25	6.250	17.48	1.913		Present study	
			48 h Normal embryogenesis rate (%)	0.63	1.250	2.99	0.526			
		<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	10 min Fertilization rate (%)	6.25	12.500	16.21	0.307			
			64 h Normal embryogenesis rate (%)	<0.08	0.078	0.36	0.035			
		<i>Paracentrotus lividus</i>	48 h Normal development (%)	-	1800-7180	>2400 nM	-			Bellas <i>et al.</i> 2008
		<i>Skeletonema costatum</i>	96 h Population growth rate (r)	25	50	136.13	85.90-198.28			Lee <i>et al.</i> 2019
Heterokonta / Diatom		<i>Selenastrum capricornutum</i>	4 h ¹⁴ C assimilation reduction rate (%)	-	-	0.94	0.72-1.42		Millemann <i>et al.</i> 1984	
			4 h ¹⁴ C assimilation reduction rate (%)	-	-	0.87	0.71-1.16			
		<i>Nitzschia palea</i>	24 h Survival rate (%)	-	-	-	-			
			72 h Population growth rates (r)	18.80	375	63.7	48.4-84.5			Hwang <i>et al.</i> 2017
Rotifera / Marine rotifer	<i>Brachionus plicatilis</i>	24 h Survival rate (%)	-	-	0.68	-		Abernethy <i>et al.</i> 1986		
		96 h Survival rate (%)	-	-	0.6	-		Rossi and Neff 1978; Sung <i>et al.</i> 2014		
Arthropoda / Sea monkey	<i>Artemia salina</i>	48 h Embryonic development (%)	0.013	0.033	0.043-0.144	-		Bellas <i>et al.</i> 2008; Sung <i>et al.</i> 2014		
		96 h Embryonic development (%)	-	-	0.478	-		Moreau <i>et al.</i> 1999		

감한 것으로 나타나, Phenanthrene의 생태학적 영향을 구명하기 위한 시험생물로 적합한 것으로 판단된다.

Phenanthrene의 독성은 생물 체내 지질함량과 Phenanthrene의 K_{ow} (분배계수)에 의존적이며, 지질 내에 축적된 Phenanthrene의 농도가 임계값(threshold) 이상이 되면 사망 등의 영향이 나타나는 것으로 알려져 있어, Phenanthrene의 영향이 다양하게 나타나는 것은 생물 체내 지질함량도 원인이 될 수 있을 것으로 판단된다(Di Toro *et al.* 2000; Sung *et al.* 2014). 다양한 QSAR 예측모델 중, Di Toro *et al.* (2000)이 제안한 TLM (Target Lipid Model)을 따르면, Phenanthrene이 생물체에 미치는 독성영향은 생물의 종류와 상관없이 지질함량과 Phenanthrene의 K_{ow} 값에 의존적이며, 이때 지질 내에 축적된 Phenanthrene의 농도가 임계값(threshold) 이상이 되면 사망 등의 영향이 나타나는 것으로 알려져 있다. 연안에서 서식하는 다양한 생물 종의 EC_{50} 값을 비교해보면(Table 3), 독성영향의 정도가 다양하게 나타나는 것으로 보이며, 일부 생물의 경우 체내 지질양이 지나치게 낮아, 생물체 내 해당 물질의 영향이 반영되기 힘들어 생긴 현상이라 사료된다(Veith *et al.* 1983; Di Toro *et al.* 2000; Sung *et al.* 2014). 하지만, *H. pulcherrimus*와 *M. nudus*의 정상 배아발생률시험은 Phenanthrene에 노출되었을 때, 다른생물종과 비교해 민감하게 반응하여, 조건대와 조하대를 포함하는 연안환경내에서 유해물질의 환경영향을 평가하는 시험생물로 이용가치가 높을 것으로 보인다.

일반적으로, Phenanthrene은 미국환경보호청(US Environmental Protection Agency; US-EPA)에서 선정한 16개의 우선관리 PAH를 대상으로 하는 Σ_{16} PAHs 중점적으로 조사되어있다. 하지만, 연안환경 인근에 주로 위치하고 있는 화력발전소 및 석유제품에서 발생되는 PAHs는, 주로 1~3환(탄소고리)의 LPAHs이며(Budzinski *et al.* 1997; Wu *et al.* 2003), 실제로 우리나라 울산연안 하천에서 총 PAHs 대비 LPAHs는 갈수기에는 72.5~93.8% (평균 86.3%), 강수기에는 70.9~91.9% (평균 86.7%)를 차지한다는 보고도 있다(You *et al.* 2012). 또한, 프랑스, 포르투갈 연안역 퇴적물 내 PAHs 농도는, LPAHs, 특히 Phenanthrene의 농도가 가장 높게 나타난 바 있다(Jung *et al.* 2004; Cachot *et al.* 2006; Serafim *et al.* 2013). 이에 16개의 우선관리 PAHs 중에서도 환경 내 Phenanthrene의 영향이 가장 우려되는 상황이다. 국내의 경우 지속적인 연구를 통해 퇴적물과 표

층해수 내 Phenanthrene의 농도분포가 조사되어 왔으며, 퇴적물의 경우 부산 광안리 해변에서 0.02~0.06 mg kg⁻¹, 광양만 유역 21개지점 지점에서 0.01~0.68 mg kg⁻¹ (평균 0.12 mg kg⁻¹)으로 보고된 바 있다(Chung *et al.* 2004; Lee 2018). 또한, 해수의 경우 국내 목포연안의 표층해수 내에 Phenanthrene의 농도가 2.31~5.92 ng L⁻¹로 보고된 바 있다(Moon *et al.* 2007). 일부 조사지점의 Phenanthrene 농도는, 본 연구결과에서 제시된 *H. pulcherrimus*의 정상 배아발생률의 LOEC값(0.078 mg L⁻¹)보다 높게 나타나, 환경 내에서 초기발생단계에서 영향을 받을 우려가 있다. 또한, 퇴적물 환경 내에서 Phenanthrene 분자의 반감기는 최대 126 일로 알려져 있어, 연안역 퇴적물에 침적될 경우 저서생물을 비롯한 다양한 생물에게 치명적인 영향을 미칠 수 있다(Karcher 1988; Kanaly and Harayama 2000; Johnsen *et al.* 2005; Haritash and Kaushik 2009).

Phenanthrene과 같은 유해물질에 대한 생태학적 영향은 생물종, 노출기간, 수온 등을 포함하는 시험법의 차이로 영향 정도가 다양하게 나타날 수 있지만, 두 종 성체를 이용하는 시험법은 이들 물질의 생태학적 영향을 평가하기에 적절한 것으로 판단된다. 본 연구결과를 통해서, 얻어진 NOEC, LOEC 및 EC_{50} 의 독성값은 Phenanthrene을 포함한 PAHs의 환경 기준농도를 설정하기 위한 유용한 기초 자료로 활용될 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 다환방향족탄화수소(PAHs) 중, phenanthrene이 둥근성게(*Mesocentrotus nudus*)와 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 수정률과 정상유생 발생률에 미치는 독성 효과를 확인하고자 하였다. *H. pulcherrimus*와 *M. nudus*의 모체에서 각각 획득한 정자와, 인공수정을 통하여 획득된 수정란을 phenanthrene에 노출시킨 후, 수정률과 정상배아 발생률을 측정하였다. 시험결과, *H. pulcherrimus*와 *M. nudus*의 수정률과 정상배아 발생률은, 농도 의존적으로 감소하였으며, *H. pulcherrimus*와 *M. nudus*의 수정률에 대한 EC_{50} 값은 17.48 mg L⁻¹과 16.21 mg L⁻¹이었고, 정상배아 발생률의 EC_{50} 값은 각각 2.99 mg L⁻¹과 0.36 mg L⁻¹인 것으로 나타났다. 연구결과, *H. pulcherrimus*는 *M. nudus*보다 phenanthrene 노출에 대하여 더 민감하게 반응하는 것으

로 나타났으며, 정상배아 발생률은 수정률에 비하여 더 민감한 종말점인 것으로 나타났다. 따라서, phenanthrene은 두 종의 성체 정자의 수정과 초기발달 단계를 포함한, 연안에 서식하는 다양한 생물종에 영향을 미치는 것으로 보여진다. 그중, 두 종의 성체는 다른 연안 서식 생물 종들에 비하여, Phenanthrene의 bio-monitoring을 위한 민감한 생물종일 수 있다고 사료된다. 또한, 본 연구를 통하여 도출된 결과와 독성값(NOEC, LOEC 및 EC₅₀)은 Phenanthrene을 포함한 PAHs의 환경 기준농도 설정을 위한 유용한 기초 자료로 활용될 수 있다.

사 사

본 논문은 2020년도 국립수산과학원 경상과제(R2020 027) 연구비 지원으로 수행하였습니다.

REFERENCES

- Baek SO, RA Field, ME Goldstone, PW Kirk, JN Lester and R Perry. 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate, and behavior. *Water Air Soil Pollut.* 60:279-300.
- Bartlett JHG, DM Mageean and RJ O'Conner. 2000. Residential expansion as a continental threat to U.S. coastal ecosystem. *Popul. Environ.* 21:429-468.
- Botello AV, SF Villanueva, GG Diaz and E Escobar-Briones. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Salina Cruz Harbor and coastal areas, Oaxaca, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 36:554-558.
- Budzinski H, L Jones, J Bellocq, C Piérard and P Garrigues. 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar. Chem.* 58:85-97.
- Cachot J, O Geffard, S Augagneur, S Lacroix, K Le-Menach, L Peluhet, J Couteau, X Denier, MG Devier, D Pottier and H Budzinsk. 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat. Toxicol.* 79:257-267.
- Castro-Jimenez J, N Berrojalbiz, J Wollgast and J Dachs. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Mediterranean Sea: Atmospheric occurrence, deposition and decoupling with settling fluxes in the water column. *Environ. Pollut.* 166:40-47.
- Chen CW and CF Chen. 2011. Distribution, origin, and potential toxicological significance of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan. *Mar. Pollut. Bull.* 63:417-423.
- Chung HH, HS Jeong, EY Kim, HI Cho, JC Hwang and SW Choi. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of Kwangyang Bay on Korea. *J. Environ. Sci. Int.* 13:543-549.
- Di Toro D, J McGrath and D Hansen. 2000. Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. I. Water and tissue. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:1951-1970.
- Greenwood PJ. The influence of an oil dispersant chemserve OSE-DH on the viability of sea urchin gametes. Combined effects of temperature, concentration and exposure time on fertilization. *Aquat. Toxicol.* 4:15-29.
- Haritash AK and CP Kaushik. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169:1-15.
- Honda M and N Suzuki. 2020. Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons for aquatic animals. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17:1-23.
- Hwang UK, CW Lee, SM Lee, KH An and SY Park. 2008. Effects of salinity and standard toxic metals (Cu, Cd) on fertilization and embryo development rates in the Sea Urchin (*Strongylocentrotus nudus*). *J. Environ. Sci.* 17:775-781.
- Hwang UK, CW Rhee, KS Kim, KH An and SY Park. 2009. Effects of salinity and standard toxic metal (Cu, Cd) on fertilization and embryo development rates in the Sea Urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *J. Environ. Toxicol.* 24:9-16.
- Hwang UK, HM Ryu, YH Choi, SM Lee and HS Kang. 2011. Effect of cobalt (II) on the fertilization and embryo development of the Sea Urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *Korean J. Environ. Biol.* 29:251-257.
- Hwang UK, DH Kim, HM Ryu, JW Lee, SY Park and HS Kang. 2014. Effect of bisphenol A on early embryonic development and the expression of Glutathione S-transferase (GST) in the Sea Urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *Korean J. Environ. Biol.* 32:234-242.
- Jackim E and D Nacci. 1986. Improved sea urchin DNA-based embryo growth toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 5:561-565.
- Johnsen AR, LY Wick and H Harms. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133:71-84.
- Kanally RA and S Harayama. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182:2059-2067.
- Kanaki M, A Nikolaou, CA Makri and DF Lekkas. 2007. The occurrence of priority PAHs, nonylphenol and octylphenol in inland and coastal waters of Central Greece and the Island of Lesbos. *Desalination* 210:16-23.
- Kobayashi N. 1991. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Tanabe Bay, Wakayama Prefecture, Japan, 1970-

1987. Mar. Pollut. Bull. 23:709–713.
- Latimer JS and J Zheng. 2003. The sources, transport and fate of PAHs in the marine environment. pp. 9–33. In: PAHs: An Ecotoxicological Perspective (Douben PET eds.). John Wiley and Sons Incorporated, New York.
- Lim L, O Wurl, S Karupiah and JP Obbard. 2007. Atmospheric wet deposition of PAHs to the sea-surface microlayer. Mar. Pollut. Bull. 54:1212–1219.
- Lee TY. 2018. Concentration, sources, and ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments obtained from near Gwangan Bridge. J. Korean Soc. Environ. Eng. 40:379–384.
- Manzo S, S Buono and C Cremisini. 2006. Toxic effects of Irgarol and Diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* Early Development, fertilization, and offspring quality. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51:61–68.
- Moon HB, SK Kang, HS Kim, MK Choi, J Yu, HG Choi and JS Park. 2007. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in seawater and marine sediments from Mokpo coast in Korea. J. Kor. Soc. Environ. Anal. 10:83–90.
- Nikolaou K, P Masclat and G Mouvier. 1984. Sources and chemical-reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere-A critical-review. Sci. Total Environ. 32:103–132.
- Pagano G, G Corsale, A Esposito, PA Dinnel and LA Romana. 1989. Use of sea urchin sperm and embryo bioassay in testing the sublethal toxicity of realistic pollutant level. Adv. Appl. Biotech. Ser. 5:153–163.
- Park PS, NS Kim, UH Yim, WJ Shim and GB Kim. 2009. Spatial and vertical distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment of the shipyard area in Gohyeon Bay. J. Korean Soc. Mar. Environ. Energy 12:68–74.
- Qiu YW, G Zhang, GQ Liu, LL Guo, XD Li and O Wai. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water column and sediment core of Deep Bay, South China. Estuar. Coast. Shelf Sci. 83:60–66.
- Serafim A, R Company, B Lopes, C Pereira, A Cravo, VF Fonseca, S Franca, MJ Bevianno and HN Cabral. 2013. Evaluation of sediment toxicity in different Portuguese estuaries: Ecological impact of metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. Estuar. Coast. Shelf Sci. 130:30–41.
- Sung CG, PS Park, JH Lee and CH Lee. 2014. Effect of five PAHs (2-methylnaphthalene, fluorene, dibenzothiophene, phenanthrene, and pyrene) on the embryonic development in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Korean J. Malacol. 30:177–187.
- UNEP. 2003. Proceedings of workshop to develop a global POPs monitoring programme to support the effectiveness evaluation of the Stockholm Convention. United Nations Environment Program. Nairobi, Kenya.
- Veith GD, DJ Call and L Brooke. 1983. Structure-toxicity relationships for the fathead minnow, *Pimephales promelas*: narcotic industrial chemicals. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40:743–748.
- Wu Y, J Zhang and ZJ Zhu. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Yalujiang Estuary, North China. Mar. Pollut. Bull. 46:619–625.
- Yu CM. 1998. A study on the effect of heavy metals on embryonic formation of sea urchins. Kor. J. Env. Hlth. Soc. 24:6–10.
- You YS, JH Lee, JC Park, DM Kim and HS Cho. 2012. Distribution characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine waters of Ulsan Coast, Korea. J. Korean Soc. Mar. Environ. Saf. 18:398–405.