

생체지표 유전자 발현을 이용한 서해연안 갯벌어장과 바지락의 건강도 평가

최윤석, 김맹진

국립수산과학원 동해수산연구소

Using biomarker genes for the health levels of the Tidal flat and Manila clam, *Ruditapes Philippinarum* in the West coast of Korea

Yoon Seok Choi and Maeng Jin Kim

East Sea Fisheries Research Institute, NIFS, Gangneung, 25435, Korea

ABSTRACT

For the health levels of the tidal flat and manila clam, (*Ruditapes Philippinarum*) in the west coast of Korea, the habitat characteristics of tidal flat and the biomarker genes of manila clams were investigated. Surface sediments and manila clams were collected from eight site of west coast of Korea, they were examined the geochemical characteristics and manila clams were analyzed the Poly Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and heavy metals and the total RNA of these meat part with RT-qPCR method. Total RNA such as heat shock protein 70 (Hsp70), heat shock protein 90 (Hsp90), glutathione S-transferases (GST) and thioredoxin (TRX) was extracted from the meat part of the collected clams. Expression of the genes was analyzed by PCR method and the expression of biomarker genes were changed in the eight sites analysis areas. These results indicate that biomarker genes can be used to assess the condition of the environment. That is related to stress, immune and antioxidant related genes. Results showed that the expression of biomarker genes were changed in the eight sites and were relevant with the heavy metals and PAHs concentration of sediments, respectively. We suggested that biomarker genes were impressed an important role for the health level assessment of tidal flats.

Key words: Biomaker genes, Heavy metals, PAHs, Manila clam

서 론

갯벌의 어장환경은 각종 오염물질의 유입으로 변화하고 있으며 서식하는 생물은 생장저하 현상 및 집단적인 폐사가 발생하기도 한다. 서식하는 패류의 생산성 하락 및 생물의 군집 변화가 발생하고 있는 갯벌어장의 건강도 평가를 위하여 지화학적 분석 및 자연 생태계 환경 모니터링의 조사방법인 분자생물학적 방법을 도입하였다 (Choi *et al.*, 2018; Choi and Kim, 2023).

건강도 평가 방법으로 사용한 지화학적 분석방법은 퇴적물의 지화학적 특성과 입도, 그리고 퇴적물 및 바지락의 중금속 및 다환방향족탄화수소 (PAHs) 의 농도를 측정하여 오염도를 평가한다. 또한 생체지표유전자 (biomarker gene) 분석방법으로 환경오염 물질 등으로 인하여 패류 생물 체내에 발생한 스트레스에 대한 해소과정에서 생성되는 유전자들의 발현을 측정하여 평가한다 (Pamela and J. William, 1993).

해양생물의 생체지표유전자는 외부온도 변화에 따라 세포를 보호하려는 단백질인 열충격단백질 (heat shock protein, Hsp), 산화스트레스 (oxidative stress) 및 면역 (immune) 에 관련된 유전자로 구성되어 있다 (Choi *et al.*, 2018).

생체지표 유전자 중에서 Hsp (열충격 단백질) 를 이용한 유전자 발현에 관한 연구로 온도, 산소, 세균, 중금속 및 내분비계장애물질 (endocrine disrupting chemicals, EDCS) 등 외부환경 요인에 따라 단백질의 변성 및 세포보호에 관련된 것이 보고되어 있다. (Rhee *et al.*, 2009; Colinet *et al.*,

Received: September 12, 2024; Revised: September 18 2024;
Accepted: September 26, 2024

Corresponding author: Maeng Jin Kim

Tel: +82 (33) 660-8522, e-mail: kimmj0106@korea.kr
1225-3480/24869

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.

2010; Xu and Qin, 2012; You *et al.*, 2013).

그리고 모든 생물체의 효소군에 포함되어 있는 GST (glutathione S-transferase) 는 약물대사효소계 phase II로 수생환경의 산화스트레스 조건의 변화에 따라 바이오마커로 사용된다 (Liu *et al.*, 2015). 또한 외인성생물화합물 (xenobiotics), 중금속 및 병원체 (pathogen) 등에 의해 생성된 산화스트레스 (oxidative stress) 의 독소에 작용하여 생체내의 반응성이 적은 물질로 분해하는 기작에 관여한다 (Smith *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2013; Eroglu *et al.*, 2015).

한편 TRX (thioredoxin) 은 생물체의 환경과 상호작용하는 능력, 항상성 유지 및 유전자 발현에 관여하는 단백질로서 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 의 활성조절 효소로 작용하며 (Liyanage *et al.*, 2018), 성장조절, 전사인자, 단백질 접힘 및 라디칼 제거를 한다 (Umasythan *et al.*, 2012).

본 연구는 생체지표유전자로 heat shock protein 70 (hsp70), heat shock protein 90 (hsp90), glutathione S-transferase (GST) 및 thioredoxin (TRX) 를 사용하였고, house keeping 유전자 β -actin 등을 이용하여 보정 하였다. 또한 바지락 (*R. philippinarum*) 의 생체 내 스트레스 수준 (stress level) 을 측정하고, 표층 퇴적물 및 바지락의 중금속과 PAHs 농도분포를 조사하여 갯벌어장의 퇴적물과 서식하는 바지락에 대한 건강도를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시료 채취 지역

2022년 3월에 서해안 갯벌어장 8개 정점의 조건대 해역에서 바지락 및 퇴적물 시료를 채취하였으며 (St. 1. Pado-ri, St. 2. Sinsido, St. 3 Hajeon, St. 4. Baekmi-ri, St. 5. Joongwang-ri, St. 6. Jugyo, St. 7. Wonchong, St. 8. Hwangdo) 갯벌어장의 노출시간 등을 고려하여 조사지점으로 선정하였다 (Fig. 1).

2. 퇴적물 및 바지락 시료 분석

1) 표층 퇴적물

① 표층 퇴적물 지화학적 환경특성 분석

바지락 서식지의 표층 퇴적물을 채집하여 화학적산소요구량 (COD), 강열감량 (IL), 산화발성산화물 (AVS) 을 해양환경공정시험기준 (해양수산부, 2020) 으로 분석하였다. 그리고 퇴적물의 입도 (Mean grain size) 는 퇴적물 시료 중 일부를 분취하여 10 %의 과산화수소수 (H_2O_2) 와 0.1 N의 염산 (HCl) 을 넣어 유기물과 탄산염을 완전히 제거한 후 체질방법과 입도분석기를 사용하여 분석하였다. 그리고 입도분석 결과

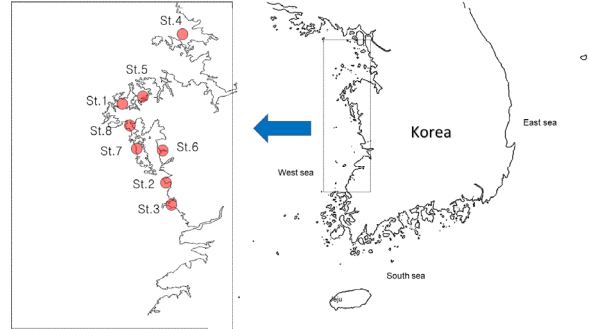


Fig. 1. A map of survey area in the west coast of Korea.

는 (Folk, 1968; McBride, 1971) 방법으로 분류하였다.

② 표층 퇴적물과 바지락의 중금속 함유량 분석

바지락 서식지의 표층 퇴적물과 바지락 시료를 채집하여 폴리에틸렌 병에 시료를 옮긴 후 급속 냉동하여 보관하였다. 시료를 동결건조하여 막자사발을 사용하여 분쇄 및 동결 건조하였다. 동결건조된 시료를 산 분해하여 유도결합질량분석기 (inductively coupled plasma mass; ICP-MS, Model: Elan 9000, Perkin Elmer Co.) 로 정량하였다.

③ 표층퇴적물과 바지락의 PAHs 분석

다환방향족 탄화수소 Poly Aromatic Hydrocarbons (PAHs) 를 분석하기 위해 퇴적물 시료는 표층 1-10 cm에서 채취하였으며, 바지락 시료는 채집하여 실험실에서 영하 20°C 이하의 냉동상태로 보관하였다. 퇴적물과 바지락에 함유되어 있는 PAHs의 농도를 확인하기 위해 미국 EPA의 우선 관리대상 오염물질인 16종의 PAHs (Acenaphthene, Acenaphthylene, Anthracene, Benz[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[ghi]perylene, Benzo(a)pyrene, Chrysene, Dibenz[a,h]anthracene, Fluoranthene, Fluorene, Indeno[1,2,3-cd]pyrene, Naphthalene, Phenanthrene, Pyrene) 의 PAHs를 분석하였다.

균질화된 퇴적물 및 바지락 시료는 약 20 g의 습식시료를 분취하여 약 50 g의 무수황산나트륨을 450°C에서 활성화시킨 후 혼합하여 수분을 제거하였다. 속실판 추출을 위하여 200 mL의 디클로르메탄으로 16시간 동안 추출하였다. 그리고 농도보정은 내부표준물질 (surrogate standards; Naphthalene-d8, Acenaphthene-d10, Phenanthrene-d10, Chrysene-d12, Perylene-d12) 을 첨가하여 회수율을 구하여 계산하였다.

퇴적물 시료와 바지락 시료는 기체크로마토그래프 내부표준물질 (GC internal standard; Terphenyl-d14) 을 첨가하고 GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometer) 를 이용하여 정량 분석하였다.

2) 바지락 시료의 생체지표 유전자 분석

① 바지락 시료 전처리 및 Total RNA 추출

2022년 3월에 서해안 갯벌어장 8개 정점 (St. 1. Pado-ri, St. 2. Sinsido, St. 3 Hajeon, St. 4. Baekmi-ri, St. 5. Joongwang-ri, St. 6. Jugyo, St. 7. Wonchong, St. 8. Hwangdo) 에서 바지락 시료를 채집하여 급속냉동하였다.

바지락 시료의 전체 리보핵산 (total RNA) 추출을 하기 위하여 실험구 (정점) 당 10개체를 사용하였다. 육질부위는 RNAiso Plus (TaKaRa Co. Shiga, Japan) 용액을 제조하여 정점당 10개체를 채취하여 1개의 실험구로 하였고, 각 정점 당 총 5개의 실험구를 제작하였다.

바지락 시료의 조직들은 액체질소에 담아 막자사발을 이용해 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 RNAiso plus 용액 (1 mL/100 mg) 과 혼합하여 tube에 넣고 실온에서 5분간 방치하였다. 이 용액에 Chloroform 0.2 mL를 첨가한 후 실온에서 2분간 방치하고 원심분리한 후 상등액을 분리하여 isopropyl alcohol 1.0 mL를 넣어 10분간 실온에서 방치하였다. 이 용액을 다시 원심분리하여 펠렛을 생성시킨 후, 상등액을 제거하고 75 % 에탄올로 세척한 후 DEPC-DW에 녹여 추출하였다.

추출한 total RNA는 분광광도계 (NanoVue, GE Healthcare, Boston, MA, USA) 를 이용하여 정성 및 정량하였고, RNA quality는 260/280 ratio 1.8 이상을 확인하였으며, 역전사반응 (Reverse Transcription: RT) 전까지 초저온 냉동고 (-80°C) 에 보관하였다.

② 역전사반응-실시간중합효소연쇄반응 (RT-qPCR)

iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 를 사용하여 cDNA합성을 위한 역전사 반응 (Reverse Transcription, RT) 을 진행하였다. cDNA를 합성하기 위하여 total RNA 1 µg, iScript 5×Master mix 4 µL, iScript

reverse transcriptase 1 µL 및 DEPC-DW를 넣어 최종 반응용액 20 µL를 제작한 후 이 용액을 42°C에서 1시간 반응시켰다.

그리고 실시간중합효소연쇄반응 (qPCR) 은 iQ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 를 이용하여 수행하였다. cDNA 1 µL, primer 각각 1 µL, iQ SYBR Green Supermix (2×) 10 µL 및 DEPC-DW를 넣어 최종 반응용액 20 µL 되게 맞춘 후, real-time PCR machine (CFX96, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 를 사용하여 증폭하였다.

PCR 반응을 위한 유전자 프라이머의 염기서열 및 annealing temperature은 Table 1과 같으며 유전자 증폭을 위한 반응 조건은 95°C에서 5분 1회, 95°C에서 30초, 각 유전자 annealing temperature에서 30초, 72°C에서 30초를 35회 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 1회 반응하였다. Melting curve의 분석은 0.5°C 간격으로 50°C에서부터 95°C까지 상승시켰다가, 이후 30°C에서 5분간 유지하였다. 상대적인 유전자 발현량의 결정은 2^{-ΔΔCt} 방법 (comparative Ct method) 을 이용하여 유전자의 발현량을 분석하였다. 내재표준 유전자로는 house keeping 유전자인 β-actin (ACTB) 을 사용하여 발현량을 표준화 (normalization) 하였다. 실시간 중합효소연쇄반응은 정점 당 5개의 실험구를 대상으로 3회 반복 실험하였다 (Choi *et al.*, 2018).

③ 통계학적 분석

대조군에 의한 실험군과의 유의성 검정은 Student's t-test 로 비교하였으며, 유의적 차이 (p < 0.01) 로 하였다.

결과 및 고찰

1. 바지락의 생체지표 유전자를 이용한 갯벌 건강도 비교 평가

Table 1. RT-qPCR을 위한 프라이머 염기서열

Gene	Primer	Sequence	Tm (°C)
Hsp90	F	5'-TGGCAGCAAAGAAACATCTG	53
	R	5'-GGGATGTGTTG TTGGCTCTT	
Hsp70	F	5'-TGAAAGACAATAAACGTGCTG	60
	R	5'-AATTTCAATGCTGGCTTGTGT	
GST	F	5'-CTGTGGTTGACTTCCCAATGT	60
	R	5'-CTGCGTAGCAATGTCTTTCTTG	
TRX	F	5'-GGACGTTGATGATGTTTCGGAGGT	58
	R	5'-TTTCCAGTTCATCAGCATCAGC	
β-actin	F	5'-ATCCAGGCTGTCCTGTCACT	53
	R	5'-GAGGAAGTGCCTAACCTTCAT	

갯벌 8개 정점의 퇴적물의 지화학적 특성과 바지락의 중금속 함유량, PAHs 농도에 대한 실시간-역전사중합효소연쇄반응 (RT-qPCR) 분석방법을 이용한 Hsp-70, Hsp-90, Glutathione S-transferase (GST) 및 Thioredoxin (TRX) 유전자 발현의 상관관계를 분석하였다.

각각의 생체지표 유전자들은 환경특성에 따른 발현정도가 매우 다르게 나타나는 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 조사지역 정점에서 환경스트레스 물질 유입 및 축적 등 이 화학적인 자료의 연구 결과와 특이적인 지표유전자의 발현과의 상관관계를 해석하면, 생체지표 유전자의 발현 분석을 통해 오염물질, 환경특성을 유발하는 오염물질의 유입 정도를 파악할 수 있으리라 생각된다 (Choi *et al.*, 2018).

또한 Hsp70, Hsp90, GST 및 TRX 유전자들은 조사지역에서 (Fig. 2-7) 퇴적물의 지화학적 특성, 중금속 및 PAHs의 농도에 따라 생체지표 유전자들의 상관성을 파악할 수 있다 (Zhan *et al.*, 2021 and Choi *et al.*, 2023).

1) 표층 퇴적물의 지화학적 환경특성 및 입도조성

① 지화학적 환경특성

8개 지역의 표층 퇴적물은 조사정점에서 퇴적물의 표층 2 cm 이내로 채취하였으며, 입도 (Mz), 화학적산소요구량 (COD), 산화발성황화물 (AVS), 강열감량 (IL) 은 해양환경공정시험기준 (2020, 해양수산부) 에 따라 분석하였다.

바지락은 천해의 조간대에서 서식 환경조건에 퇴적물 변화에 영향을 많이 받는 생물이며, 퇴적물의 입도에 따라 서식과 성장이 영향을 받는다.

갯벌어장 바지락 서식지역은 환경조건인 수온과 갯벌 노출시간의 변화가 매우 심한 지역으로 (Choi *et al.*, 2014 and Choi *et al.*, 2019), 바지락의 분포는 퇴적물의 입도조성 및 유기물 함유량 등에 따라 퇴적물의 산소 교환, 공극수의 염분 및 pH 안정도 등에 영향을 받는다. 갯벌어장의 지역별 표층 퇴적물 조사에서 퇴적물의 유기물 함량을 간접적으로 표현할 수 있는 강열감량 (IL) 은 St. 1과 St. 7에서 높게 나타났으며, 화학적산소요구량 (COD) 값의 변화 양상은 0.81-11.10 mg/g-dry wt. (평균 3.14 mg/g) 으로 조사되었고 (Choi *et al.*, 2019) 특히 조사정점 St. 7지역에서 11.10 mg/g으로 가장 높은 농도를 보였다 (Fig. 2).

퇴적물에 있는 유기물은 바지락의 섭식에 영향을 주는 영양적인 요인으로 작용할 수 있으며, 오염된 유기물질의 영향이 유전자 발현에 관여할 수 있을 것으로 생각된다 (Kim *et al.*, 2005).

표층 퇴적물의 환경요인중에서 평균입도의 증가와 화학적 산소요구량 (COD) 의 농도가 증가한 St. 1과 St. 7에서 Hsp70, Hsp90, GST 및 TRX 유전자 발현을 보면 4가지 항

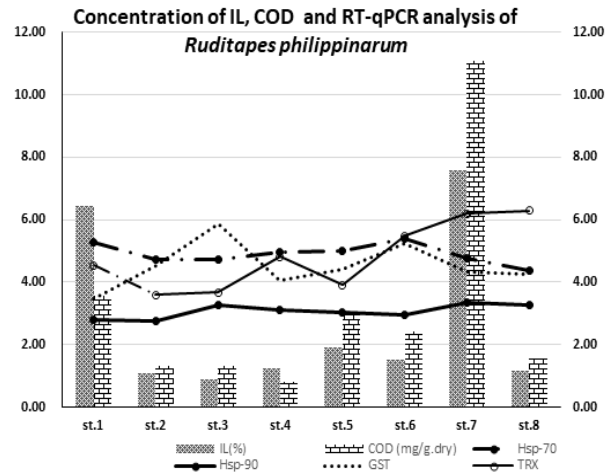


Fig. 2. IL and COD concentration and RT-qPCR analysis of surveying sites.

목 모두 높은 수치를 나타냈다. 이러한 환경조건과 생체지표 유전자의 발현에서 Hsp70 및 Hsp90의 열충격단백질은 외부 환경요인 중에서 온도, 산소, 세균 및 중금속에 의한 영향으로 유전자 발현이 된다 (Hongtao *et al.*, 2017 and Rhee *et al.*, 2009).

조사지역 St. 1 및 St. 7에서 상대적으로 높은 수치로 나타났으며, 이 지역은 갯벌에서 조간대의 노출시간에 의한 온도 증가 영향과 퇴적물의 중금속 (Co, Cr) 농도가 상대적으로 높아 산화스트레스에 의한 유전자 발현이 높게 나타난 것으로 생각할 수 있다.

바지락 성장과 폐사에 영향을 미치는 퇴적물의 산화발성황화물 (AVS) 값은 조사지역에서 전체적으로 0.001-0.019 mg/g (평균 0.004 mg/g) 수준으로 조사지역별 차이가 크지 않았다 (Fig. 3). 따라서 Hsp70, Hsp90은 전 조사정점에서 차이가 적게 나타났으며, AVS (산화발성황화물) 의 농도증가에 따른 TRX의 발현이 상대적으로 낮게 나타났다. AVS (산화발성황화물) 의 농도가 높으면 퇴적물 내 산소 고갈 및 결핍되어 있는 상태로 생물체 바지락의 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 의 활성조절 효소로 작용할 수 있는 TRX (thioredoxin) 발현 수치가 낮아지게 된다.

그리고 스트레스, 항산화 (antioxidant) 및 면역 관련 유전자의 발현이 높게 나타난 지역은 서식 개체가 퇴적물의 환경요인에 의해 스트레스를 받고 있다는 것을 의미한다 (Zhang *et al.*, 2012). 이러한 결과는 각 유전자에 특이적으로 반응하는 물질이 존재하는 것으로 생각되며, 따라서 이화학적 분석결과와 생체지표 유전자의 상관성을 분석하여 건강도를 측정할 수 있는 적합한 유전자를 선택할 수 있다고 생각한다.

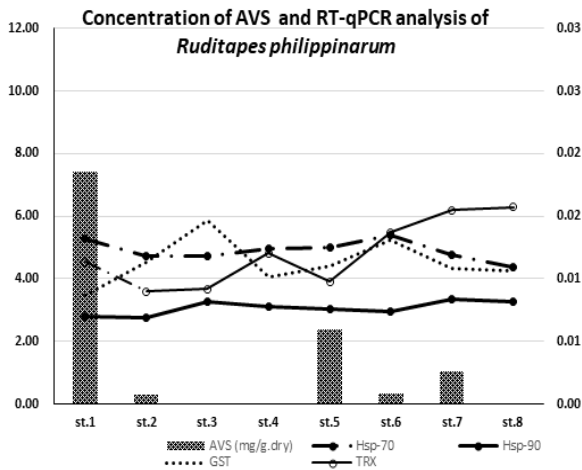


Fig. 3. AVS concentration and RT-qPCR analysis of surveying sites.

② 입도조성

현탁물을 섭식하는 바지락은 성장에 영향을 미치는 퇴적물의 환경요인으로 입도조성에 따라 지화학적 특성이 영향을 받게 된다. 입도조성의 퇴적물의 입자는 세립질 일수록 유기물 함량에 따라 오염원으로 작용할 수 있으므로 서식생물의 섭식 활동 등 생물의 행동과 생존에 제한을 받는 것으로 보고되어 있다 (Kim *et al.*, 2005).

갯벌어장 조사지역의 퇴적물의 입도는 대부분 사질 및 니질 사로 구성되어 있어 갯벌양식장의 적합한 조건을 갖고 있다. 그리고 평균 입도는 조사지역에서 (1.97-6.30) 의 분포 값을 나타내었고 분급도는 (0.74-2.33) 으로 분급이 매우 불량한 상태로 나타났다 (Kim *et al.*, 2005) (Table 2).

표층 퇴적물 8개 조사지역중에서 니질 및 니사질로 구성된 St. 1과 St. 7에서 생체지표 유전자 Hsp70과 TRX의 발현정도가 높게 나타났다 (Choi *et al.*, 2014 and Choi *et al.*, 2019).

2) 바지락 및 퇴적물의 중금속 함유량

조사지역 갯벌어장에서 채취한 바지락과 표층 퇴적물의 중금속 함유량은 Table 3 및 Table 4에 나타내었다.

조사지역 표층 퇴적물의 중금속 함유량은 서해안 지역 갯벌의 표층 퇴적물과 유사한 농도를 보였다 (Lim *et al.*, 2007). 또한 조사지역 바지락의 중금속 함유량 조사결과 As는 1.00-3.84 (평균 2.36 mg/kg d.w.), Cd은 0.05-0.49 (평균 1.406 mg/kg d.w.), Cu는 0.70-3.54 (평균 1.41 mg/kg d.w.), Co는 0.07-0.34 (평균 0.21 mg/kg d.w.), Cr은 0.18-1.06 (평균 0.54 mg/kg d.w.) 그리고 Pb는 0.08-0.28 (평균 0.08-0.28 mg/kg d.w.) 값을 나타내었다.

갯벌어장 St. 8에서 바지락의 생체지표 유전자 발현은 As와 중금속 5개 (Cd, Cu, Co, Cr, Pb) 에 대한 상관관계가 많은 것으로 나타났다 (Stefinia *et al.*, 2018). 특히 As, Cd 및 Cu의 농도가 높은 St. 4에서 Hsp70, GST 및 TRX의 값이 높게 나타났다 (Zhan *et al.*, 2021). 이 지역의 생체지표 유전자 발현중에서 GST는 중금속에 의한 생성된 산화스트레스의 독소에 작용하는 기작을 가지고 있어, 산화력이 강한 As, Cd 및 Cu에 의한 생성된 독소 물질을 반응성이 적은 물질로 분해하는데 관여하는 것으로 생각된다.

Fig. 4, 5에 나타난 퇴적물의 중금속과 유전자 발현을 보면 Cr, Co의 농도가 높은 St. 1 조사지역에서 Hsp70, Hsp90과 GST 유전자 발현이 높게 나타났다 (Eroglu *et al.*, 2015 and Yon *et al.*, 2013).

또한 산화환원활성 금속인 Cu의 농도가 높은 St. 4와 St. 8에서 Hsp70과 Hsp90의 유전자 발현이 낮은 것은 Cu의 환원력으로 산화스트레스가 줄어들기 때문으로 생각된다 (Kim *et al.*, 2018). 그러므로 산화환원비활성 금속인 Cd과 Pb은 산화스트레스를 간접적으로 발생시켜 유전자 발현에 영향을 줄 수 있는 중금속의 작용을 할 수 있으므로 (Kim *et al.*, 2018), 금속의 산화에 의한 GST의 발현성이 높아지는 것으로 해석할

Table 2. The mean grain size (Mz) of surface sediments in the surveying sites

St.	Textures (%)				Sediment type (Folk, 1968)	Statistical parameters			
	Gravel	Sand	Silt	Clay		Mean (φ)	Sort (φ)	Skew	Kurt
St. 1	0.13	78.80	20.00	1.07	(g) mS	3.60	1.63	1.42	4.36
St. 2	0.00	96.22	2.95	0.83	S	1.97	1.08	3.95	22.42
St. 3	0.00	98.74	1.07	0.19	S	1.99	0.74	2.80	23.72
St. 4	0.07	83.77	12.71	3.46	mS	3.25	1.59	2.20	10.09
St. 5	0.07	92.26	3.02	4.65	S	3.35	1.56	2.85	11.65
St. 6	9.46	83.71	6.39	0.44	gS	2.07	2.01	0.18	4.21
St. 7	2.99	13.94	76.84	6.23	(g) M	6.30	2.33	-2.09	7.23
St. 8	1.04	35.81	50.85	12.30	(g) M	5.03	2.23	0.49	3.49

Table 3. The content of heavy metals of surface sediments at study area

St.	Heavy metals of surface sediments (mg/kg d.w.)									
	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn	T-Hg
St.1. Pado-ri	9.20	0.17	6.96	39.50	71.47	22633.35	587.67	130.83	80.48	0.025
St.2. Sinsido	6.45	0.16	2.10	19.00	32.66	4772.31	233.02	39.54	39.32	0.005
St.3. Hajeon	11.07	0.16	1.11	11.12	24.70	4169.17	193.51	42.93	30.47	0.002
St.4. Baekmi-ri	7.03	0.16	2.51	14.85	25.60	8176.73	643.83	63.32	42.63	0.012
St.5. Joongwang-ri	7.81	0.16	3.42	23.75	46.73	12903.26	248.19	58.75	102.63	0.006
St.6. Jugyo	7.20	0.16	4.42	24.42	36.71	11628.33	340.61	79.36	46.41	0.008
St.7. Wonchong	10.99	0.20	8.86	55.37	148.05	29378.52	458.78	211.34	112.86	0.023
St.8. Hwangdo	7.16	0.16	2.13	12.58	35.99	5937.86	126.77	42.67	41.76	0.011

Table 4. The content of heavy metals of Manila clam at study area

St.	Heavy metals of surface sediments (mg/kg d.w.)									
	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn	T-Hg
St.1. Pado-ri	2.08	0.05	0.21	1.06	0.70	83.98	5.18	0.11	46.61	0.048
St.2. Sinsido	1.00	0.05	0.19	0.94	0.79	108.97	3.87	0.19	35.41	0.660
St.3. Hajeon	1.95	0.05	0.22	0.58	1.66	85.47	4.34	0.16	54.89	0.062
St.4. Baekmi-ri	3.84	0.49	0.07	0.52	3.54	95.46	8.63	0.28	167.06	0.050
St.5. Joongwang-ri	2.24	0.35	0.17	0.18	0.83	29.94	0.93	0.08	11.03	0.051
St.6. Jugyo	2.67	0.11	0.34	0.37	1.45	103.63	4.86	0.19	18.02	0.042
St.7. Wonchong	2.39	0.12	0.25	0.32	0.84	64.01	4.69	0.10	11.45	0.042
St.8. Hwangdo	2.67	0.09	0.20	0.36	1.44	71.60	6.07	0.10	15.30	0.082

수 있다 (Rhee *et al.*, 2009 and LimÓn-Pacheco *et al.*, 2009).

그러므로 바지락의 유전자 발현에 대한 결과는 Hsp70,

Hsp90, GST 및 TRX 유전자를 사용한 갯벌의 건강을 평가하기 위한 생체지표유전자로서의 역할을 수행함을 시사한다.

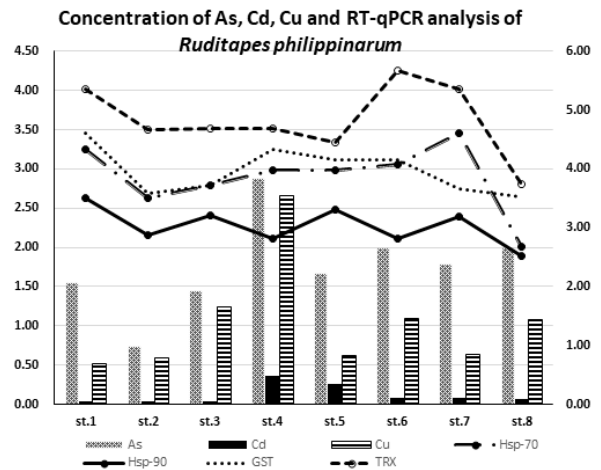


Fig. 4. Expression of mRNA and metal (As, Cd, Cu) concentration in manila clam (*R. philippinarum*) by RT-qPCR.

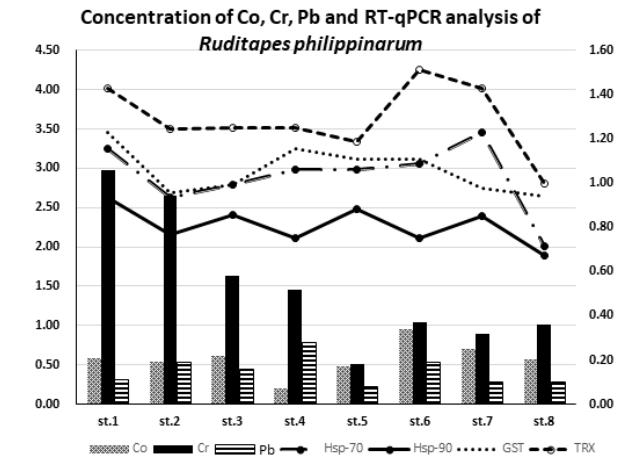


Fig. 5. Expression of mRNA and metal (Co, Cr, Pb) concentration in manila clam (*R. philippinarum*) by RT-qPCR.

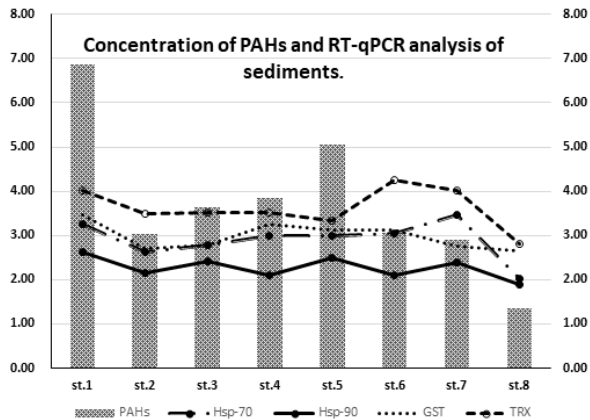


Fig. 6. Expression of mRNA and PAHs concentration in sediments by RT-qPCR.

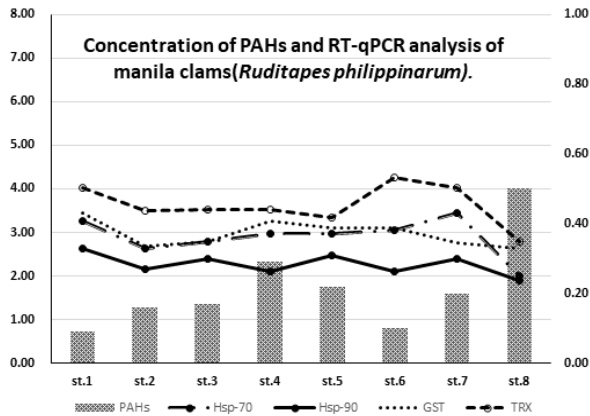


Fig. 7. Expression of mRNA and PAHs concentration in manila clams (*R. philippinarum*) by RT-qPCR.

3) 바지락 및 퇴적물의 PAHs(16종) 총합

PAHs는 지속적인 독성을 나타내는 유기물로 바지락에 축적되어 극미량으로 유전자에 피해와 독성을 나타낼 수 있는 물질이다. 조사지역의 퇴적물에 함유되어 있는 PAHs 농도와 4개의 생체지표 유전자 발현의 상관관계를 (Fig. 6)에 나타냈다.

퇴적물의 PAHs 농도가 높은 St. 1과 St. 5에서 Hsp70, Hsp90 및 GST의 발현이 상대적으로 많이 나타났으며, 그 외 조사정점에서는 일정한 수준을 유지하였다.

그리고 바지락의 PAHs 농도와 생체지표 유전자 발현에 (Fig. 7) 대한 상관관계를 보면 PAHs의 농도가 높은 St. 4와 St. 8에서 Hsp90의 발현이 적은 양상을 보이고 있다 (Maria *et al.*, 2013).

이 지역에서 조사된 바지락에 함유된 PAHs로 인한 유전자 발현은 중금속에 의한 수치보다 낮게 조사되었다. 따라서 생체지표 유전자 발현은 중금속의 산화환원 반응에 의한 산화스

트레스 영향이 퇴적물의 지화학적요인과 PAHs에 의한 발현보다 더 많은 작용을 하는 것으로 생각된다.

요 약

갯벌어장의 지역별 표층 퇴적물 조사에서 강열감량 (IL)은 St. 1과 St. 7에서 높게 나타났으며, 화학적산소요구량 (COD) 값의 변화 양상은 0.81-11.10 mg/g-dry wt. (평균 3.14 mg/g)으로 조사되었다.

표층 퇴적물의 환경특성 중에서 평균입도의 증가와 화학적 산소요구량 (COD)의 농도가 증가한 St. 1과 St. 7에서 Hsp70, Hsp90, GST 및 TRX 생체유전자지표 항목 4가지 모두 높은 수치를 나타냈다.

산취발성황화물 (AVS) 값은 조사지역에서 전체적으로 0.001-0.019 mg/g (평균 0.004 mg/g) 수준이며, 유전자지표인 Hsp70, Hsp90은 전 조사정점에서 차이가 적게 나타났다.

평균 입도는 조사지역에서 (1.97-6.30)의 분포 값을 나타내었으며, 분급도는 (0.74-2.33)으로 나타났으며, 표층 퇴적물 8개 조사지역 중에서 니질 및 니사질로 구성된 St. 1과 St. 7에서 생체지표 유전자 Hsp70과 TRX의 발현정도가 높게 나타났다.

갯벌어장 St. 8에서 바지락의 생체지표 유전자 발현은 As와 중금속 5개 (Cd, Cu, Co, Cr, Pb)에 대한 상관관계가 많은 것으로 나타났다. 특히 As, Cd 및 Cu의 농도가 높은 St. 4에서 Hsp70, GST 및 TRX의 수치가 높게 나타났다. 그리고 Cr, Co의 농도가 높은 St. 1 조사지역에서 Hsp70, Hsp90과 GST 유전자 발현이 높게 나타났다.

퇴적물의 PAHs 농도가 높은 St. 1과 St. 5에서 Hsp70, Hsp90 및 GST의 발현이 상대적으로 많이 나타났으며, 그 외 조사정점에서는 일정한 수준을 유지하였다.

바지락의 PAHs 농도와 생체지표 유전자 발현은 St. 4와 St. 8에서 Hsp90의 발현이 적은 양상을 보였다.

생체지표 유전자발현은 중금속의 산화환원 반응에 의한 발현이 지화학적요인과 PAHs에 의한 발현보다 더 많은 작용을 하는 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 2024년도 국립수산물학원 수산시험연구사업 (R2024008)의 지원으로 수행된 연구임.

REFERENCES

Choi, H.C., Choi Y.S., Kang, H.S. and Lee, Y. (2018)

- Evaluation of Health of Tidal Flat on the West Coast using Biomarker Genes and Manila Clam (*Ruditapes Philippinarum*). *Journal of Marine Life Science*, **3**(2): 59-66.
- Choi, Y.S. and Kim, M.J. (2023). Assessment for the Health level of the Tidal flat Using Biomarker genes of Manila clam, (*Ruditapes Philippinarum*). *Korean Journal of Malacology*, **39**(3): 111-118.
- Choi, Y.S., Song, J.H., Park, K.J. Yoon, S.P. and An, K.O. (2012) Contents of Inorganic Elements in Shellfish and Geochemical Characteristics of Surface sediments on the West coast of Korea. *Korean Journal of Malacology*, **28**(3): 225-232.
- Choi, Y.S., Song, J.H., Yoon, S.P., An, K.O. and Park, K.J. (2014) The environmental characteristics and factors in the cultured manila clam (*Ruditapes Philippinarum*) at Hwangdo and Jeongsanpo of Taean in the west coast of Korea. *Korean Journal of Malacology*, **30**(2): 117-126.
- Choi, Y.S., Jeon, S.R., Choi, Y.H. and Cho, Y.S. (2019) The environmental characteristics and factors on the cultured clam (*Ruditapes Philippinarum*) at Gomso and Geunso bay in the west coast of Korea. *Korean Journal of Malacology*, **35**(1): 33-44.
- Colinet, H., Lee, S.F., Hoffmann, A. (2010) Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.*, **277**: 174-185.
- Eroglu, A., Dogan, Z., Kanak, E.Z. Atli, G., Canli, M. (2015) Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22**: 3229-3237.
- Folk, R.L. (1968) Petrology of sedimentary rock, Hemphill Publishing Co., Austin TX, U.S.A., pp. 170.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. (2005) Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**: 51-88.
- Han, J.H., Won, E.J., Hwang, D.S., Rhee, J.S., Kim, I.C., Lee, J.S. (2013) Effect of copper exposure on GST activity and on the expression of four GSTs under oxidative stress condition in the monogonont rotifer, *Brachionus koreanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **158**: 91-100.
- Kim, H., Kim, J.S., Kim, P. J., Won, E. J. and Lee, Y. M. (2018) Response of antioxidant enzymes to Cd and Pb exposure in water flea *Daphnia magna*: Differential metal and age-Specific patterns. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **209**: 28-36.
- Kim, S.K., Lee, M.K., Ahn, J.H., Kang, S.W. and Jeon, S.H. (2005) The effects of mean grain size and organic matter contents in sediments on the nutrients and heavy metals concentrations. *J. Korean Soc. of Environ. Eng.*, **27**(9): 923-931.
- Liyanage, D.S., Omeka, W.K.M., Godahewa, G.I., Lee, J. (2018) Molecular characterization of thioredoxin-like protein 1 (TXNL1) from big-belly seahorse *Hippocampus abdominalis* in response to immune stimulation. *Fish Shellfish Immunol.*, **75**: 181-189.
- Liu, H., He, J., Zhao, R., Chi, C., Bao, Y. (2015) A novel biomarker for marine environmental pollution of pi-class glutathione S-transferase from *Mytilus coruscus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **118**: 47-54.
- Lim, D.I., Choi, J.Y., Choi, H.W. and Kim, Y.O. (2007) Natural background level analysis of heavy metal concentration Korean coastal sediments. *Ocean and Polar Research*, **29**(4): 379-389.
- Limón-Pacheco, J. and Gonséhatt, M. E. (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, **674**: 137-147.
- Maria, V.L., Gomes, T., Barreira, L., and Bebianno, M.J. (2013) Impact of benzo(a)pyrene, Cu and their mixture on the proteomic response of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, **144**: 284-295.
- McBride, E. F. (1971) Mathematical Treatment of Size Distribution Data. *In*: Procedure in sedimentary Petrology edited by Carver, R. E., 109-127 pp. Wiley-Interscience.
- Pamela, J. K. and J. William, O. (1993) Environmental biomarkers as indicators of chemical exposure. *J. Hazardous Mater.*, **35**: 283-294.
- Rhee, J.S., Raisuddin, S., Lee, K.W., Seo, J.S., Ki, J.S., Kim, I.C., Park, H.G. and Lee, J.S. (2009) Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **149**: 104-112.
- Song, Y.H., Choi, M.S. and Ahn, Y.W. (2011) Trace metals in Chun-su Bay sediments. 「The Sea」. *J. Korean Soc. Ocean.*, **16**(4): 169-179.
- Smith, A.P., De Ridder, B.P., Guo, W.J., Seeley, E.H., Regnier, F.E., Goldsbrough, P.B. (2004) Proteomic analysis of Arabidopsis glutathione S-transferases from benoxacor- and copper- treated seedlings. *J. Biol. Chem.*, **279**: 26098-26104.
- Stefania, F., Casattaa, N., Ferrarinb, C., Izzottic, A, Maicub, F., Viganoa, L. (2018) Gene expression and genotoxicity in Manila clam (*Ruditapes Philippinarum*) modulated by sediment contamination and lagoon dynamics in the Po river delta. *Marine Environmental Research*, **142**: 257-274.
- Hongtao, N., Lianhui, L., Zhongming, H., Peng, C., Jingfeng, D., Feng, Y., Xiawu, Yan. (2017) The HSP70 gene expression responses to thermal and salinity stress in wild and cultivated Manila clam *Ruditapes Philippinarum*. *Aquaculture*, **470**: 149-156.
- Xu, Q., Qin, Y. (2012). Molecular cloning of heat shock protein 60 (PthSP60) from *Portunus trituberculatus* and its expression response to salinity stress. *Cell Stress Chaperones*, **17**: 589-601.
- Umasuthan, N., Revathy, K.S., Lee, Y.D., Whang, I.S., Lee, J.H. (2012) Mitochondrial thioredoxin-2 from Manila clam (*Ruditapes Philippinarum*) is a potent antioxidant enzyme involved in antibacterial response. *Fish & Shellfish Immunology*, **32**: 513-523.

- You, L, Ning, X, Liu, F, Zhao, J, Wang, Q, Wu, H. (2013) The response profiles of HSPA12A and TCTP from *Mytilus galloprovincialis* to pathogen and cadmium challenge. *Fish Shellfish Immunol.* **35**: 343-350.
- Zhang, L., Qiu, L., Wu, H., Liu, X., You, L., Pei, D., Chen, L., Wang, Q. and Zhao, J. (2012) Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **155**: 517-527.
- Zhan, J., Wang, S., Li F., Ji, C., Wu, H. (2021) Global characterization of dose-dependent effects of cadmium in clam *Ruditapes Philippinarum*. *Environmental Pollution*, **273**: 116443.

