

〈Original article〉

해산로티퍼 (*Brachionus plicatilis*)의 생존 및 개체군 성장률을 이용한 Phenanthrene의 독성평가

황운기 · 최 훈 · 장수정 · 허 승 · 이주욱*

국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해평가센터

Toxicity Assessment of Phenanthrene using the Survival and Population Growth Rate of the Marine Rotifer, *Brachionus plicatilis*

Un-Ki Hwang, Hoon Choi, Soo-Jung Jang, Seung Heo and Ju-Wook Lee*

Marine Ecological Risk Assessment Center, West Sea Fisheries Research Institute, NIFS, Incheon 22383, Republic of Korea

Abstract - The oxicity assesment of Phenanthrene (PHE) has been investigated by using the rate (r) of survival and population growth in rotifer *Brachionus plicatilis*. The survival rate was determined after 24 h of exposure to PHE. The survival rate of PHE had no effect at a maximum of 300 mg L^{-1} . The r was determined after 72 h of exposure to PHE. It was observed that r in the controls (absence PHE) was greater than 0.5, but that it suddenly decreased with an increased concentration of PHE. PHE reduced r in a dose-dependent manner and a significant reduction occurred at a concentration of greater than 37.5 mg L^{-1} . The EC_{50} value of r in PHE exposure was 63.7 mg L^{-1} . The no-observed-effect-concentration (NOEC) of r in PHE exposure was 18.8 mg L^{-1} . The lowest-observed-effect-concentration (LOEC) of r in the PHE exposure was 37.5 mg L^{-1} . From the results, the concentration of PHE (greater than 37.5 mg L^{-1}) has a toxic effect on the r of *B. plicatilis* in natural ecosystems. These results (including NOEC, LOEC and EC_{50}) might be useful for the Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) toxicity assessment in marine ecosystems.

Keywords : rotifer, *Brachionus plicatilis*, phenanthrene, population growth rate, ecotoxicity

서 론

다환방향족탄화수소류(Polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)는 두 개 이상의 벤젠고리를 가지고 있는 유기오염물질이며, 낮은 농도에서도 독성이 강한 대표적인 발암성 환경오염물질로 알려져 있다(Shin and Kim 2003; Chiapusio

et al. 2007). PAHs는 다양한 물질을 포함하지만 대표적으로 naphthalene, phenanthrene (PHE), fluoranthene, pyrene 등이 있으며, 대부분 독성이 높지만 특히 PHE는 동물과 사람에게 암을 일으키는 물질로 분류되어 있다(Wu et al. 2013). PHE는 산업화와 유류유출 사고 등으로 인해 생성되는 오염물질로 화석연료를 사용하는 산업현장에서 고농도로 측정되는 것으로 알려져 있다(Edward 1983). 또한 PHE는 강물에 의해 지속적으로 해양으로 유입이 되고 있으나, 용해도가 낮고 분해가 잘 되지 않아 토양에 잘 흡수되어 퇴적물 내 고농도

* Corresponding author: Ju-Wook Lee, Tel. 032-745-0684, Fax. 032-745-0686, E-mail. leejuwook84@gmail.com

로 축적될 수 있다(Wilson and Jones 1993; Chiapusio *et al.* 2007). PHE는 생물체 내에 축적되어 대사작용을 방해할 뿐만 아니라, 먹이사슬을 따라 최상위 포식자인 인간에게까지 영향을 미칠 수 있어 전 세계적으로 문제가 되고 있다(Wolf *et al.* 1999; Wu *et al.* 2007). PHE는 생물의 초기 발생단계에서 독성을 나타내며 심낭 및 난황 부종, 심장 기능장애와 같은 기형을 나타내거나 DNA손상, 전사 조절 방해, 세포사멸 및 암을 일으키는 것으로 알려져 있다(Heintz *et al.* 2000; Lin 2005; Yu and Lin 2005; Incardona *et al.* 2006, 2009). Zhang (2013)은 PHE에 노출된 제브라피쉬(*Danio rerio*)에서 심장이 비정상적으로 확장 및 팽창되어 심실벽 두께가 감소하는 심장 기형을 관찰하였고, Hodson (2017)은 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)와 송사리(*Oryzias latipes*)에서 유생의 기형 및 DNA 손상이 나타나는 것을 보고하였다.

PHE의 위해성을 평가하기 위하여 다양한 생물종이 이용되어 왔으나, 사육 및 관리가 상대적으로 어려운 해양생물을 이용한 독성 연구는 아직도 미비한 것으로 판단된다. 해양은 육상으로부터 다양한 오염물질이 유입되는 곳이며, 빈번하게 발생하는 유류사고 등에 의해 PHE 등과 같은 PAHs에 쉽게 노출될 수 있어 생태학적 지위가 다양한 해양생물을 이용하여 PHE의 독성평가가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 해양생태계 내에서 1차 소비자로서, 다른 시험생물에 비해 사육 및 관리가 쉽고 생활사가 짧아 세대교번을 통한 생물영향을 평가할 수 있는 해산운충류 *Brachionus plicatilis*의 생존 및 개체군 성장률을 이용하

여 PHE의 독성평가를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시험생물

일반적으로 Rotifer는 어류치어의 먹이생물로 폭넓게 활용되어 상업적으로 중요한 생물이며(Hwang *et al.* 2016), 먹이가 충분한 25°C의 수온에서 약 10일 정도 생존한다(Snell and King 1977). 신생 개체(neonate)는 24시간 안에 성체로 성장하여 세대교번이 가능하고(Yoshinaga *et al.* 2000) 무성생식과 유성생식이 동시에 가능하며 먹이가 충분한 환경에서 1마리의 female은 20~40개체의 neonate를 생산할 수 있다(Jassen *et al.* 1993). 이러한 빠른 세대교번 속도로 로티퍼의 개체군 성장률은 독성평가를 위한 평가방법으로 사용되어 왔다(Preston *et al.* 2000). 시험생물 *B. plicatilis*는 서해수산연구소 해양생태위해평가센터 항온실에서 3개월 이상 계대배양하며 이용하였다. 배양액은 자연해수를 0.45 µm membrane filter로 여과한 후에 멸균하여 사용하였고, 먹이생물로 *Chlorella vulgaris*를 하루에 한 번 공급하였다. 실험 당일 계대배양 중인 *B. plicatilis*에서 포란 중인 성체(amic female)를 분리하고 2시간 이내 부화된 neonate 중 운동성이 활발한 neonate를 선별하여 사용하였다(Fig. 1).

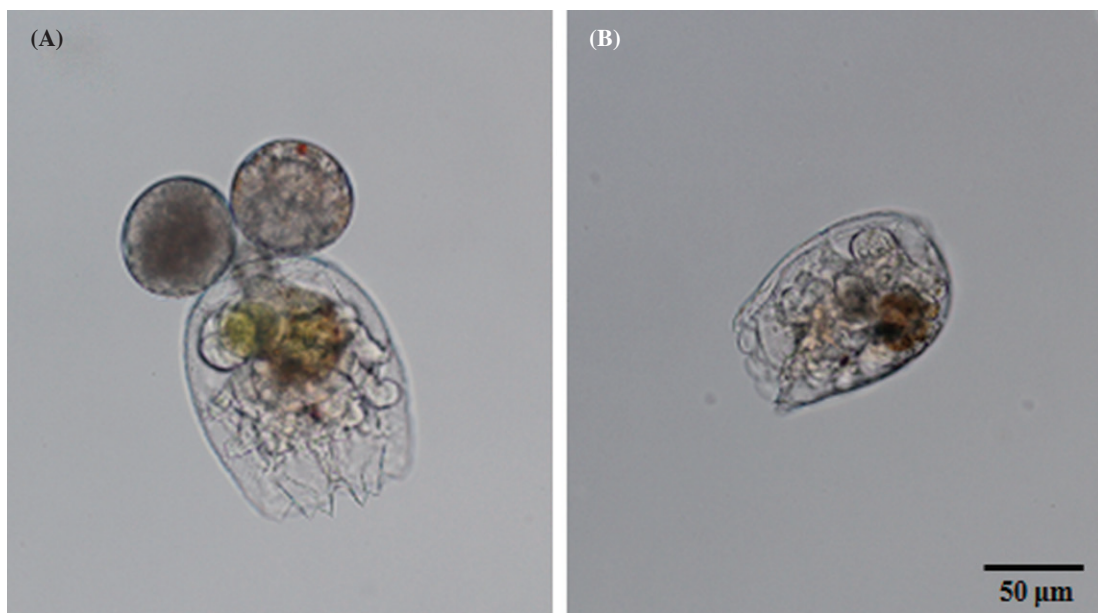


Fig. 1. Shape of adult (A) with egg and neonate (B) less than 2 h of *B. plicatilis*.

Table 1. Culture condition of *B. plicatilis*

Class	Condition
Culture type	Static non-renewal
Parameter	Survival rate (24 h) and population growth rate (72 h)
Temperature	25°C ± 1.0°C
Salinity	30 ± 0.5
Photoperiod	Darkness
Test volume	1 mL
Solution	Filtered (0.45 µm) and sterilized seawater
Feed organism	<i>Chlorella vulgaris</i> (2,000,000 cell mL ⁻¹)
Validity	>90% survival rate, >0.5 population growth rate

2. Phenanthrene 농도 조성

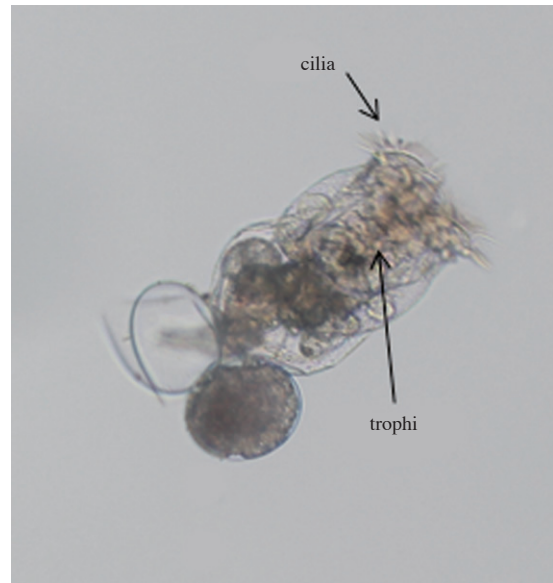
시험에 사용된 Phenanthrene (Sigma-aldrich, USA)은 DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma-aldrich, USA)를 carrier solution으로 사용하여 100,000 mg L⁻¹의 stock solution을 제작한 뒤, 멸균된 자연해수로 희석하여 사용하였다. 시험용액에 사용된 DMSO의 최대 농도는 0.3%로 *B. plicatilis*에서 독성이 나타나지 않는 농도로 사용하였다(Gallardo *et al.* 1997). 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PHE의 농도는 0, 10, 50, 100, 300 mg L⁻¹로 조성하였고, 개체군 성장률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 농도를 0, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 mg L⁻¹로 조성하였다. 개체군 성장률 시험의 농도 구간은 사전 예비실험을 바탕으로 설정하였고 생존율 시험의 최고 농도는 개체군 성장률 대비 2배로 결정하였다.

3. 생존율

생존율 시험은 24 well plate에 시험용액을 농도별로 1 mL씩 6반복 실시하였다. 부화한지 2시간 이내의 *B. plicatilis*의 neonate를 well당 5개체씩 넣고 25 ± 1.0°C에서 24시간 암배양한 뒤, 현미경을 이용하여 생존한 개체수를 계수하고 생존율을 계산하였다(Table 1). *B. plicatilis*의 생존 여부는 개체의 운동성 또는 섬모와 저작기의 활성 유·무에 따라 판단하였고(Fig. 2), 대조구의 생존율이 90% 이상일 경우 유의미한 시험결과로 사용하였다.

4. 개체군 성장률

개체군 성장률은 24 well plate에 시험용액을 농도별로 1 mL씩, 6반복 실시하였다. 먹이생물 *C. vulgaris*는 원심분리하여 배양액을 제거한 뒤 각 실험구당 200만 cell mL⁻¹를 공급하였다. *B. plicatilis*의 neonate를 well당 5개체씩 넣고 25 ± 1.0°C에서 72시간 암배양한 뒤(Jansen 1994), 3% 포르말린으로 고정하고 현미경으로 모든 개체수를 계수하여 개체군 성장률을 계산하였다(Table 1). 개체군 성장률은 아래

**Fig. 2.** Cilia and trophi of *B. plicatilis*.

와 같은 계산식으로 도출하였고 대조구의 개체군 성장률이 0.5 이상일 경우에 유의미한 시험결과로 사용하였다.

$$PGR = \frac{\ln N_d - \ln N_0}{d} \quad (1)$$

PGR = 개체군 성장률, N_d = 날짜 d 에서의 개체수, N_0 = 초기 개체수, d = 배양일

5. 통계분석

대조군과 실험군의 유의성 검정은 SigmaPlot software (SigmaPlot 2001, SPSS Inc., USA)의 Student's *t*-test로 비교하였으며 p 가 0.05 이하인 것을 유의한 것으로 판단하였다. 생존율 및 개체군 성장률에 대한 반수영향농도(50% Effective Concentration; EC₅₀)와 95% 신뢰구간(95% Confidence Limit; 95% CI)은 Toxicalc 프로그램(Toxicalc 5.0, Tidepool scientific software, USA)의 probit 통계법을 이용하여 분석하였다. 무영향농도(No Observed Effective Concentration; NOEC) 및 최소영향농도(Lowest Observed Effective Concentration; LOEC)도 Toxicalc 프로그램의 Dunnett's test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 생존율 변동

Phenanthrene (PHE)에 24시간 노출된 *B. plicatilis*의 생

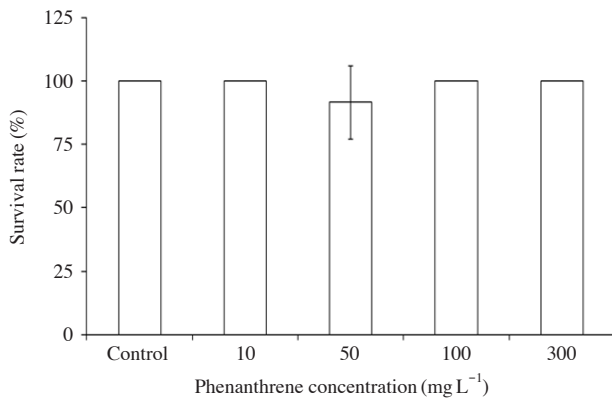


Fig. 3. Change of survival rates of *B. plicatilis* exposure to phenanthrene.

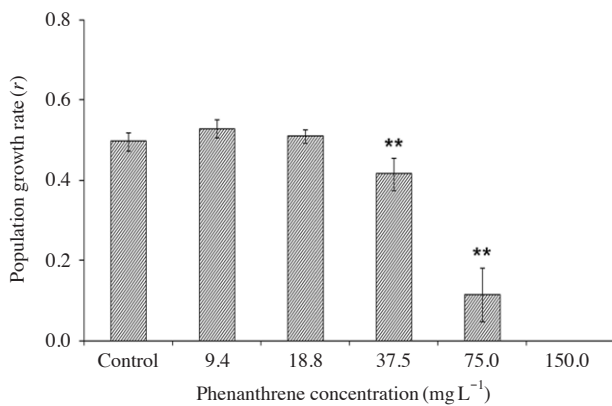


Fig. 4. Change of population growth rates of *B. plicatilis* exposure to phenanthrene. The vertical bars represent the S.D. of the mean for six times. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ for control.

존율 변동은 Fig. 3에 나타내었고, 대조구의 생존율은 90% 이상으로 시험에 적합하였다. 생존율은 50 mg L⁻¹ 농도에서 93.3 ± 11.6%로 소폭 감소하였으나 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 최고 농도에서도 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

2. 개체군 성장률 변동

*B. plicatilis*의 개체군 성장률 변화를 Fig. 4에 나타냈으며, 대조구의 개체군 성장률은 0.5 이상으로 시험에 적합한 것으로 판단되었다. PHE의 농도 변화에 따른 개체군 성장률은 18.80 mg L⁻¹ 이하의 농도에서는 대조구와 유의한 차이가 없었지만, 37.50 mg L⁻¹에서 0.42 ± 0.04 ($p < 0.01$)로 대조구 대비 16.17% 유의적인 감소가 나타나기 시작했다. 75.0 mg L⁻¹에서 0.11 ± 0.07 ($p < 0.01$)로 대조구 대비 76.93% 급격히 감소하였으며, 최고 농도 150 mg L⁻¹에서는 개체군 성장이 나

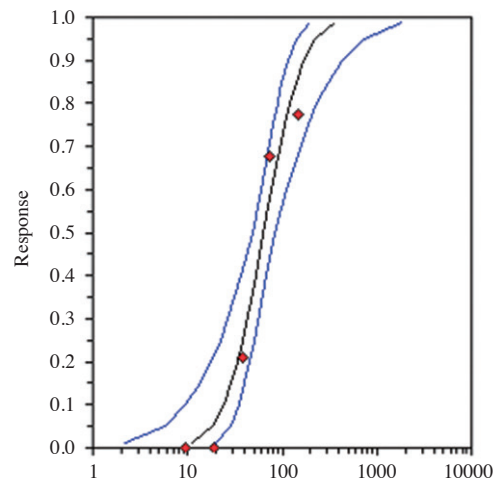


Fig. 5. Concentrations-response by phenanthrene treatment using population growth rates of *B. plicatilis*. Closed circles indicate the observed values, and black and blue lines indicate the estimated values and 95% confidence limit, respectively.

타나지 않아 *B. plicatilis*의 개체군 성장률은 PHE의 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 4).

3. 생존 및 개체군 성장률을 이용한 독성평가

생존율은 최고 농도 300 mg L⁻¹에서 변동이 없었으나, 개체군 성장률은 PHE의 농도가 증가할수록 감소하는 농도의존적인 결과가 나타났으며, 농도 반응 관계식은 표준독성 반응으로 알려진 Sigmoid 곡선을 나타냈다(Fig. 5). PHE에 노출된 *B. plicatilis*의 개체군 성장률의 EC₅₀은 63.7 (48.4~84.5) mg L⁻¹, NOEC는 18.8 mg L⁻¹, LOEC는 37.5 mg L⁻¹를 나타내었다.

고 찰

산업화와 화석연료의 사용으로 발생한 PAHs는 강물을 통해 연안으로 유입되어 해양생태계를 오염시키고 있다. 특히 PHE는 연체동물, 갑각류, 조류 및 포유류와 같은 광범위한 생물에서 독성을 일으키는 환경오염물질이며, 조직, 유전, 면역, 생식, 발달 및 행동학적 등 여러 수준에서 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Alves *et al.* 2017). PHE는 제브라피쉬(*Danio rerio*)에서 심장기능 및 형태형성 방해, 턱 축소 및 신체 측만을 유발하며(Incardona *et al.* 2004), 참다랑어(*Thunnus thynnus*)와 황다랑어(*Thunnus albacares*) 등의 다른 종류의 어류 배아에서도 심장 기형을 일으킨다(Incardona

Table 2. Toxicity evaluation using survival rates (SR) and population growth rates (PGR) in the *B. plicatilis* exposed to Phenanthrene.

	Toxicants	NOEC (mg L ⁻¹)	LOEC (mg L ⁻¹)	EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	95% CI (mg L ⁻¹)
Phenanthrene	SR*	—	—	—	—
	PGR	18.8	37.5	63.7	48.4-84.5

NOEC: No observed effective concentration, LOEC: Lowest observed effective concentration, EC₅₀: 50% Effective concentration, 95% CI: 95% Confidence limit., SR: Survival rates, PGR: Population growth rates.

*No effect of survival rate by Phenanthrene in 300 mg L⁻¹ limits.

et al. 2014). 수생생물뿐만 아니라 Wu et al. (2007)은 PHE에 노출된 육상생물 지렁이(*Eisenia fetida*)에서 lysenin 관련 단백질과 lombricine kinase 등의 변화를 관찰하였고, Sasaki (1997)는 인간의 림프구에서 P450과 epoxide hydrolase 유전자를 발현하는 human B-lymphoblastoid cell line과 MCL-5를 이용하여 유전자 수준에서 돌연변이를 보고하였다. PHE는 광범위한 생물에게 영향을 미치고 있기 때문에 다양한 생태학적 지위의 해양생물을 이용한 PHE의 위해성을 평가하는 연구가 필요하다고 생각되며, 따라서 최근 우리나라에서 생물영향 연구로 활발하게 사용되고 있는 *B. plicatilis*의 생존 및 개체군 성장률을 이용하여 PHE의 영향을 평가하였다.

본 연구결과 PHE에 대한 *B. plicatilis*의 개체군 성장률은 PHE의 농도가 증가함에 따라 농도의존적인 감소 현상을 보였지만, 생존율은 최고 농도(300 mg L⁻¹)에서도 모든 개체가 100% 생존하였다. 생존율(24시간)과 개체군 성장률(72시간)의 민감도 차이는 이전 연구에서 *B. plicatilis*를 중금속에 노출하였을 때 개체군 성장률이 생존율에 비해 2~9배 이상 민감한 일반적인 결과로 설명할 수 있다(Hwang et al. 2016; Lee et al. 2016). 또한 이러한 현상은 *Brachionus koreaus*에서도 보고되었는데, Won et al. (2016)의 연구에 따르면 WAF (Water Accommodated Fractions)의 주요 구성 성분인 naphthalene, PHE, fluoranthene에 노출된 *B. koreaus*에서 치사 효과는 없었으며, 노출 1일 이후부터 생식능력이 현저하게 감소되어 개체군 성장률이 최대 40% 이상 감소되었다. 이와 같은 이유는 *B. koreaus*의 cytochrome P450 (CYP) 유전자와 glutathione S-transferase 유전자가 강하게 영향을 받아 생존은 하지만 생식력이 억제되어 개체군 성장률이 감소한다고 설명하고 있다(Won et al. 2016). 실제 멕시코만에서 기름 유출사고가 *B. plicatilis*의 생식을 억제하여 개체군 성장률을 감소시킨 전례가 있으며, 지역 및 종별로 차이가 있다고 보고되어 있다(Roberto et al. 2013). 따라서 PHE의 독성평가에 있어 *B. plicatilis*의 개체군 성장률을 이용하는 것이 더 명확한 방법이라고 판단된다.

PHE 역시 마찬가지로 다양한 독성 범위가 나타난다. 물벼룩(*Daphnia magna*) 유영저해율의 EC₅₀은 342.1 µg L⁻¹ (Zindler et al. 2016), 383 µg L⁻¹ (Munoz and Tarazona 1993),

950 µg L⁻¹ (Xie et al. 2006)로 나타났다. 발광박테리아 (*Vibrio* sp)의 EC₅₀은 약 1 mg L⁻¹ (Johnson and Long 1998), *Photobacterium phosphoreum*은 0.53 mg L⁻¹로 나타났고 (McConkey et al. 1997), 잠개구리밥(*Lemna gibba*)에서는 5 mg L⁻¹ 이상으로 보고되었다(McConkey et al. 1997). PHE에 대한 송사리(*Oryzias latipes*)와 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 EC₅₀은 96, 180~320 µg L⁻¹로 나타났다(Turcotte et al. 2011). 현재까지 PHE의 EC₅₀은 다양한 농도 범위에서 탐지되었고 본 연구의 결과 값보다 높은 독성을 보였으나 토포기류(*Folsomia* sp)의 LC₅₀의 경우 41 mg kg⁻¹ 이상 (Sverdrup et al. 2002), 67.7 mg kg⁻¹ (Tourinho et al. 2015) 이었고 갑각류(*Porcellionides pruinosus*)에서 137 mg kg⁻¹으로 본 연구결과와 유사하거나 보다 낮은 독성을 나타내는 경우도 있었다(Tourinho et al. 2015). 또한 DellaGreca et al. (2001) 연구에 따르면 24개의 PHE 화합물에 노출하였을 때 미세조류(*Raphidocelis subcapitata*) EC₅₀의 범위는 1.2~168.9 µM, 물벼룩(*Daphnia pulex*)은 0.6~42.8 µM, 로티퍼(*Brachionus calyciflorus*)는 4.3~1,098 µM로 나타나 노출되는 오염원과 시험생물 간의 차이가 나타났다. 따라서 적절한 생물종과 방법을 선택하여 적용해야 할 필요가 있다.

최근 우리나라 해양환경에서 PAHs 오염을 평가하기 위해 전국 117개 해안의 퇴적물을 분석한 결과 16가지 PAH 농도의 합계가 8.80~18,500 ng g⁻¹ dry wt.이었고(Yim et al. 2007), 울산 산업단지 주변의 25개 지역의 PAHs를 분석한 결과 65~12,000 ng g⁻¹ dry wt.로 조사되었으며(Kwon and Choi 2014), 미국 북부 도시 주변의 PHE 분석결과 평균 200,000 ng g⁻¹ dry wt.로 오히려 항구(965 ng g⁻¹ dry wt.) 및 수로(825 ng g⁻¹ dry wt.)보다 최소 200배 높게 나타난 연구 결과도 있다(Kim et al. 2008). 우리나라는 지리적 특성상 해안지역에 다양한 대형 산업단지 및 양식장이 있고, 전체 인구의 33% 이상이 해안 가까이 거주하고 있지만, 주로 심한 오염지역이나 항구 주변에서 환경 분석 및 평가가 이루어지고 있다(Kim et al. 2002). 따라서 해안 산업단지 및 연안지역과 해안 대도시 주변에서도 PHE 조사가 필요하다고 판단되며, *B. plicatilis*의 개체군 성장률은 연안지역의 PHE 오염평가에 유용하게 적용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, PHE

에 노출된 *B. plicatilis*의 독성결과를 이용하여 무영향농도 (NOEC), 최소영향농도 (LOEC) 및 반수영향농도 (EC₅₀)를 제시하여 해양환경 평가를 위한 기준치 마련을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

적 요

해산로티퍼 (*Brachionus plicatilis*)의 생존율 및 개체군 성장률을 사용하여 Phenanthrene (PHE)에 대한 독성평가를 수행하였다. PHE에 24시간 노출한 생존율은 최고 농도 300 mg L⁻¹에서 영향이 나타나지 않았다. PHE에 72시간 노출한 개체군 성장률은 37.5 mg L⁻¹ 농도에서 급격한 감소가 시작되어 최고 농도 150.0 mg L⁻¹에서 개체군 성장이 나타나지 않아, 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였다. PHE에 노출된 개체군 성장률의 EC₅₀ 값은 63.7 (48.4~84.5) mg L⁻¹, PHE에 대한 개체군 성장률의 NOEC는 18.8 mg L⁻¹, LOEC는 37.5 mg L⁻¹로 나타났다. 연구결과 PHE를 평가하는 데 있어 생존율보다 개체군 성장률이 적합하며 해양환경에서 PHE의 LOEC 이상의 농도는 *B. plicatilis*에게 독성영향을 미칠 수 있는 농도로 판단된다. 또한 NOEC와 EC₅₀은 독성을 평가하는 기준점으로 이용할 수 있으며, 차후 PAHs의 통합적인 생물영향을 판단하기 위한 기초자료로 해양생태계 평가에 활용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 2017년도 국립수산과학원 경상과제 (R2017031) 연구비 지원으로 국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해평가센터에서 수행하였다

REFERENCES

- Alves RN, CF Mariz, DVD Paulo and PSM Carvalho. 2017. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere* 178:224-230.
- Chiapusio G, S Pujol, ML Toussaint, PM Badot and P Binet. 2007. Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils. *Plant Soil* 294:103-112.
- DellaGreca M, A Fiorentino, M Isidori and A Zarrelli. 2001. Toxicity evaluation of natural and synthetic phenanthrenes in aquatic systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:1824-1830.
- Edwards NT. 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment: a review. *J. Environ. Qual.* 12:427-441.
- Gallardo WG, Y Tomita, A Hagiwara, K Soyano and TW Snell. 1997. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium hydroxide (NaOH), acetone and ethanol on the population growth, mitotic female production, and body size of the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller. *Bull. Fac. Fish., Nagasaki Univ.* 78:15-22.
- Heintz RA, SD Rice, AC Wertheimer, RF Bradshaw, FP Thrower, JE Joyce and JW Short. 2000. Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 208:205-216.
- Hodson PV. 2017. The toxicity to fish embryos of PAH in crude and refined oils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73:12-18.
- Hwang UK, HM Ryu, S Heo, SJ Chang, KW Lee and JW Lee. 2016. Effect of Heavy Metals on the Survival and Population Growth Rates of Marine Rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Korea J. Environ. Biol.* 34:353-360.
- Incardona JP, TK Collier and NL Scholz. 2004. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196:191-205.
- Incardona JP, HL Day, TK Collier and NL Scholz. 2006. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P450 1A metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217:308-321.
- Incardona JP, MG Carls, HL Day, CA Sloan, JL Bolton, TK Collier and NL Scholz. 2009. Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic Pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering. *Environ. Sci. Technol.* 43:201-207.
- Incardona JP, LD Gardner, TL Linbo, TL Brown, AJ Esbaugh, EM Mager, JD Stieglitz, BL French, JS Labenia, CA Laetz, M Tagal, CA Sloan, A Elizur, DD Benetti, M Grosell, BA Block and NL Scholz. 2014. Deepwater horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:1510-1518.
- Jassen C, F Rodrigo and G Persoone. 1993. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*, I: conceptual framework and applications. *Hydrobiologia* 255:21-32.
- Janssen CR, G Persoone and TW Snell. 1994. Cyst-based toxicity tests. VIII. Short-chronic toxicity tests with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aqua. Toxicol.*

- 28:243–258.
- Johson BT and ER Long. 1998. Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: A new tandem in vitro testing approach. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:1099–1106.
- Kim M, MC Kennicutt II and Y Qian. 2008. Source characterization using compound composition and stable carbon isotope ratio of PAHs in sediments from lakes, harbor, and shipping waterway. *Sci. Total Environ.* 389:367–377.
- Kim SK, JR Oh, WJ Shim, DH Lee, UH Yim, SH Hong, YB Shin and DS Lee. 2002. Geographical distribution and accumulation features of organochlorine residues in bivalves from coastal areas of South Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 45:268–279.
- Kwon HO and SD Choi. 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils from a multi-industrial city, South Korea. *Sci. Total Environ.* 470:1494–1501.
- Lee JW, HM Ryu, S Heo and UK Hwang. 2016. Toxicity Assessment of Heavy Metals (As, Cr and Pb) Using the Rates of Survival and Population Growth in Marine Rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Korea J. Environ. Biol.* 34:193–200.
- Lin DH. 2005. Assessment on the contamination and risk of PAHs in a metals melting area. *Acta Ecol. Sin.* 25:261–267.
- MaConkey BJ, CL Duxbury, DG Dixon and BM Greenberg. 1997. Toxicity of a pah photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: Effects of phenanthrene and its primary photoproduct, phenanthrenequinone. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:892–899.
- Munoz MJ and JV Tarazona. 1993. Synergistic effect of two- and four-component combinations of the polycyclic aromatic hydrocarbons: phenanthrene, anthracene, naphthalene and acenaphthene on *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50:363–368.
- Roberto RM, TW Snell and TL Shearer. 2013. Synergistic toxicity of Macondo crude oil and dispersant Corexit 9500A to the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). *Environ. Pollut.* 173:5–10.
- Preston BL, TW Snell, TL Robertson and BJ Dingmann. 2000. Use of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in screening assay for potential endocrine disruptors. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:2923–2928.
- Sasaki JC, J Arey, DA Eastmond, KK Parks and AJ Grosovsky. 1997. Genotoxicity induced in human lymphoblasts by atmospheric reaction products of naphthalene and phenanthrene. *Mutat. Res.* 393:23–35.
- Shin KH and KW Kim. 2003. Enhanced bioremediation of phenanthrene using biosurfactant. *Econ. Environ. Geol.* 36:375–380.
- Snell TW and CE King. 1977. Lifespan and fecundity patterns in rotifers: the cost of reproduction. *Evolution* 31:882–890.
- Sverdrup LE, J Jensen, PH Krogh and J Stenersen. 2002. Studies on the effect of soil aging on the toxicity of pyrene and phenanthrene to a soil-dwelling springtail. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:489–492.
- Tourinho PS, PL Waalewijn-Kool, I Zantkuijl, K Jurkschat, C Svendsen, AMVM Soares, S Loureiro and CAM van Gestel. 2015. CeO₂ nanoparticles induce no changes in phenanthrene toxicity to the soil organisms *Porcellionides pruinosus* and *Folsomia candida*. *Ecotox. Environ. Safe.* 113:201–206.
- Turcotte D, P Akhtar, M Bowerman, Y Kiparissis, RS Brown and PV Hodson. 2011. Measuring the toxicity of alkyl-phenanthrenes to early life stages of medaka (*Oryzias latipes*) using partition-controlled delivery. *Environ. Toxicol. Chem.* 30:487–495.
- Wilson SC and KC Jones. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.* 81:229–249.
- Wolfe MF, GJB Schwartz, S Singaram, EE Miebrecht, RS Tjeerdema and ML Sowby. 1999. Influence of dispersants on the bioavailability and trophic transfer of phenanthrene to algae and rotifers. *Aquat. Toxicol.* 48:13–24.
- Won EJ, RO Kim, HM Kang, HS Kim, DS Hwang, J Han, YH Lee, UK Hwang, B Zhou, SJ Lee and JS Lee. 2016. Adverse effects, expression of the Bk-CYP3045C1 gene, and activation of the ERK signaling pathway in the water accommodated fraction-exposed Rotifer. *Environ. Sci. Technol.* 50:6025–6035.
- Wu S, X Xu, S Zhao, F Shen and J Chen. 2013. Evaluation of phenanthrene toxicity on earthworm (*Eisenia fetida*): a ecotoxicoproteomics approach. *Chemosphere* 93:963–971.
- Xie F, SA Koziar, MA Lampi, DG Dixon, WP Norwood, U Borgmann, XD Huang and BM Greenberg. 2006. Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9,10-phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: Evidence for a reactive oxygen mechanism. *Environ. Toxicol. Chem.* 25:613–622.
- Yim UH, SH Hong and WJ Shim. 2007. Distribution and characteristics of PAHs in sediments from the marine environment of Korea. *Chemosphere* 68:85–92.
- Yoshinaga T, A Hagiwara and K Tsukamoto. 2000. Effect of periodical starvation on the life history of *Brachionus plicatilis* O.F. Muller (Rotifera): a possible strategy for population stability. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 253:253–260.
- Yu F and YS Lin. 2005. Pollution characteristics of PAHs in the soils of typical urban industrial production areas and their neighboring residential areas. *Ecol. Environ.* 14:6–9.

Zhang Y, L Huang, C Wang, D Gao and Z Zuo. 2013. Phenanthrene exposure produces cardiac defects during embryo development of zebrafish (*Danio rerio*) through activation of MMP-9. *Chemosphere* 93:1168–1175.

Zindler F, B Glomstad, D Altin, J Liu, BM Jenssen and AM Booth. 2016. Phenanthrene Bioavailability and Toxicity to *Daphnia magna* in the Presence of Carbon Nanotubes with

Different Physicochemical Properties. *Environ. Sci. Technol.* 50:12446–12454.

Received: 13 November 2017

Revised: 1 December 2017

Revision accepted: 4 December 2017