

Original article

카드뮴 (Cd) 노출 퇴적물에 따른 실지렁이 *Tubifex tubifex*의 체내 축적과 스트레스 반응 유전자 발현

김지훈¹ · 김원석¹ · 박기연² · 곽인실^{1,2,*}

¹전남대학교 해양융합과학과, ²전남대학교 수산과학연구소

Bioaccumulation and Expressions of Stress Response Genes in Benthic Oligochaete Worm *Tubifex tubifex* to Exposure of Cadmium-spiked Sediment. Ji-Hoon Kim¹ (0000-0002-1157-9308), Won-Seok Kim¹ (0000-0003-3368-3891), Kiyun Park² (0000-0003-2965-6970) and In-Sil Kwak^{1,2,*} (0000-0002-1010-3965) (¹Department of Ocean Integrated Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; ²Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea)

Abstract Cadmium (Cd), a heavy metal found in the aquatic environment, accumulates in organisms through the food chain. In the study, we investigated the survival rates, measurement of body Cd levels, and expression analysis of the stress response genes (Heat shock protein 70: HSP70 and Heat shock protein 60: HSP60) and antioxidant enzyme Glutathione S-Transferases (GST) on benthic oligochaete worm *Tubifex tubifex* exposed three concentrations of Cd, to analyze the bioaccumulation and changes of stress gene expressions to exposure toxicity of the Cd-spiked sediment. Survival rates of *T. tubifex* exposed to the Cd-spiked sediment were 93% at 0.4 mg kg⁻¹ Cd, 96% at 1.87 mg kg⁻¹ Cd, and 93% at 6.09 mg kg⁻¹ Cd for 10 days. Cd concentration in the body of *T. tubifex* was higher than that in the sediment. After Cd exposures for 10 days, the body Cd levels were 18.4 mg kg⁻¹, 13.06 mg kg⁻¹, and 79.11 mg kg⁻¹ at exposed three concentrations of Cd, respectively. Upregulation of HSP70 gene expression was observed at all concentrations of exposed Cd as a time-dependent manner, whereas transcriptional expression of the HSP60 gene increased as a time-dependent manner in *T. tubifex* exposed to the relative high concentration (6.09 mg kg⁻¹) of Cd. However, GST gene expression increased on day 1 at all concentrations after Cd exposures, and then downregulated until 10 days. These results indicate to ecotoxicological and molecular effects in benthic oligochaete worm *T. tubifex* to Cd-spiked sediment and provide the basic information for the utilization of environmental toxicity assessment using the *T. tubifex* as a aquatic pollution indicator species.

Key words: Cd, *Tubifex tubifex*, survival rate, bioaccumulation, mRNA expression, HSP60, HSP70, GST

서 론

Manuscript received 8 August 2023, revised 2 December 2023,
revision accepted 3 December 2023
* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148, Fax: +82-61-659-7149
E-mail: inkwak@hotmail.com, iskwak@chonnam.ac.kr

급속한 산업화 및 도시화로 인해 유입되는 다양한 화학 물질은 환경오염을 증가시키며 서식생물에게 직접적인 생태독성학적 영향을 미치고 있다. 중금속은 농약 및 산업폐

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

수 등을 포함한 인위적 활동에 의해 발생하여 무분별한 배출로 인해 환경 및 생물에 축적되어 오염을 초래하고 있다(Diaconu *et al.*, 2020; Qiao *et al.*, 2021; Shahjahan *et al.*, 2022). 환경 내 퇴적물은 오염물질의 최종적인 축적 장소로 생물 독성 영향이 높아 서식하는 생물에 오염 독성을 노출시킬 수 있다(Steen Redeker *et al.*, 2004). 중금속은 환경에서 다양한 영양 수준의 생물에 축적되어 먹이사슬을 오염시킨다(Ali and Khan, 2019). 수생 생물에 대한 중금속 농축은 생물 체내에 높은 농도로 존재하여 독성 효과를 유발하고 단백질 활동의 조절 장애를 나타내는 등 이와 관련된 다양한 연구가 보고되었다(Duong *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017).

카드뮴(Cd)은 대표적인 유해 중금속 중의 하나로, 일반적으로 퇴적물에 결합하여 수생태계에서 환경오염을 야기하는 원인이 된다. 수생 생물에서 Cd 노출에 대한 체내 축적이 보고되었으며(Tang *et al.*, 2017), 그 영향은 신경 전달 물질 기능 손상, 대사효소 활성 장애 및 내분비계 기능 장애 유발 등이 있다(Clements *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2015). 또한, Cd 노출에 따른 잉어(*Cyprinus carpio* L.)의 심장 조직 손상과 Reactive Oxygen Species (ROS) 유도에 따른 산화스트레스의 발현(Liu *et al.*, 2023) 및 장수갈따구의 성장 방해 및 하순기질의 기형유발이 보고되었다(Kim *et al.*, 2019). Cd 노출에 따라 부착성 규조류의 생물막 Cd 흡착이 확인되었고(Duong *et al.*, 2010), 중국 Laizhou Bay에 서식하는 이매패류의 중금속에 대한 생물-퇴적물 축적 지수(BSAF, Biota-Sediment Accumulation Factor)를 측정된 결과, As, Cd, Hg, Zn에서 농축이 확인되었다(Liu *et al.*, 2017). 또한, 다양한 형태의 Cd에 노출된 바지락(*M. meretrix* L.)은 Cd만 노출한 것보다 유기물과 결합된 Cd 노출이 더 낮은 농도에서도 높은 생물 체내 농축을 나타냈다(Wu *et al.*, 2012).

환대강(Clitellata), 실지렁이목(Tubificida), 실지렁이과(Naididae)에 속하는 실지렁이(*Tubifex tubifex*)는 전 세계적으로 분포하며 퇴적물 속에 머리를 파고 들어가 유기물을 섭취하는 저서성 대형무척추동물이다. 오염에 대한 높은 내성으로 인해 유기물의 축적 및 오염 정도가 심한 수계에서 높은 개체 수를 보이기 때문에 수질 오염을 대표하는 지표종으로 이용되며 퇴적물 독성 실험에 폭넓게 이용되고 있다. 기존 연구로는 PTE (Potential toxic elements)에 의해 오염된 퇴적물에 노출된 *T. tubifex*의 생물농축과 SEM-AVS 분석을 통한 독성 영향이 보고되었다(Şimşek *et al.*, 2023). 또한, 미세플라스틱 노출이 *T. tubifex*에 미치는 영향을 Glutathione reductase (GR)과 Peroxidase (POD) 유전자의 발현을 통해 관찰하였다(Scopetani *et al.*, 2020). 이

외에도 다양한 종류의 살충제 노출에 따른 산화스트레스 및 성장 속도 변화, 아세트산과 벤조산에 노출된 *T. tubifex*의 Catalase (CAT), Superoxidase dismutase (SOD)의 발현 변화, *T. tubifex*를 이용한 Cu에 오염된 퇴적물의 독성 영향 등 생태독성학적 연구가 활발히 이루어지고 있다(Thit *et al.*, 2020; Chatterjee *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2023).

본 연구에서는 Cd 노출에 따른 분자적 영향 및 실지렁이(*T. tubifex*)의 생태독성을 분석하기 위해, 퇴적물 내 Cd 노출이 실지렁이 *T. tubifex*의 생존율에 미치는 영향을 관찰하고, Cd 노출 농도별 체내 생물축적 정도와 스트레스 반응 유전자인 Heat Shock Protein 60 (HSP60), Heat Shock Protein 70 (HSP70) 및 luthatione-S-Transferase (GST)의 발현 변화를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험생물 및 퇴적물

실험대상종인 실지렁이(*T. tubifex*)는 OECD Test Guideline No. 233에 따라 순치 및 실험을 진행하였다. 사육수는 탈염소수를 사용하였으며, 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광도 500 lx, 광주기는 16:8의 조건으로 사육하였다. 서식 환경 조성을 위해 0.1~0.2 mm 크기의 모래(Nature farm, Biotope rio tefe)를 사용하였으며, 먹이는 Tetramin (Tetra-Werke, Melle, Germany)을 갈아 매일 1회 공급하였다.

2. 만성 독성노출 실험 조건

노출물질인 CdCl_2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)의 노출 농도는 국내 하천 퇴적물 항목별 오염평가 기준(Table 2)과 Sediment quality guideline (USEPA, 1991)에 따라 0.4, 1.87, 6.09 mg kg^{-1} Cd로 설정하였다. 생태독성 실험은 실험 수조인 300 mL 비커에 퇴적물 50 g과 실지렁이 30마리씩 투입하고 1~3번 반복구는 생존율을 관찰하였으며, 4~6번 반복구는 HSP60, HSP70, GST 유전자 발현을 측정하였다. 생물농축은 25×25×25 cm 수조에 퇴적물 4.2 kg을 투입하고 생태독성 실험과 동일한 조건으로 진행하였으며, 제작한 생태독성 노출키트에 실지렁이를 각 1200 마리씩 투입하여 측정하였다(Fig. 1).

3. 생존율 관찰 및 생물농축 측정

Cd 노출에 따른 생물 유해성을 관찰하기 위해 실지렁이의 생존율을 측정하였다. 개체의 치사는 육안으로 관찰하였을 때 체색이 옅어지거나 회색을 띠고 스포이드 자극

Table 1. Primer information used to amplify in this study

Gene	Primer sequence (5'-3')	Efficiency (%)	Amplicon size (bp)	Accession number
β -actin	F: TGAACCCGAAATACAACCGC R: GTACAGGGACAGAACGGCTT	93	81	AY157023
HSP60	F: AGCCCAAAGATCACGAAGGA R: GTGTTGTTAGCGACGTCCTG	95	87	GU592914
HSP70	F: TGCTCATCCAGGTGTACGAG R: ATCTCCTCCTTGCTCAGACG	96	212	GU592915
GST	F: CTGAAATGGCGGACACTACG R: TTCAGACCATCAATGCGCAG	85	170	EF213110

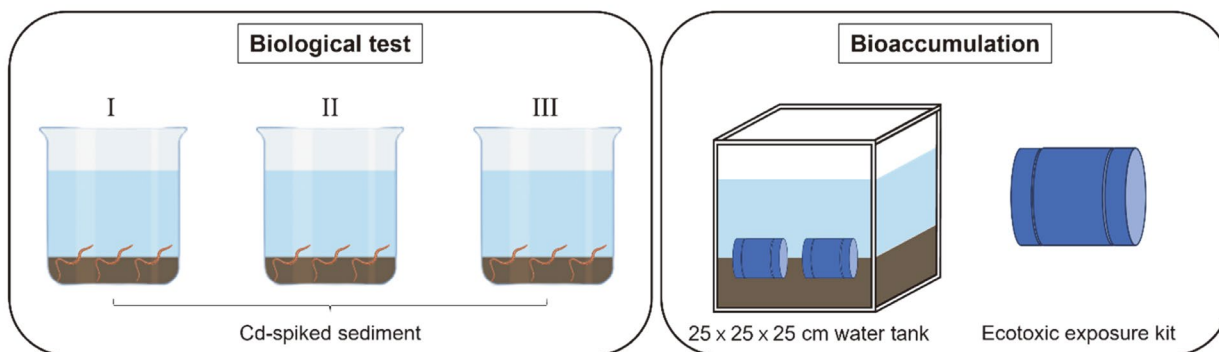
• Biological test

- Experimental organism: *Tubifex tubifex*
- N=30, 3 replicate
- Experiment vessel: 300mL glass beaker
- Test duration: 10d (0, 1, 4, 7, 10 day)
- Cd concentration: Low (0.04 mg kg⁻¹), Medium (1.87 mg kg⁻¹), High (6.09 mg kg⁻¹)
- End point: Survival rate, mRNA expression (HSP60, HSP70, GST)

• Bioaccumulation

- Experimental organism: *Tubifex tubifex*
- N= 1200 (dry weight about 2g), 1 replicate
- Experiment vessel: 25 x 25 x 25 cm water tank
- Test duration: 10d (0, 1, 4, 7, 10 day)
- Cd concentration: Low (0.04 mg kg⁻¹), Medium (1.87 mg kg⁻¹), High (6.09 mg kg⁻¹)
- End point: Bioaccumulation

* These experiments were conducted according to OECD Test Guideline No. 315.

**Fig. 1.** Summary to exposure experiments using Cd-spiked sediments in *T. tubifex*.

에 대한 반응이 없는 경우 치사로 판단하였다. 또한, 실지령이 체내 Cd 농축을 관찰하기 위해 체내 Cd 농도를 측정하였다. 실험 기간동안 채집된 실지령이는 -80°C에서 냉동하고 동결 건조 후, 마노 분쇄기를 사용하여 곱게 분말화하고 200 μ m mesh 체를 이용하여 통과된 분말만 산 세척된 시료병에 보관하였다. 측정은 시료 0.1 g을 취하여 60 mL 테프론 용기에 넣고 1 M HCl 10 mL를 가하여 밀봉 후, 24시간 실온에서 반응시켰다. 상등액 1 mL를 1% HNO₃를 넣어 10 mL로 한 후 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, iCAP RQ, Thermo Fisher Scientific)를

통해 측정하였다.

4. HSP60, HSP70, GST 유전자 발현

RNA isoplus (Takara, Japan)를 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 -80°C에 보관된 *T. tubifex* 조직에서 total RNA를 추출하였으며, DNase I (Takara, Japan)을 이용하여 RNA 내 genomic DNA를 제거하였다. 추출된 RNA의 순도와 정량은 1.5% agarose gel과 microplate reader (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 이용하여 확인하였다.

cDNA 합성은 Primer script™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Japan)을 통해 진행하였다. HSP60, HSP70, GST 유전자 발현 측정을 위해 유전자의 온도에 따른 효율성 (90~120%) 검증 후 실험을 진행하였다. 유전자 발현 측정을 위해 이용한 각 유전자의 프라이머 정보는 Table 1에 제공하였다. 유전자 발현량 측정은 SYBR green master mix (Bioneer, Korea)와 CFX Connect™ Real-time PCR System (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 95에서 20초, 55에서 40초로 40회 실시하였다. 이후 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 HSP60, HSP70, GST의 발현을 대조군 유전자와 상대적으로 비교하였다(Livak and Schmittgen, 2001). 또한, 농도에 따른 각 유전자의 상대적 발현량을 Star plot을 이용하여 시각화하였다(Fig. 5).

5. 통계 분석

Cd 노출에 따른 실지렁이의 스트레스 반응 관련 유전자 발현은 standard curve를 기준으로 β -actin의 발현량을 inter-

nal control로 표준화하였다. 또한, 결과에 대한 유의성을 통계적으로 검증하기 위해 R (version 4.2.2) 프로그램을 이용하여 t-test로 분석하였으며, 통계적 유의수준 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.005$)에 따라 검정하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 Cd 노출에 따른 *T. tubifex*의 생존율, 생물학적 및 스트레스 관련 유전자의 발현과 스트레스 관련 유전자의 분자 반응을 관찰하여 중금속 노출의 독성 영향을 확인하였다. 노출기간 동안 Cd에 노출된 *T. tubifex*의 생존율은 대조군에 비해 노출 시간이 지속됨에 따라 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 2). 상대적으로 저농도 (0.4 mg kg^{-1})와 고농도 (6.09 mg kg^{-1}) Cd에 노출된 개체는 노출 5일에 99%, 98%로 감소하기 시작하여 노출 10일에 93%로 관찰되었다. 1.87 mg kg^{-1} Cd는 노출 6일에 99%로 감소하기 시작하여 노출 10일에 96%의 생존율을 보였다. 이와 같이 Cd 노출에 따른 농도, 시간 의존적인 생존율 감소는 기존에 송사리 (*Oryzias latipes*), 물벼룩 (*Daphnia magna*), 진드기 (*Opbia nitens* Koch) 등을 대상으로 진행된 연구와 유사한 경향을 나타냈다(Barjhoux *et al.*, 2012; Keshavarz Jamshidian *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017). Cd에 노출된 물벼룩 (*Daphnia magna*)은 농도 의존적인 사망률을 보였으며 체내 metallothionein 함량이 $800 \mu\text{g g}^{-1}$ 농도에서 가장 높게 증가하였다(Li *et al.*, 2017). 송사리 (*Oryzias latipes*)의 배체 (Embryo)는 Cd 노출에 대해 생존율은 유의한 차이가 나타나지 않았으나, 대조군에 비해 2와 $20 \mu\text{g g}^{-1}$ 농도에서 척추 기형, 심혈관 이상 등 형태학적 이상 발생 비율이 유의하게 증가하였다(Barjhoux *et al.*, 2012). 49일 동안 Cd 퇴적물에 노출된 진드기 (*Opbia nitens* Koch)는 실

Table 2. River sediment contamination assessment criteria (Ministry of Environment, 2015)

Heavy metal	Sediment quality (mg kg^{-1})			
	I	II	III	III
Cu	< 48	< 228	< 1890	> 1890
Pb	< 59	< 154	< 459	> 459
Ni	< 40	< 87.5	< 330	> 330
As	< 15	< 44.7	< 92.1	> 92.1
Hg	< 0.07	< 0.67	< 2.14	> 2.14
Zn	< 363	< 1,170	< 13,000	> 13,000
Cd	< 0.4	< 1.87	< 6.09	> 6.09
Cr	< 112	< 224	< 991	> 991

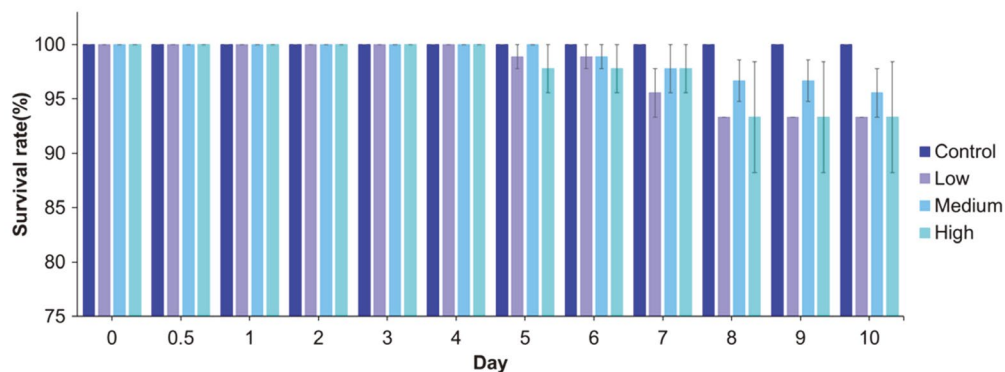


Fig. 2. Cumulative survival rate (%) of *T. tubifex* exposed to different concentrations of Cd-spiked sediment (Control, 0.4 mg kg^{-1} , 1.87 mg kg^{-1} , 6.09 mg kg^{-1}).

험 49일에 생존율이 가장 낮았으며, 노출 농도 중 가장 높은 $400 \mu\text{g g}^{-1}$ 에 노출된 진드기의 체내에서 Cd 축적 농도가 가장 높은 것으로 관찰되었다(Keshavarz Jamshidian *et al.*, 2017). Cd에 노출된 실지렁이 (*T. tubifex*)의 LC50은 787 mg kg^{-1} 로 저서 단각류 (*Hyalella azteca*)와 깔따구 (*Chironomus riparius*)에 비해 Cd에 대한 내성이 높은 것으로 나타났으며 (Milani *et al.*, 2003), 본 연구에서 사용된 Cd 농도는 실지렁이의 치사율에 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다. 따라서, Cd 노출에 따른 실지렁이 생존율 감소는 Cd 독성의 생물영향성을 나타내는 것으로, 기존에 보고된 Cd 노출에 따른 생존율 변화 연구와 유사함을 확인하였다(He *et al.*, 2017; Lobo *et al.*, 2021).

퇴적물 내 Cd 노출에 따른 *T. tubifex*의 체내 Cd 농도를 측정된 결과, 퇴적물 농도에 비해 높은 Cd 축적이 관찰되었다(Fig. 3). 0.4 mg kg^{-1} Cd에 노출된 실지렁이는 노출 10일에 18.4 mg kg^{-1} Cd로 가장 높게 나타났으며 1.87 mg kg^{-1} Cd에서는 노출 1일에 13.06 mg kg^{-1} Cd로 가장 높게 나타난 후, 감소하였다. 또한, 상대적으로 고농도인 6.09 mg kg^{-1} Cd에서는 노출 1일부터 43.75 mg kg^{-1} Cd로 나타나기 시작하여 10일에 79.11 mg kg^{-1} Cd로 가장 높게 나타났다. 실지렁이의 외피는 퇴적물에 직접적으로 노출되며 퇴적물 내 유기물을 섭취하는 경로를 통해 체내 Cd 농축이 일어난다. Cd에 노출된 줄지렁이 (*Eisenia fetida*)를 균질화하여 상층액과 잔여물을 분석한 결과, 상층액의 Cd 농도는 시간이 지남에 따라 증가하였으나, 잔여물의 Cd 농도는 노출 2일까지 증가 후 감소하는 경향을 보였다(Conder *et al.*, 2002). Cd 노출 퇴적물에 21일간 노출된 하루살이 유충 체내 Cd 농도는 시간 의존적인 증가가 관찰되었다(Bartsch *et al.*, 1999). 해양 어류인 yellowstripe goby (*Mugilogobius chulae*)는 퇴적물 내 Cd 노출로 인해 체내에 Cd가 축적되었으며, 소화기관, 아가미, 뼈, 근육 순서로 높은 Cd 농도가 관찰되었다(Guo *et al.*, 2019). Cd 노출에 대한 잉어 (*Cyprinus carpio*)의 체내 농축은 $40 \mu\text{M}$ 노출 농도에서부터 축적되어 농도 의존적인 증가가 관찰되었다(Delahaut *et al.*, 2020). 또한, 실지렁이의 비필수 금속 원소에 대한 조절 능력의 부재로 인해 퇴적물에 비해 체내 Cd 농도가 높아졌으며 (Méndez-Fernández *et al.*, 2013), 말조개 (*Dreissena polymorpha*) 체내 중금속 농도는 필수 금속 원소인 Cu, Zn에 비해 비필수 금속 원소인 Cd이 상대적으로 더 높은 경향을 보였다(Voets *et al.*, 2009). 이외에 필수 금속인 Zn과 비필수금속인 Cd에 12일간 노출된 실지렁이 (*T. tubifex*)는 체내 Zn의 농도가 노출 기간 동안 유지되었으며, Cd 농도는 노출 12일에 증가하였으나 노출 6일과 8일에 감소하는 경향을 보였다(Redeker *et al.*, 2007). Cd에

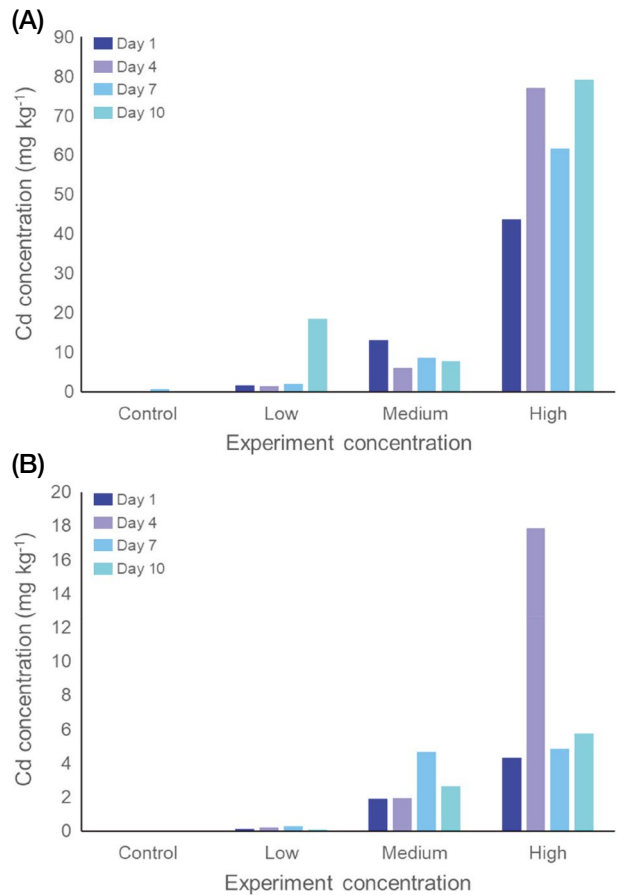


Fig. 3. Cd concentration of *T. tubifex* (A) and Cd-spiked sediment (B).

28일간 노출된 펄조개 (*Anodonta woodiana*)의 조직 중 신장, 외투막 및 아가미는 시간 의존적으로 Cd 농도가 증가하였으나, 간체장과 혈림프는 시간이 경과함에 따라 증가 후 감소하는 경향을 보였다(Jing *et al.*, 2019). Cd 노출 농도에 따라 각 조직의 축적량 차이가 관찰되었으며, 노출 방법에 따라 가장 많이 농축된 조직의 차이가 나타난 연구가 보고되었다(Chandurvelan *et al.*, 2015). 60일간 Cd에 노출된 줄지렁이 (*Eisenia fetida*)는 노출 30일에 체내 Cd 농도가 감소하였으나, 실험 기간 동안 증가하는 경향을 보였다(Scaps *et al.*, 1997). 이는 본 연구와 유사한 결과를 보였으나, 1.87 mg kg^{-1} 에서 Cd 농도가 감소하는 것은 추가적인 연구가 필요하다.

Cd 노출에 따른 *T. tubifex*의 스트레스 반응을 분자유전학적으로 관찰하기 위해 스트레스 관련 유전자인 HSP60, HSP70, GST 유전자의 상대적 발현을 측정된 결과, HSP60은 노출 4일에 0.4 mg kg^{-1} Cd에서 대조군에 비해 상대적으로 낮은 발현을 보였으며 ($P < 0.01$), 노출 10일에

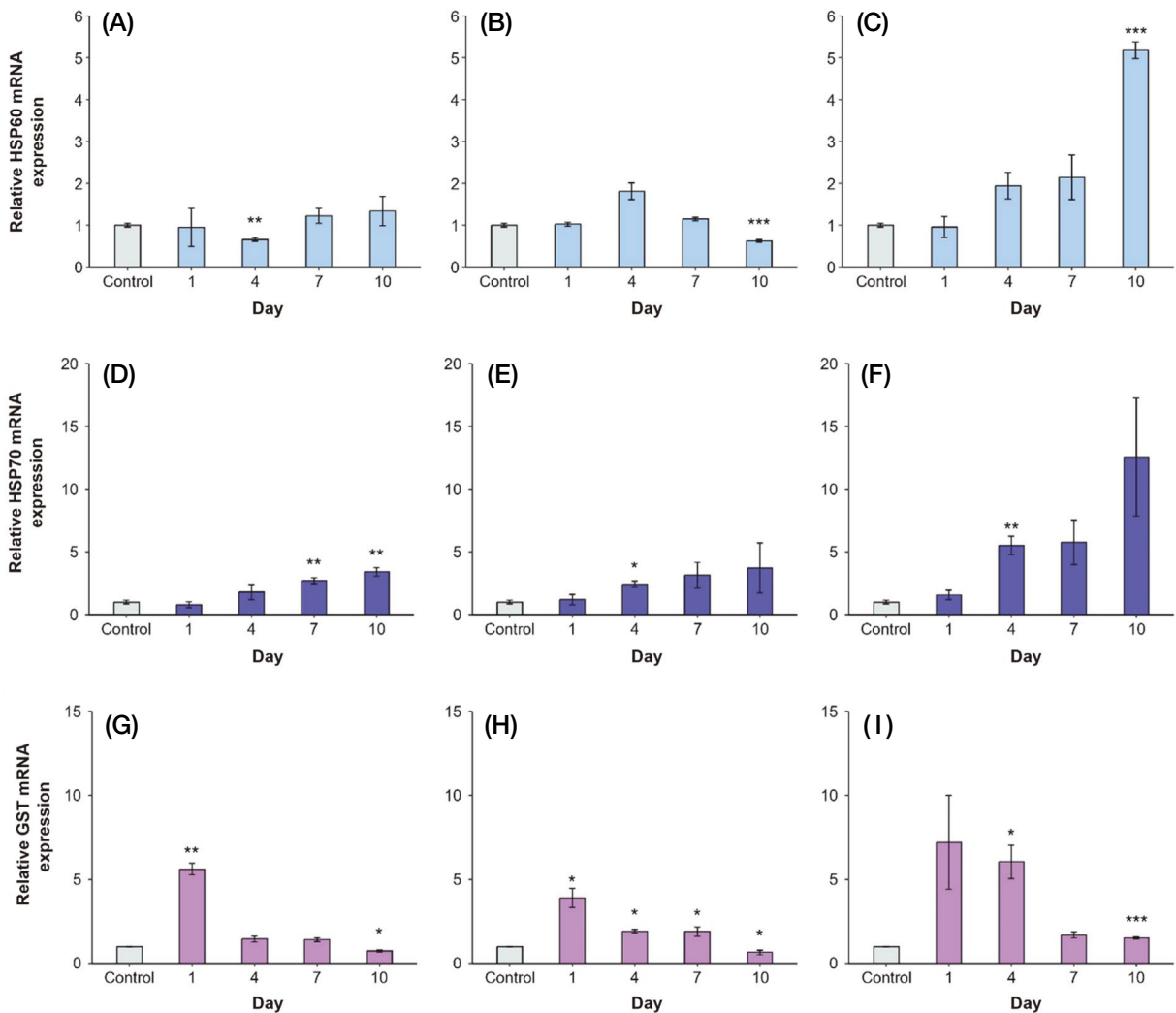


Fig. 4. mRNA expression of stress related genes in *T. tubifex* exposed to different Cd concentration for 10 days (Low: A, D, G; Medium: B, E, H; High: C, F, I). Values were normalized against β -actin. Bars indicate the standard deviation of the mean. Statistically significant differences are represented by asterisks as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.005$, compared to controls (control ratio value = 1).

1.87 mg kg⁻¹ Cd에서 대조군에 비해 낮은 발현을 보였다 ($P < 0.005$). 0.4와 1.87 mg kg⁻¹ Cd에서는 시간과 농도에 따른 차이를 보이지 않았으나, 6.09 mg kg⁻¹ Cd에서 노출 1일에서 10일로 시간이 경과함에 따라 대조군에 비해 높은 발현이 나타났으며 10일의 경우 통계적으로 유의한 수준으로 발현 증가가 나타났다 ($P < 0.005$) (Fig. 4A-C). HSP70은 0.4 mg kg⁻¹ Cd에서 시간에 따라 대조군에 비해 발현량이 증가하는 경향이 관찰되었으며 노출 7, 10일 때 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($P < 0.01$) (Fig. 4D). 또한, 1.87 mg kg⁻¹ Cd에서 노출 4일부터 대조군에 비해 상대적으로 발현이 높은 경향을 보였으며, 이러한 HSP70 증가는 노출 4일째에 통계적으로 유의한 수준으로 나타났다 ($P < 0.05$)

(Fig. 4E). 6.09 mg kg⁻¹ Cd는 노출 1일부터 대조군에 비해 상대적으로 약 10배 이상 높은 발현을 보였으며 4일은 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($P < 0.01$) (Fig. 4F). GST는 모든 농도에서 노출 1일에 대조군에 비해 상대적으로 높은 발현이 나타난 후, 노출 10일까지 발현이 낮아지는 경향을 보였다. 0.4 mg kg⁻¹ Cd에서 노출 1일에 대조군에 비해 약 5배 이상 높은 발현을 보였으나, 10일에 대조군에 비해 낮은 발현이 관찰되었으며 1일과 10일에 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다 ($P < 0.05$) (Fig. 4G). 또한, 1.87 mg kg⁻¹ Cd에서 노출 1일 대조군에 비해 약 4배 이상 높은 발현이 나타났으나, 이후 10일에 더 낮은 발현을 보였으며 모든 기간에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다

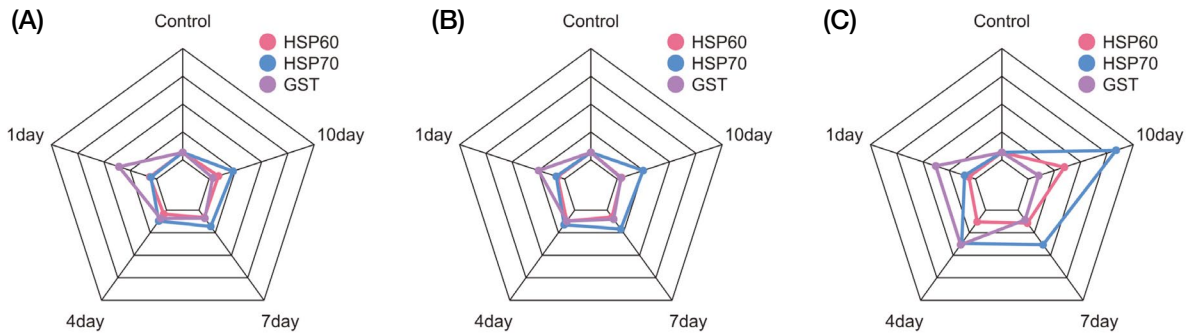


Fig. 5. Biomarker star plots measured of stress related genes expression (HSP60, HSP70, GST) consisted of *T. tubifex* exposed to Cd (A: 0.4 mg kg⁻¹; B: 1.87 mg kg⁻¹; C: 6.09 mg kg⁻¹).

($P < 0.05$) (Fig. 4H). 6.09 mg kg⁻¹ Cd에서도 노출 1일과 4일에 대조군에 비해 높은 발현을 보였으나, 10일에 대조군과 유사한 발현을 보였다. 노출 4일과 10일은 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다($P < 0.05$) (Fig. 4I). HSP60, HSP70, GST 유전자 발현을 농도별로 분석한 결과, 상대적으로 저농도인 0.4 mg kg⁻¹ Cd 노출 1일에 GST 유전자의 발현이 민감하게 반응했으며 노출 10일에 HSP70의 유전자 발현패턴이 가장 민감하게 반응하였다(Fig. 5A). 이러한 경향성은 상대적으로 중간농도인 1.87 mg kg⁻¹ Cd에서도 나타났다(Fig. 5B). 또한, 상대적으로 고농도인 6.09 mg kg⁻¹ Cd에서 노출 1일에는 GST, 노출 10일에는 모든 유전자가 상대적으로 발현이 증가하였으며 HSP70, HSP60, GST 순으로 발현변화가 관찰되었다(Fig. 5C). HSPs 유전자는 열 충격에 의한 스트레스뿐만 아니라 산화 스트레스, 독성물질에 대한 스트레스 반응으로부터 세포를 보호하는 역할을 하며, 면역 세포를 활성화하여 병원체는 막는 역할을 하며, 분자량에 따라 HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 등으로 구분된다(Welch, 1992; Martín-Folgar and Martínez-Guitarte, 2017). HSP60은 샤페론 기능을 하는 단백질로, 단백질을 보호하며, HSP70은 외부 스트레스에 손상된 단백질의 구조를 복구하거나, 분해하여 제거하는 역할을 한다. 플라스틱 가소제인 Diisodecyl phthalate에 노출된 붉은바다거북(*Caretta caretta*)은 HSP60 유전자 발현이 대조군에 비해 3배 상향된 연구가 보고되었다(Cocci *et al.*, 2017). 또한, 7일간 Microsystin-LR에 노출된 미국가재(*Procambarus clarkii*)의 HSP60 유전자의 발현은 대조군에 비해 유의하게 상향되었으며 사육수로 옮겨진 후에 발현이 감소하였다(Yuan *et al.*, 2016). 농업에서 이용되는 살충제인 atrazine과 chlorpyrifos은 각각 428 µg L⁻¹와 11.6 µg L⁻¹ 농도에 노출된 잉어의 비장과 신장의 HSP60 유전자 발현을 대조군에 비해 3배 증가시킨 결과가 나타났다

(Xing *et al.*, 2015). 중금속 Pb에 노출된 민꽃게(*Charybdis japonica*)는 HSP70 유전자 발현이 대조군에 비해 6배 상향되었으며(Xu *et al.*, 2019), 갈따구(*Chironomus riparius*)는 살균제인 Triclosan에 의해 HSP70 유전자 발현이 대조군에 비해 2배 상향된 연구가 보고되었다(Martínez-Paz *et al.*, 2017). 또한, 당뇨병 치료제로 이용되는 metformin에 노출된 홍합은 HSP70 유전자 발현이 대조군에 비해 상대적으로 6배 증가된 결과가 보고되었다(Koagouw *et al.*, 2021). GST 유전자는 외부에서 유입되는 물질에 대해 세포를 보호하는 역할을 담당하는 효소 중 하나로 세포 해독 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Stancová *et al.*, 2015). 또한, GST의 발현은 생물, 조직, 독성물질에 따라 다양한 변화가 나타난다(Blanchette *et al.*, 2007). 방제용 살균제인 boscalid에 노출된 물벼룩은 GST 유전자 발현이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Aksakal, 2020). 또한, 비스테로이드성 항염증제인 ibuprofen에 노출된 물벼룩은 대조군에 비해 GST 유전자의 발현이 감소하였다(Wang *et al.*, 2016). Cd와 Benzo[α]pyrene에 노출된 바지락(*Ruditapes philippinarum*)의 GST 유전자는 노출 3일까지 점차 증가하여 이후 대조군과 유사한 수준으로 감소하였다(Wang *et al.*, 2011). 이는 본 연구에서 Cd 노출독성에 따른 HSP60과 HSP70의 발현 증가는 독성에 반응하는 세포항상성 유지를 위한 단백질들의 변화를 나타내고 면역 및 세포 보호를 위한 분자적 반응을 시사한다. 또한, GST 유전자의 발현 변화는 초기 Cd 독성 노출에 대해 반응하여 증가 후 정상 수준으로 감소하여 산화적 스트레스 유발에 따른 항산화 작용을 나타낸 것으로 제안된다. 본 연구에서 설정된 Cd 농도는 실지렁이의 스트레스 관련 유전자 발현에 영향을 주었으나, 농도에 따른 개체 치사율은 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 기존의 다양한 수생물에서 중금속 및 노출화합물질에 대한 분자유전학적 반응과 유

사하게 실지렁이 *T. tubifex*에서의 Cd 노출독성의 생물농축에 따른 세포적 손상과 활성산소 증가를 제시한다. Cd 노출에 따른 급성, 만성 독성 반응을 나타내는 스트레스 분자마커 유전자의 가능성을 나타내며, 이후 중금속 노출로 인한 유해성을 판단하는 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

적 요

환경에 존재하는 중금속인 Cd은 생물에게 유입되며 먹이사슬을 통해 생물에게 축적된다. 본 연구에서는 카드뮴 노출에 따른 오염지표생물인 실지렁이(*Tubifex tubifex*)의 체내 농축 반응 및 스트레스 유전자 발현 패턴을 분석하기 위해, 퇴적물 내 카드뮴 노출 후 생존을 변화, 체내 농축 농도 측정, 그리고 스트레스 반응 유전자인 열 충격 단백질(HSP60 and HSP70)과 항산화효소인 GST의 발현 패턴을 관찰하였다. Cd 노출 퇴적물에 노출된 *T. tubifex*의 생존율은 노출 10일에 0.4 mg kg⁻¹ Cd에서 93%, 1.87 mg kg⁻¹ Cd에서 96%, 6.09 mg kg⁻¹ Cd에서 93%로 관찰되었다. *T. tubifex*의 체내 Cd 농도는 퇴적물 내 Cd 농도에 비해 높게 나타났으며, 0.4 mg kg⁻¹ Cd에서는 실험 10일에 18.4 mg kg⁻¹ Cd, 1.87 mg kg⁻¹ Cd에서 실험 1일에 13.06 mg kg⁻¹ Cd, 6.09 mg kg⁻¹ Cd에서 실험 10일에 79.11 mg kg⁻¹ Cd로 가장 높게 나타났다. HSP60 유전자 발현은 6.09 mg kg⁻¹ Cd 노출 퇴적물에서 시간 의존적으로 발현이 대조군에 비해 증가였으며, HSP70은 모든 농도에서 대조군에 비해 시간 의존적인 발현의 증가를 보였다. 또한, GST는 모든 농도에서 실험 1일에 대조군에 비해 발현이 증가한 후, 실험 10일까지 발현이 감소하였다. 이러한 연구결과는 퇴적물 내에 존재하는 Cd에 대한 실지렁이의 생태독성학적 및 분자유전학적 독성영향을 확인한 결과로, 환경 내 오염지표종으로 실지렁이를 이용한 환경독성평가의 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

저자정보 김지훈(전남대학교 해양융합과학과 석사과정), 김원석(전남대학교 해양융합과학과 박사과정), 박기연(전남대학교 수산과학연구소 학술연구교수), 광인실(전남대학교 해양융합과학과 교수)

저자기여도 개념설정: 광인실, 과제관리: 광인실, 연구비수주: 광인실, 방법론: 광인실 & 박기연, 분석: 김지훈 & 김원석, 자료제공: 광인실 & 박기연, 자료관리: 김지훈 & 김원석, 원고 초안작성: 김지훈 & 김원석, 원고 교정: 광인실, 박기연, 김지훈, 원고 편집 및 검토: 광인실, 박기연, 김원

석, 김지훈. 모든 저자는 논문의 결과에 동의하였고, 출판될 최종본을 검토하고 동의하였습니다.

이해관계 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

연구비 이 논문은 한국연구재단의 지원(NRF-2018-R1A6A1A-03024314, NRF-2020-R1A2C1013936)과 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원 수생태계 건강성 확보 기술개발사업의 지원(2021003050001)을 받아 수행된 연구임.

REFERENCES

- Aksakal, F.I. 2020. Evaluation of boscalid toxicity on *Daphnia magna* by using antioxidant enzyme activities, the expression of genes related to antioxidant and detoxification systems, and life-history parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **237**: 108830.
- Ali, H. and E. Khan. 2019. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs-Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **25**(6): 1353-1376.
- Barjhoux, I., M. Baudrimont, B. Morin, L. Landi, P. Gonzalez and J. Cachot. 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **79**: 272-282.
- Bartsch, M.R., W.G. Cope and R.G. Rada. 1999. Effects of cadmium-spiked sediment on cadmium accumulation and bioturbation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia bilineata*. *Water, Air, and Soil Pollution* **109**: 277-292.
- Blanchette, B., X. Feng and B.R. Singh. 2007. Marine glutathione S-transferase. *Marine Biotechnology* **9**: 513-542.
- Chandurvelan, R., I.D. Marsden, C.N. Glover and S. Gaw. 2015. Assessment of a mussel as a metal bioindicator of coastal contamination: relationships between metal bioaccumulation and multiple biomarker responses. *Science of the Total Environment* **511**: 663-675.
- Chatterjee, A., R. Bhattacharya, S. Chatterjee and N.C. Saha. 2021. Acute toxicity of organophosphate pesticide profenofos, pyrethroid pesticide λ cyhalothrin and biopesticide azadirachtin and their sublethal effects on growth and oxidative stress enzymes in benthic oligochaete worm, *Tubifex tubifex*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **242**: 108943.
- Cocci, P., M. Capriotti, G. Mosconi and F.A. Palermo. 2017. Effects of endocrine disrupting chemicals on estrogen receptor alpha and heat shock protein 60 gene expression in

- primary cultures of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) erythrocytes. *Environmental Research* **158**: 616-624.
- Conder, J.M., L.D. Seals and R.P. Lanno. 2002. Method for determining toxicologically relevant cadmium residues in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere* **49**(1): 1-7.
- Delahaut, V., B. Rašković, M.S. Salvado, L. Bervoets, R. Blust and G. De Boeck. 2020. Toxicity and bioaccumulation of Cadmium, Copper and Zinc in a direct comparison at equitoxic concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *PLoS One* **15**(4): e0220485.
- Diaconu, M., L.V. Pavel, R.M. Hlihor, M. Rosca, D.I. Fertu, M. Lenz, P.X. Corvini and M. Gavrilescu. 2020. Characterization of heavy metal toxicity in some plants and microorganisms – A preliminary approach for environmental bioremediation. *New Biotechnology* **56**: 130-139.
- Guo, Z., Z. Ni, H. Ye, J. Xiao, L. Chen, I. Green and L. Zhang. 2019. Simultaneous uptake of Cd from sediment, water and diet in a demersal marine goby *Mugilogobius chulae*. *Journal of Hazardous Materials* **364**: 143-150.
- He, Y., B. Men, X. Yang, Y. Li, H. Xu and D. Wang. 2017. Investigation of heavy metals release from sediment with bioturbation/bioirrigation. *Chemosphere* **184**: 235-243.
- Jing, W., L. Lang, Z. Lin, N. Liu and L. Wang. 2019. Cadmium bioaccumulation and elimination in tissues of the freshwater mussel *Anodonta woodiana*. *Chemosphere* **219**: 321-327.
- Keshavarz Jamshidian, M., R.A. Verweij, C.A. Van Gestel and N. M. Van Straalen. 2017. Toxicokinetics and time-variable toxicity of cadmium in *Oppia nitens* Koch (Acari: Oribatida). *Environmental Toxicology and Chemistry* **36**(2): 408-413.
- Koagouw, W., R.J. Hazell and C. Ciocan. 2021. Induction of apoptosis in the gonads of *Mytilus edulis* by metformin and increased temperature, via regulation of HSP70, CASP8, BCL2 and FAS. *Marine Pollution Bulletin* **173**: 113011.
- Li, X., W. Peng, Y. Jiang, Y. Duan, J. Ren, Y. Liu and W. Fan. 2017. The *Daphnia magna* role to predict the cadmium toxicity of sediment Bioaccumulation and biomarker response. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **138**: 206-214.
- Liu, J., L. Cao and S. Dou. 2017. Bioaccumulation of heavy metals and health risk assessment in three benthic bivalves along the coast of Laizhou Bay, China. *Marine Pollution Bulletin* **117**(1-2): 98-110.
- Liu, Y., X. Lin, Z. Hao, M. Yu, Y. Tang, X. Teng, W. Sun and L. Kang. 2023. Cadmium exposure caused cardiotoxicity in common carps (*Cyprinus carpio* L.): miR-9-5p, oxidative stress, energetic impairment, mitochondrial division/fusion imbalance, inflammation, and autophagy. *Fish & Shellfish Immunology* **138**: 108853.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lobo, H., L. Méndez-Fernández, M. Martínez-Madrid, P. Rodríguez, M. Daam and E.L. Espíndola. 2021. Bioaccumulation and chronic toxicity of arsenic and zinc in the aquatic oligochaetes *Branchiura sowerbyi* and *Tubifex tubifex* (Annelida, Clitellata). *Aquatic Toxicology* **239**: 105955.
- Méndez-Fernández, L., M. Martínez-Madrid and P. Rodríguez. 2013. Toxicity and critical body residues of Cd, Cu and Cr in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller) based on lethal and sublethal effects. *Ecotoxicology* **22**: 1445-1460.
- Milani, D., T.B. Reynoldson, U. Borgmann and J. Kolasa. 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* **22**(4): 845-854.
- Ministry of Environment. 2015. Standard for contamination of river and lake sediments. National Institute of Environmental Research No 687.
- Qiao, S., G. Zeng, X. Wang, C. Dai, M. Sheng, Q. Chen, F. Xu and H. Xu. 2021. Multiple heavy metals immobilization based on microbially induced carbonate precipitation by ureolytic bacteria and the precipitation patterns exploration. *Chemosphere* **274**: 129661.
- Scopetani, C., M. Esterhuizen, A. Cincinelli and S. Pflugmacher. 2020. Microplastics exposure causes negligible effects on the oxidative response enzymes glutathione reductase and peroxidase in the oligochaete *Tubifex tubifex*. *Toxics* **8**(1): 14.
- Shahjahan, M., K. Taslima, M.S. Rahman, M. Al-Emran, S.I. Alam and C. Faggio. 2022. Effects of heavy metals on fish physiology – a review. *Chemosphere* **300**: 134519.
- Sharma, P., P. Garai, P. Banerjee, S. Saha, A.V. Chukwuka, S. Chatterjee, N.C. Saha and C. Faggio. 2023. Behavioral toxicity, histopathological alterations and oxidative stress in *Tubifex tubifex* exposed to aromatic carboxylic acids-acetic acid and benzoic acid: A comparative time-dependent toxicity assessment. *Science of The Total Environment* **876**: 162739.
- Şimşek, A., J. Teuchies, H. Haghazar, R. Blust and G. Bakan. 2023. Evaluation of bioaccumulation and toxicity of *Tubifex tubifex* exposed to contaminated river sediment by potentially toxic elements – A case study of the Middle Black Sea, Turkey. *Journal of Geochemical Exploration* **107263**.
- Stancová, V., A. Ziková, Z. Svobodová and W. Kloas. 2015. Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) naproxen on gene expression of antioxidant enzymes in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **40**(2): 343-348.
- Steen Redeker, E., L. Bervoets and R. Blust. 2004. Dynamic model for the accumulation of cadmium and zinc from water and sediment by the aquatic oligochaete, *Tubifex tu-*

- bifex*. *Environmental Science & Technology* **38**(23): 6193-6200.
- Thit, A., G.T. Banta, A. Palmqvist and H. Selck. 2020. Effects of sediment-associated Cu on *Tubifex tubifex* – Insights gained by standard ecotoxicological and novel, but simple, bioturbation endpoints. *Environmental Pollution* **266**: 115251.
- U. S. EPA. 1991. Sediment quality guidelines. Draft report. EPA Region V Chicago II.
- Voets, J., E.S. Redeker, R. Blust and L. Bervoets. 2009. Differences in metal sequestration between zebra mussels from clean and polluted field locations. *Aquatic Toxicology* **93** (1): 53-60.
- Wang, L., L. Pan, N. Liu, D. Liu, C. Xu and J. Miao. 2011. Biomarkers and bioaccumulation of clam *Ruditapes philippinarum* in response to combined cadmium and benzo[α]pyrene exposure. *Food and Chemical Toxicology* **49**(12): 3407-3417.
- Wang, L., Y. Peng, X. Nie, B. Pan, P. Ku and S. Bao. 2016. Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **179**: 49-56.
- Wu, J.P., M.H. Li, J.S. Chen, S.Y. Chung and H.L. Lee. 2015. Disturbances to neurotransmitter levels and their metabolic enzyme activity in a freshwater planarian exposed to cadmium. *Neurotoxicology* **47**: 72-81.
- Wu, X., Y. Jia and H. Zhu. 2012. Bioaccumulation of cadmium bound to ferric hydroxide and particulate organic matter by the bivalve *M. meretrix*. *Environmental Pollution* **165**: 133-139.
- Xing, H., T. Liu, Z. Zhang, X. Wang and S. Xu. 2015. Acute and subchronic toxic effects of atrazine and chlorpyrifos on common carp (*Cyprinus carpio* L.): Immunotoxicity assessments. *Fish & Shellfish Immunology* **45**(2): 327-333.
- Xu, X.H., X. Meng, H.T. Gan, T.H. Liu, H.Y. Yao, X.Y. Zhu, G.C. Xu and J.T. Xu. 2019. Immune response, MT and HSP70 gene expression, and bioaccumulation induced by lead exposure of the marine crab, *Charybdis japonica*. *Aquatic Toxicology* **210**: 98-105.
- Yuan, J., Z. Gu, Y. Zheng, Y. Zhang, J. Gao, S. Chen and Z. Wang. 2016. Accumulation and detoxification dynamics of microcystin-LR and antioxidant responses in male red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Aquatic Toxicology* **177**: 8-18.