곶자왈 지역의 의약품질과 농약의 오염수준과 생태독성영향

강하병*,** · 고수림*** · 최윤송**** · 이상우** · 고영림***** · 오달영***** · 최경호**,*†

*서울대학교 자연과학대학, **서울대학교 보건대학원, ***서울대학교 사범대학
****서울대학교 자유전공학부, *****을지대학교 보건산업대학, *****서울특별시 보건환경연구원

Contamination Levels of Pharmaceuticals and Pesticides in the Gotjawal Regions of Jeju Island and Associated Ecotoxicities

Ha Byeong Kang***, Su Rim Koh***, Yoonsong Choi****, Sangwoo Lee**,
YoungLim Kho*****, Dalyoung Oh*****, and Kyungho Choi**,*†

*College of National Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea

**School of Public Health, Seoul National University, Seoul, Korea

***College of Education, Seoul National University, Seoul, Korea

****College of Liberal Studies, Seoul National University, Seoul, Korea

*****School of Human & Environmental Sciences, Eulji University, Seongnam, Korea

*****Seoul Metropolitan Government Institute of Public Health and Environment

ABSTRACT

Objective: Gotjawal refers to a special geographical designation found in Jeju Province, Korea, where vegetation forms over a rocky area. Due to the important ecological value of Gotjawal, international concern about such areas is growing. However, only limited information is available regarding environmental contamination of Gotjawal. This study was conducted in order to investigate the levels of contamination and associated ecotoxicological effects of surface water bodies in Gotjawal.

Methods: Surface water samples were collected at three sampling sites in two Gotjawal areas and were analyzed for several pharmaceuticals and pesticides in consideration of the potential sources of contamination. The ecotoxicity of the samples was measured using water fleas (*Daphnia magna* and *Moina macrocopa*) and zebrafish (*Danio rerio*). In addition, effects on the gene transcription of zebrafish were investigated following exposure to the samples.

Results: Nine pharmaceuticals were detected in the samples, but none of the target pesticides were detected. Following acute exposure to two surface water samples, the survival of waterfleas was significantly reduced, but reproduction was not affected. In zebrafish, time-to-hatch was delayed and fry survival was decreased in some samples. On the other hand, at the transcriptional level, there were no genes significantly influenced by exposure to the samples.

Conclusion: This is the first study investigating environmental contamination in Gotjawal areas and associated ecotoxicities. Further studies are warranted to identify the cause of acute *Daphnia* toxicity and to determine potential consequences of longer-term exposure in Gotjawal areas.

Keywords: *Danio rerio*, *Daphnia magna*, *Moina macrocopa*, ecosystem

†Corresponding author: School of Public Health, Seoul National University, Tel: 82-2-880-2738, Fax: 82-2-745-9104,
E-mail: kyungho@snu.ac.kr

Received: 28 June 2013, Revised: 5 August 2013, Accepted: 19 July 2013

I. 서 론

꽃자왈은 암석 위에 식생이 엉켜있는 제주도에 위치한 특이한 지대이다. 송시태는 꽃자왈을 구성하는 암괴상 아아 용암류를 꽃자왈용암류로 정의하였고, 꽃자왈용암류의 분포지를 한경-안덕 꽃자왈지대, 애월-꽃자왈지대, 조천-함덕 꽃자왈지대, 구좌-성산 꽃자왈지대로 명명하였다.¹⁾ 지형적 특성으로 인해 꽃자왈은 빗물을 그대로 지하로 투과시켜 지하수를 형성한다. 제주도는 지표수가 적어 식수를 지하수에 의존하기 때문에 지하수를 형성하는 꽃자왈의 기능은 식수원으로서 중요한 의미를 갖는다.²⁾ 한편 지하수로부터 올라오는 습기로 인해 연중 습한 미기후가 형성되어 꽃자왈지대에는 제주 고사리삼과 같이 다른 지역에서 볼 수 없는 특이한 식물 종들이 자생하고 있다.³⁾ 이와 같은 중요성으로 인해 2012년 9월 제주에서 개최된 세계자연보전총회의 의제로 꽃자왈이 선정되었으며 조천-함덕 꽃자왈지대에 위치한 동백동산이 랍사르 습지로 등록되는 등 꽃자왈의 생태적 중요성에 대한 국제적 관심도 증대되고 있다.

꽃자왈은 농사가 어려운 지형이어서 과거에는 버려진 땅으로 인식되었지만 최근 골프산업이 각광받기 시작하면서 꽃자왈 지역에 골프장이 들어서게 되었다. 2012년 5월 기준으로 제주도에서 운영 중이거나 운영 예정인 골프장은 39개이며,⁴⁾ 이 가운데 많은 골프장이 꽃자왈지대나 그 인근에 위치하고 있다. 꽃자왈지대 인근의 골프장은 직접적으로 꽃자왈 생태에 부정적인 영향을 초래할 뿐 아니라 골프장에서 사용되는 농약으로 인하여 환경오염도 초래될 수 있다.

한편 꽃자왈 지역 인근에 위치한 소, 말, 돼지 등을 사육하는 목장들도 꽃자왈의 잠재적인 오염원이 될 수 있다. 즉 목축에 사용하는 동물용 의약품이 꽃자왈지대의 지표수 등 수계를 오염시킬 가능성이 있다. 실제로 다양한 동물용 의약품이 우리나라의 지표수에서 빈번히 검출되어 왔다. 우리나라 4대강 지표수에서 수의약품 중 하나인 sulfamethazine이 최고 802 ng/L의 농도로 검출되었고,⁵⁾ 2010년 울산지역 수계에서도 sulfamethazine이 최고 280 ng/L로 검출되었다.⁶⁾ 그 외에도 국립환경과학원에서 전국 4대강 지표수에서 2006년부터 2009년까지 조사한 결과 sulfathiazole, chlortetracycline, ciprofloxacin, fenbendazole, tylosin 등의 동물용 의약품질들이 검

출되었다.⁷⁾

하지만 현재까지 꽃자왈에 대한 연구는 주로 생태학적인 측면에서 식생, 특히 제주고사리삼을 중심으로 수행되어 왔다.^{3,8-12)} 환경보건 측면의 연구는 꽃자왈의 이용 현황에 대해 고찰한 정광종의 연구⁴⁾를 제외하면 찾아보기 어렵다. 꽃자왈 지역 인근의 오염원으로 인한 물환경 오염과 이로 인한 생태계 영향의 조사 필요성이 제기된다.

본 연구에서는 꽃자왈 지역 인근의 수체를 대상으로 일부 농약 및 의약품물질의 오염 수준과 생태독성 영향을 평가하였다. 이를 위해 조사 지역 인근의 지표수 시료를 수집하여 주요 농약과 의약품물질의 오염 수준을 측정하였다. 생태독성은 두 종의 물벼룩(*Daphnia magna*와 *Moina macrocopa*)과 한 종의 물고기(*Danio rerio*)를 이용하였다. 생태독성의 경우 생존율에 미치는 영향을 주로 평가하였으나 물고기의 경우, 생애 초기의 잠재적 독성영향을 평가하기 위하여 번식과 발달과 관련이 있는 유전자의 발현도 정량 평가하였다. 이 연구는 제주도의 고유한 생태로 환경보건학적 중요성이 큰 꽃자왈 지역의 일부 오염물질 노출수준을 파악하고 적절한 관리대책을 마련하기 위한 기초 자료를 제공하는 측면에서 중요성이 있다.

II. 재료 및 방법

1. 조사지 개황

꽃자왈 근처의 시료 수집이 가능한 수체 중 인근에 목장 또는 골프장 등 오염원이 존재하는 세 곳을 대상 지역으로 선정하였다(Fig. 1).

1.1 한경-안덕 꽃자왈지대(Site 1)

Site 1(N 33°21'24.89", E 126°18'00.64")은 제주도 제주시 한림읍, 한경-안덕 꽃자왈지대 인근에 위치하는 지점으로 인근 마을에 상수도가 설치되기 이전에 주민들이 생활용수로 사용하기 위해 만든 공동우물이다. 이 수체는 꽃자왈지대로부터 약 1.25 km 떨어진 거리에 위치하고 있으며, 인근에 목장이 위치하고 있으며 마을과 인접하고 있다.

1.2 조천-함덕 꽃자왈지대(Site 2와 Site 3)

Site 2(N 33°30'31.69", E 126°43'02.83")와 Site 3(N 33°31'49.59", E 126°43'37.64")은 제주도 제주

Fig. 1. Location of sampling sites within Jeju Island; Site 1 (N 33°21'24.89", E 126°18'00.64"), Site 2 (N 33°30'31.69", E 126°43'02.83"), and Site 3 (N 33°31'49.59", E 126°43'37.64"). The white circles (○) represent sampling sites while the black diamonds (◆) and the black circles (●) represent golf courses and pastures, respectively. (source: Google Maps)

시 조천읍, 조천-함덕 꽃자왈지대에 위치하며, 동백동산으로 불리는 람사르습지의 인근 도로 옆에 위치하는 수체이다. 도로가 건설되기 이전에는 두 수체 모두가 동백동산을 포함하는 조천-함덕 꽃자왈지대에 위치하여 있었다. 따라서 이 두 지점의 수체는 꽃자왈지대에 위치한 지표수라고 할 수 있다. 두 지점 인근에는 여러 축종의 방목지가 있어 가축의 배설물로부터 유출되는 동물용 의약품의 유입 가능성이 있다. 사전조사(2012년 4월 8일)에서도 Site 3 수체에서 가축의 배설물이 발견된 바 있다. Site 3의 경우에는 1차선 도로를 사이에 두고 골프장과 인접해 있어(최단거리 약 200 m) 골프장에서 사용되는 농약이 유입될 가능성도 있다. 한편 Site 2와 Site 3은 도로와 인접하여 있어 때문에 도로 유래 오염물질로 인한 영향도 배제할 수 없다.

2. 시료 채취 및 보관

강수조건을 고려하여 갈수기(1차, 2012년 5월 19

일)와 풍수기(2차, 2012년 7월 28일)에 한차례씩 지표수 시료를 채취하였다. 2012년 5월과 7월 제주의 강수량은 각각 99.0, 207.3 mm이었다. 지표수 시료는 멸균 채수병을 이용하여 채취된 후 즉시 저온상태 (0~10°C)로 유지하여 운송되었고, 실험 전까지 -20°C에서 보관되었다. 보관된 시료는 상온에서 서서히 녹인 후 실험에 사용하였다.

3. 화학분석

3.1 농약

농약의 분석은 환경부에서 고시한 농약잔류량 검사방법¹³⁾을 따라 고독성농약 13종(benfuracarb, endosulfan, EPN, methidathion, parathion, triazophos, demeton-S-methyl, dichlorovos, methamodophos, methomyl, monochrotophos, omethoate, phophamidon)과 기본항목 17종(captane, daconil, oxine-copper, thiophanate-methyl, tolclofos-methyl, carbofuran, chlorpyrifos, cyhalothrin, deltamethrin, diazinon,

dicofol, fenitrothion, phenthoate, pyraclofos, tralomethlin, bensulide, pendimethalin)을 분석하였으며 모든 시약은 AccuStandard사(New Haven, CT, USA)에서 구매하였다. 이들 농약 중 benfuracarb, endosulfan, EPN, methidathion, parathion, triazophos, demeton-S-methyl, dichlorovos, methamodophos, methomyl, omethoate, phophamidon, captane, tolclofos-methyl, chlorpyrifos, cyhalothrin, diazinon, dicofol, fenitrothion, phenthoate, pendimethalin은 다 성분 시험방법으로 분석하였고 monochrotophos, daconil, oxine-copper, thiophanate-methyl, carbofuran, deltamethrin, pyraclofos, tralomethlin, bensulide는 단 성분 시험방법으로 분석하였다. 다성분 시험방법의 경우 간략한 과정은 다음과 같다.

3.1.1 추출

고독성 농약의 경우 시료 500 mL에 포화 NaCl 용액 50 mL와 acetone 100 mL를 혼합한 후 dichloromethane로 50 mL씩 2회 추출하였다. 추출액에 남아 있는 물을 탈수하기 위해 무수 Na_2SO_4 를 넣어 방치한 뒤 여과하였다. 남은 용액은 농축플라스크에 옮겨 40°C 이하의 수욕상에서 감압증류하여 용매를 제거하고 잔류물에 acetone/hexane 혼합액(1:9) 5 mL를 넣어 녹였다. 기본항목 농약의 경우 시료 500 mL에 포화 NaCl 용액 50 mL를 혼합한 뒤 추출을 진행하였고 추출된 용액은 dichloromethane 5 mL를 넣어 녹였다. 다른 조건은 고독성 농약과 같았다.

3.1.2 화학분석

추출된 시료는 GC-NPD 또는 GC-ECD를 이용하여 검출하였다. 가스크로마토그래프의 조작조건과 정량과정은 관련문헌¹³⁾에 따라 진행하였다.

3.2 의약품질

의약품질 분석은 24종(enrofloxacin, sulfamethazine, trimethoprim, sulfathiazole, chlortetracycline, ciprofloxacin, acetaminophen, lincomycin, oxytetracycline, roxithromycin, erythromycin, caffeine, fenbendazole, atenolol, tylosin, terbuthylazine, carbadox, simazin, tiamulin, acetylsalicylic acid, diclofenac, ibuprofen, mefenamic acid, naproxen)을 대상으로 하였으며, 모든 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의

고순도 시약을 사용하였다. 분석 방법은 기존 문헌⁵⁾을 따랐다. 분석방법을 간략히 보이면 다음과 같다.

3.2.1 추출

시료를 약 20 min/L의 여과속도로 여과하여 시료의 부유물을 제거하였다. 여과된 모든 시료에는 내부표준물질로 atrazine-d5를 첨가하였다. 그리고 10 g의 Na_2EDTA 를 첨가한 후 그 농도가 1.25 mg/L가 되도록 시료를 메탄올로 희석하였다. 그 후 1 g HLB 카트리지를 이용하여 Solid-phase extraction(SPE)를 수행하였다. 각 1 L 시료마다 두 개의 카트리지를 준비하고 6 mL의 메탄올과 6 mL의 증류수로 세척을 하였으며, 시료를 카트리지에 2 mL/min과 5 mL/min의 속도로 loading한 뒤, 고정상을 10 mL의 증류수로 세척하였다. 카트리지에 남아있는 물이 증발되어 제거될 때까지 기다린 후, 10 mL의 메탄올로 의약품질을 얻었다.

3.2.2 화학분석

시료는 Mass Selective ZQ2000 quadrupole mass analyzer의 positive ion mode를 이용하여 분석하였다. LC separation은 Waters 2690 system을 이용하여 수행되고, LC/ESI/MS의 조작조건은 기존 문헌⁵⁾을 따랐다. A 용매(aqueous 10 mM ammonium formate with formic acid (90%) and methanol (10%))와 B 용매(10 mM ammonium formate with 0.5 formic acid in methanol)를 9대1로 혼합한 이동상을 0.25 mL/min의 속도로 사용하였다.

4. 생태독성시험

4.1 시험생물

물벼룩 시험생물종은 국제 표준 시험 종으로 사용되는 *Daphnia magna*와 국내 토착종인 *Moina macrocopa*를 사용하였다. 어류 시험생물종은 국제 표준 시험 종인 zebrafish(*Danio rerio*)를 사용하였다. 물벼룩 시험종은 서울대학교 보건대학원 환경독성학 연구실에서 배양하고 있는 개체를 이용하였으며 Zebrafish 수정란은 업체(강남수족관, 수원)에서 공급받아 사용하였다.

4.2 *Daphnia magna* 급, 만성 독성시험

*D. magna*를 이용한 급성 및 만성생태독성시험은 OECD 화학물질 시험 가이드라인 202(*Daphnia* sp.

Acute Immobilization Test)¹⁴⁾와 211(*Daphnia magna* Reproduction Test)¹⁵⁾에 따라 수행하였다. 만성독성 시험의 경우에 대조군(M4 media)과 5개의 농도군 (6.25%, 12.5%, 25%, 50%, 100%)을 배치하였고 반복군은 각각 10개를 두었으며 반복군 당 부화 후 24 시간 미만의 개체를 한 마리씩 배치하였다. 먹이로는 *Selenastrum capricornutum*을 공급하였다. 21일 노출 후 개체의 성장길이를 측정하였고 첫 번째 새끼를 낳는 시기(first day of reproduction), 암컷 한 마리당 산자수(No. of young per female), 1회 산란 시 낳는 산자수(No. of young per brood), 및 생존율을 계산하였다. 노출 기간 동안 2~3일 간격으로 새롭게 제조한 배지로 교체하였으며, 배지 교체시, 온도, pH, 용존산소량, 전기전도도 등 수질 항목을 측정하였다. 만성독성시험에서 농도군의 생존율이 대조군(M4 media)과 유의하게 차이 나는 시료의 경우에는 급성독성시험도 수행하였다. 급성독성시험은 대조군과 5개의 농도군(1차 시료 19.75%, 29.63%, 44.44%, 66.67%, 100%; 2차 시료 40%, 60%, 80%, 100%)을 대상으로 5개의 반복군을 두어 각 반복군 당 부화 후 24시간 미만의 개체를 5마리씩 48시간 동안 노출시켰다. 노출이 진행되는 동안 용액을 교체하지 않았으며 먹이 또한 공급하지 않았다. 노출 48시간 후 immobilization을 관찰하여 48시간 반수영향농도(48 hr EC₅₀)를 계산하였다.

4.3 *Moina macrocopia* 급, 만성 독성시험

*M. macrocopia*에 대한 생태독성시험은 OECD 화학물질 테스트 가이드라인 202(*Daphnia* sp. Acute Immobilization Test),¹⁴⁾ 211(*Daphnia magna* Reproduction Test)¹⁵⁾와 Oh와 Choi¹⁶⁾를 따라 수행하였다. 만성독성시험의 경우에 *D. magna*와 같은 조건이나 노출기간은 7일이었고, 온도는 25°C였다. 측정 지표는 21일 *D. magna* 노출시험과 동일했다. 만성노출 시 농도군의 생존율이 대조군과 유의하게 차이 나는 시료의 경우에는 급성독성시험을 진행하여 48시간 반수영향농도(48 hr EC₅₀)를 계산하였다. 급성독성시험은 온도 25°C, 광주기 16시간:8시간 명암조건으로 급성 *D. magna* 독성시험과 같은 방법으로 수행되었다.

4.4 Zebrafish 독성시험

4.4.1 생태독성시험

Zebrafish 생태독성시험은 OECD 화학물질 테스트 가이드라인 210(Fish, Early-life Stage Toxicity Test)¹⁷⁾을 참고하여 진행하였다. Site 1의 시료량이 부족하여 지표수 시료에 따라 희석배율을 다르게 하였다. 즉 Site 1은 시료 원액(100%)만을 노출에 사용하였으나, Site 2와 Site 3의 경우에는 각각 50% 및 100% 시료를 노출에 사용하였다. 대조군(conditioned water)과 농도군별로 반복군 4개를 두었고, 각 반복군에는 수정 후 24시간 미만의 수정란을 20개씩 배치하였다. 온도 25±1°C, 광주기 16시간:8시간 명암조건에서 10일 동안 노출이 수행되었다. 먼저 부화율 및 부화 소요 시간을 측정하였다. 부화 후에도 동일한 조건으로 노출을 진행하였고 먹이는 하루에 세 번씩 Topmeal®(Jae-il Food, Korea)을 공급하였다. 노출 기간 동안 노출 용액은 매일 한 번씩 교체하였으며, 용액을 교체할 때마다 온도, pH, 용존산소량, 전기전도도 등 수질 항목을 측정하였다. 총 10일 동안의 노출이 끝난 후 각 반복군의 부화율, 부화 소요 시간, 생존율을 관찰하였다. 각 농도군에서 무작위로 5마리씩 추출하여 길이를 측정하였으며, 반복군별 10마리씩 반복군별 10마리씩 무작위로 추출하여 한 농도군 당 총 30마리를 모으고 이를 이용하여 일부 mRNA의 발현을 측정하였다.

4.4.2 mRNA 발현 분석(quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)

추출된 RNA 시료를 이용하여 paired box gene 8(*pax8*, 등록번호: XM_001339857), hematopoietically expressed homeobox(*hhx*, 등록번호: NM_130934.1), vitellogenin 1(VTG1, 등록번호: AF406784), vitellogenin 3(VTG3, 등록번호: AF254638)의 발현을 측정하였다. 이 유전자들의 mRNA 발현을 분석하기 위하여 qPCR을 사용하였다. qPCR에 사용한 primer의 정보는 Table 1에 정리되었다.

Total RNA 준비는 RNeasy minikit(Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)을 사용하였다. 정제된 RNA 시료는 실험에 사용되기 전까지 -80°C에 보관되었다. Total RNA로부터 합성한 complementary DAN를 이용하여 mRNA 발현을 정량하였다. Reverse transcription PCR에 사용할 complementary DNA를 합성하기 위한 반응 시료는 0.5 mg의 RNA, 0.5 µL의 reverse transcriptase(5 U/µL), 0.25 µL의 ribonuclease

Table 1. Gene names, accession numbers, and sequence information for the primers that were evaluated in zebrafish^a

Gene name	Accession number	Description	Gene sequence(5'--3')
β -actin	AF057040	Forward	CGAGCAGGAGATGGGAACC
		Reverse	CAACGGAAACGCTCATTGC
VTG1	AF406784	Forward	TCCATTGCTGAAAACGACAA
		Reverse	TGCATTACGACACCTCTCA
VTG3	AF254638	Forward	GGTGGTCTTGGACTTGGTT
		Reverse	CACAGGAGAGGATGGGATTT
hhex	NM_130934.1	Forward	GCGAGAGACAGGTCAAAACATG
		Reverse	TTCAGGCGCCTCCATTTC
pax8	XM_001339857	Forward	AAGACCCCTGTCGTTCCAATC
		Reverse	AAACTCGTACTGCAGGGATCCA

^a All PCR reactions were performed at 60°C.

inhibitor(40 U/ μ L), 1 μ L, 10 mM의 deoxyribonucleotide triphosphates, 0.5 μ L의 oligodeoxythymidylic acid primer가 모두 10 μ L의 부피가 되게 하여 준비하였다. 반응은 25°C에서 5분, 42°C에서 40분, 85°C에서 5분, 4°C에서 5분의 조건으로 진행하였다. Reverse transcription이 끝난 뒤, 합성된 complementary DNA는 ABI 7300 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems, CA, USA)을 이용하여 증폭되었다. Polymerase chain reaction mixture에는 10 μ L의 SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, CA, USA)와 3.4 μ L의 RNase-free water, 3.0 μ L의 complementary DNA template, 그리고 forward primer와 reverse primer가 각각 1.8 μ L씩 포함되었다. 이 mixture는 다음과 같은 조건에서 반응이 진행되었다. 50°C에서 2분, 95°C에서 10분을 진행한 뒤, 95°C에서 15초를 40 cycle 진행하였고, 60°C에서 1분을 진행하였다. PCR product를 primer-dimer와 DNA 오염물과 구별하기 위한 melting curve analysis는 마지막 cycle의 60°C 단계에서 수행되었다. PCR product의 양을 threshold cycle (Ct) number로 구하여 PCR 결과를 정량화하였다(Ct method¹⁸⁾). 정량화를 위한 reference gene으로 β -actin을 사용하였다. Zebrafish의 초기 발달단계에서 β -actin은 xenoestrogen인 17 α -ethinylestradiol에 노출되어도 발현이 안정적으로 유지되어¹⁹⁾ 많이 사용되는 reference gene이다.

5. 통계분석

Probit 분석을 이용하여 물벼룩 급성독성시험의

median effective concentration(EC₅₀)과 95% 신뢰구간을 구하였다. 물벼룩 만성독성시험의 생존율의 무영향농도(no observed effect concentration, NOEC)를 구하기 위해서 Fisher's Exact test가 사용되었다. 이를 위해 Toxstat (version 3.5, West Inc., Cheyenne, WY, USA) 프로그램이 이용되었다. 다른 종말점들에 대하여 대조군과 농도군 간의 비교는 SPSS 12.0 K for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 수행되었다. 비교에 앞서 Shapiro-Wilk test로 정규성을 확인하였고 Levene's test로 분산의 동질성을 확인하였다. 정규성과 분산의 동질성이 확보된 경우에는 Dunnett's one-way analysis of variance (ANOVA) test를 적용하였고 그렇지 않은 경우에는 비모수방법(Kruskal-Wallis test와 Mann-Whitney U test)을 적용하였다. 모든 분석에서 p value가 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. 대상 물질의 검출 수준

25종의 대상 의약품질 중 대상 시료에서 검출된 물질은 모두 9종(sulfamethazine, caffeine, fenbendazole, tylosin, tiamulin, acetylsalicylic acid, diclofenac, ibuprofen, mefenamic acid)이었다. 가장 높은 농도로 검출된 물질은 인체 및 동물 소염진통제 용도로 사용되는 acetylsalicylic acid 로서, 최고검출농도 3.07 μ g/L이었다. 강장제 등으로 사용되는 caffeine은 최고검출농도 0.12 μ g/L로 두 번째로 높은 수준으로

Table 2. Levels of pharmaceuticals detected in the surface water samples collected near Gotjawal areas

Pharmaceuticals	Site 1		Site 2		Site 3	
	May, 2013	July, 2013	May, 2013	July, 2013	May, 2013	July, 2013
Sulfamethazine	13.4	3	ND	ND	ND	ND
Caffeine	116	77	35.9	46.1	41.4	84.6
Fenbendazole	2.7	ND	16.8	2.1	ND	1.4
Tylosin	4	ND	8.9	ND	ND	ND
Tiamulin	3	ND	ND	ND	ND	ND
Acetylsalicylic acid	3070	1240	2960	2330	2760	2900
Diclofenac	8.7	2.1	0.9	2	0.8	3.3
Ibuprofen	8.4	1.5	2.1	2.9	1.6	4.4
Mefenamic acid	ND	2.8	ND	ND	ND	5.1

Unit in ng/L,

ND: not detected. Limit of detection is 3.3 ng/L for sulfamethazine, 1.5 ng/L for caffeine, 1.1 ng/L for fenbendazole, 4.6 ng/L for tylosin, 2.1 ng/L for tiamulin, and 2.3 ng/L for mefenamic acid.

Table 3. 21d survival NOEC and 48h survival EC₅₀ of *D. magna* and *M. macrocopa* after chronic or acute exposure to the surface water samples

Sampling event	Site	<i>D. magna</i>		<i>M. macrocopa</i>	
		21d survival NOEC	48h immobilization EC ₅₀ (95% CI)	7d survival NOEC	48h immobilization EC ₅₀ (95% CI)
May 2013	1	>100% ^a	- ^b	>100% ^a	- ^b
	2	50%	77.74% (67.62-87.86)	50%	- ^c
	3	12.50%	168.22% (72.20-264.23)	50%	69.23% (56.04-82.41)
July 2013	1	>100% ^a	- ^b	- ^d	- ^d
	2	50%	- ^c	>100% ^a	- ^b
	3	>100% ^a	- ^b	>100% ^a	- ^b

^a There was no concentration of significantly different effect on survival.

^b No experimental data due to insignificant results of chronic tests.

^c Unable to calculate EC₅₀ due to little immobilization in acute test.

^d No experimental data due to not enough sample.

검출되었다. 그 외에도 diclofenac과 ibuprofen과 같은 소염진통제 성분이 모든 시료에서 검출되었다(Table 2). 한편 분석대상으로 선정한 30종의 농약 성분은 검출한계 이상 검출된 물질이 단 한 물질도 발견되지 않았다(유효측정농도 0.0005 mg/L 이상).

2. 물벼룩 독성영향

*D. magna*와 *M. macrocopa*의 급, 만성독성시험의 생존율 결과는 Table 3에 정리하였다. 1차수집시료 중 Site 2, Site 3과 2차수집시료 중 Site 2에서 *D. magna* 만성노출 결과 대조군에 비해 유의한 생존율

감소가 관찰되었다. *M. macrocopa* 만성독성시험의 경우에도 1차수집시료 중 Site 2, Site 3에서 유의한 생존율 감소가 관찰되었다. 만성독성시험에서 유의한 생존율 감소를 보인 시료에 대하여 급성독성시험을 수행한 결과, 1차수집시료 중 Site 2와 Site 3에서 *D. magna*의 48시간 EC₅₀은 각각 77.74%와 168.22%로 산정되었고, 1차수집시료 중 Site 3에서 *M. macrocopa*의 48시간 EC₅₀은 69.23%로 산정되었다.

*D. magna*와 *M. macrocopa* 만성노출시험결과 번식능력(첫 번째 새끼를 낳는 시기, 암컷 한 마리당 산자수, 1회 산란시 낳는 산자수)의 유의한 약영향은

Fig. 2. Effect on (A) time-to-hatch and (B) fry survival after 10 d exposure. The results are shown as mean $\pm$ standard deviation of four replicate. Asterisk indicates significant difference from control ($p < 0.05$). Non-parametric methods were applied for both end points.

관찰되지 않았다. 암컷 한 마리당 산자수와 1회 산란시 낳는 산자수가 오히려 대조군에 비해 유의하게 증가하거나 첫 번째 새끼를 낳는 시기가 대조군에 비해 빨라지는 농도군이 관찰되었다(data not shown). *D. magna* 만성독성시험에서 2차수집시료 중 Site 1의 100% 농도군에서 유의한 성장길이 감소가 관찰되었고, Site 2의 25%와 50% 농도군에서는 오히려 반대의 경우가 관찰되었으나 그 외의 노출군에서는 유의한 차이가 보이지 않았다(data not shown).

3. Zebrafish 독성영향

Zebrafish 수정란과 치어에 시료를 10일 동안 노출시킨 결과 모든 농도군에서 대조군에 비해 부화소요 시간이 지연되었고, 1차수집시료 중 Site 1의 100% 농도군을 제외한 모든 농도군에서 생존율이 대조군

Fig. 3. Transcription of (A) *hhx*, (B) *pax8*, (C) *VTG 1* and (D) *VTG 3* genes in zebrafish after 10 d exposure to the water samples. The results are shown as mean $\pm$ standard deviation of three replicate. There was no significant difference between control group and exposure groups ($p < 0.05$). ANOVA was applied for *hhx* while Non-parametric methods were applied for *pax8*, *VTG 1*, and *VTG 3*.

Table 4. Comparison of pharmaceutical concentrations detected in different surface water bodies of Korea

Pharmaceuticals	Sampling Region/year				LogK _{ow}
	Jeju/2012 ^a	Ulsan/2010 ^b	Han River/2005 ^b	Korean major 4 rivers/2006~2009 ^c	
Sulfamethazine	8.2 (2/6)	24 (12/19)	11.5 (2/12)	24.2	0.27 ^f
Caffeine	66.8 (6/6)	81 (18/19)	183.5 (11/12)	52.5	-0.07 ^h
Fenbendazole	5.7 (4/6)	-	-	5.2	NA
Tylosin	6.5 (2/6)	-	-	11.5	1.6 ^e
Tiamulin	3.0 (1/6)	-	-	-	5.9 ^e
Acetylsalicylic acid	2543.3 (6/6)	-	-	36.8	1.19 ^g
Diclofenac	3.0 (6/6)	9 (3/19)	-	12.6	4.02 ^d
Ibuprofen	3.5 (6/6)	19 (13/19)	-	67.0	3.5 ^g
Mefenamic acid	4.0 (2/6)	45 (19/19)	-	36.0	5.12 ⁱ

Data indicate mean (detection frequency) with unit in ng/L

^a this study

^b Kwon *et al.*, 2011⁶⁾

^c NIER, 2010⁷⁾

^d NIER, 2009²⁶⁾

^e Halling-Sørensen, 2000²⁷⁾

^f Teixidó *et al.*, 2011²⁸⁾

^g Stuer-Lauridsen *et al.*, 2000²⁹⁾

^h Karnjanapiboonwong *et al.*, 2010³⁰⁾

ⁱ Kim *et al.*, 2009³¹⁾

에 비해 감소되었다(Fig. 2). 특히 1차수집시료의 Site 2의 100%와 Site 3의 50%, 그리고 2차수집시료의 Site 3의 100% 농도군에서 치어 생존율의 유의한 감소가 관찰되었다(Fig. 2B).

노출 후 zebrafish 치어에서 유전자의 발현을 측정 한 결과 모든 농도군에서 대조군에 비해 *hhex* 유전자의 발현이 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3A). *VTG1*과 *VTG 3* 유전자는 두 농도군을 제외한 모든 농도군에서 발현이 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 3C, 3D).

IV. 고 찰

꽃자왈 인근의 지표수에서 9종의 의약품질이 검출된 것은 이 지역 인근에 의약품질 오염원이 존재함을 시사한다. 이 지역에서 검출된 의약품질의 농도를 기존에 우리나라 수계에서 검출된 농도와 비교한 결과(Table 4), 꽃자왈 지역의 수계 중 acetylsalicylic acid는 우리나라 4대강에서 보고된 농도에 비해 약 70배 높았다. 반면에 ibuprofen과 mefenamic acid는 울산 수계와 4대강에서 검출된 농도에 비해 10배 이

상 낮았다.^{6,7)} 그 외의 항목들에서는 모두 10배 이하의 차이를 보였다. 하천에서 검출되는 인체용 의약품질의 경우 대부분 하수처리시설로부터의 유입이 중요한 경로지만⁹⁾, 하수처리시설로부터의 유입경로가 없는 본 연구의 대상 지표수에서 의약품질이 검출되었다는 것은 주목할 만 하다. 본 연구에서 검출된 의약품질의 대부분은 LogK_{ow} 값이 2 이하로 생분해도 빠르고 환경 중 잔류성이 낮은 것으로 추정된다(Table 4).²⁰⁾ 하지만 모든 시료에서 acetylsalicylic acid와 caffeine처럼 LogK_{ow}이 낮은 의약품질들이 검출되었다는 것은 이 물질들이 환경으로 지속적으로 유입되고 있음을 의미한다.

시료채취 시기에 따른 꽃자왈 인근 지표수의 의약품질 농도 양상은 시료채취 지점에 따라 다르게 나타났다(Table 2). Site 1의 경우는 검출된 9종의 의약품질 중 mefenamic acid를 제외한 8종에서 풍수기에 수집한 2차시료에서 검출 농도가 감소하였다. 그러나 Site 3의 경우에는 검출된 6종의 의약품질 모두 2차 수집시료에서 높은 농도로 측정되었다. Site 2의 경우에는 의약품질마다 시기에 따라 다른 증감양상을 보였으나 그 차이는 크지 않았다. 풍수기 시

료인 2차시료의 경우 회석에 의하여 의약품질 농도가 낮아질 것으로 예상하였으나 Site 3의 경우 그러한 양상이 관찰되지 않은 이유는 설명이 필요하다. 의약품질의 환경 중 노출 경로에 대한 더 자세한 연구가 필요하지만, 강우로 인한 비점오염원으로부터의 유입을 그 원인의 하나로 추정할 수 있을 것이다. 두 차례 채취된 시료에서 의약품질 농도가 시기별 강수량에 따라 다른 양상을 보였으나 예상과 다른 강수패턴으로 인하여 두 시료가 본래 목적처럼 유량 상황을 적절하게 대표하지는 못하였던 것으로 판단된다. 2012년 5월과 7월 제주의 강수량은 각각 99.0, 207.3 mm로, 2012년의 월 강수량의 평균이 187.4 mm(표준편차 174.5 mm) 인 것을 고려하면 1차 시료 채취 시점(2012년 5월 19일)은 갈수기 조건을 대표할 수 있지만, 각각 601.9와 499.1 mm인 8월과 9월의 강수량을 고려할 때 2차 시료 채취 시점 7월 28일은 풍수기 조건을 대표하지는 못한다. 이 점은 연구의 제한점이라 할 수 있다.

물벼룩 두 종(*D. magna*, *M. macrocopa*)과 물고기 한 종(*D. rerio*)에 미치는 독성을 평가한 결과 일부 시료에서 생존율에 미치는 부정적 영향이 관찰되었으나 시료 수집 시기에 따라서 그 양상은 달라졌다. 물벼룩 독성시험 결과를 보면 주로 풍수기 시료인 2차 시료에서 만성노출에 의한 독성이 감소하는 양상이 관찰되었고 이러한 추세는 일부 급성독성 시험 결과에서도 관찰되었다(Table 3). Zebrafish를 대상으로 한 독성시험에서도 그 차이가 크진 않지만 두 시료 수집시기에 따라 다른 독성양상을 보였다. Zebrafish에 시료를 노출시킨 결과 1차수집시료 중 Site 2의 100%와 Site 3의 50% 농도군에서 유의한 생존율의 감소가 나타났지만 2차수집시료의 경우에는 Site 3의 100% 농도군에서만 생존율 감소가 관찰되었다(Fig. 2B). Zebrafish 독성시험결과에서는 뚜렷한 경향이 나타나지는 않았지만 물벼룩 두 종을 이용한 독성시험결과와 2차 수집시료에서 일관성 있게 생태독성의 감소 경향을 보인 것은 시료에서 검출된 의약품질의 농도 경향과는 일치하지 않는 결과이다. 이는 시료 중에 의약품질 이외의 생태독성 유발물질이 존재함을 시사하며, 이에 대한 추가적인 조사가 요구된다. 한편 물벼룩 만성독성시험 결과 일부 농도군에서 번식 지표가 오히려 증가한 결과를 보였는데, 이는 시료 내에 존재하는 영양물질에 의한 영향

으로 추정된다. Zebrafish를 대상으로 한 독성시험 결과 부화소요시간의 지연이 관찰되었다. 통계적 유의성을 보이지는 않았지만 모든 농도군에서 부화 소요 시간의 지연 추세가 일관성 있게 관찰되었다. 부화시간의 지연은 포식자에 의한 피식의 가능성을 높이기 때문에 개체수 감소에 영향을 초래할 수 있다.²¹⁾

Zebrafish 수정란과 치어에 10일 간 시료를 노출시킨 후 zebrafish 치어에서 mRNA의 발현을 측정하고 결과 통계적인 유의성은 없었지만 *hhex* 유전자의 발현이 모든 농도군에서 대조군에 비하여 증가하였고(Fig. 3A), *VTG 1* 유전자와 *VTG 3* 유전자의 발현이 대부분의 농도에서 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 3C, Fig. 3D). 반면 *pax8* 유전자는 경향성이 없는 발현 양상을 보였다(Fig. 3B). *hhex*와 *pax8*은 zebrafish의 갑상선 발달과정에서 갑상선 여포의 분화와 형성에 중요한 역할을 하는 유전자로 갑상선 발달의 지표 유전자로 사용된다.²²⁾ Zebrafish 치어는 4-6일 이내로 난황낭에 있는 모체에서 유래된 갑상선 호르몬을 소모하기 때문에 그 후에는 갑상선의 기능이 중요하다.²²⁾ 갑상선 독성 영향 물질로 알려진 perfluorooctanesulfonate(PFOS)를 zebrafish 수정란에 노출시킨 연구에서 수정 후 96시간 후에 *hhex*와 *pax8*의 mRNA 발현을 측정하고 결과 중간 농도(0.1, 0.5, 1 mg/L)에서 *hhex*와 *pax8*의 mRNA 발현이 모두 유의하게 증가한 반면 고농도(3, 5 mg/L)에서는 *hhex*의 mRNA 발현만 유의하게 증가하였다.²³⁾ 반면 PFOS를 zebrafish 수정란에 노출시킨 뒤 수정 후 7일과 10일에 각각 *hhex*와 *pax8*의 mRNA 발현을 측정하고 결과 두 시점에서 모두 *hhex*와 *pax8*의 발현이 유의하게 감소하여²⁴⁾ 갑상선 독성을 나타내는 물질에 의한 두 유전자의 발현양상은 발달시기에 따라 다른 양상을 나타내는 것으로 보인다. 본 연구에서는 *hhex*와 *pax8* 유전자의 발현 양상을 PFOS와 같은 갑상선 독성 물질의 오염을 의미한다고 해석하는 것은 무리이다. 하지만 노출시킨 모든 지표수에서 *hhex*의 발현 증가 등은 갑상선 발달에 영향을 줄 수 있는 물질의 존재 가능성을 의미할 수 있다. 발달 단계에 따른 유전자 발현의 변화를 관찰하는 등의 추가적인 연구가 필요하다. Vitellogenin(VTG)은 난황 단백질의 전구체로, 물고기의 estrogenic compound에 대한 reproduction과 관련된 내분비계 교란의 biomarker로 사용된다.²⁵⁾ *VTG 1*과 *VTG 3*

유전자의 발현이 비슷한 패턴으로 대부분의 농도군에서 증가한 것은 단백질 수준에서 관찰을 하는 것과 같은 더 자세한 연구의 필요성을 제기한다.

V. 결 론

본 연구는 제주의 특이한 생태계인 꽃자왈 지역의 환경오염과 생태독성 영향을 평가한 첫 사례로 의미가 있다. 비록 이 연구에서 측정한 농약 및 의약품 질만으로 관찰된 독성을 설명할 수 없었지만, 꽃자왈 지역의 지표수가 다양한 의약품질로 오염되어 있음을 확인하였다. 또한 갑상선 및 생식선 등 내분비계 영향물질의 노출을 시사하는 분자생물학적 지표의 관찰을 통하여 꽃자왈의 환경오염이 생태학적인 영향으로 이어질 수 있는 가능성을 제기하였다. 이 연구의 결과는 향후 꽃자왈의 환경관련 연구의 기초 자료로 활용도가 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학창의재단(학부생연구프로그램사업)의 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

1. Song S-T. Distributions and lithology of the aa rubble flows in Cheju Island, Korea. [dissertation]. [Pusan]: Graduate School Pusan National University; 2000.
2. Song S-T. Lavas in Gotjawal Terrain, Jeju Island, Korea No. 3, Doneori Gotjawal Lava. *J Basic Sciences, Cheju Nat'l Univ.* 2003; 16: 47-55.
3. Moon M-O. Pteridophyte Flora of Jeju Island. Korea. [dissertation]. [Jeju]: Jeju National University; 2008.
4. Jeong KJ. A study on perception and use of Gotjawal in Jeju Island. *Journal of Photogeography.* 2012; 22(2): 11-28.
5. Choi K, Kim Y, Park J, Park CK, Kim MY, Kim HS, Kim P. Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Sci Total Environ.* 2008; 405(1): 120-128.
6. Kwon HO, Sim WJ, Kim HY, Oh JE, Choi SD. Distribution of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in main rivers of Ulsan, Korea. *J Korea Soc Environ Anal* 2011; 14(3): 158-164.
7. NIER (National Institute of Environmental Research). Environmental Risk Assessment of Pharmaceutical Residues (III). 2010.
8. Yang KS, Kim SY, Kim WT. Community Analysis of the Moths in the Gotjawal Terrains of Jeju Island, Korea. *J Ecol Field Biol.* 2006; 29(4): 365-379.
9. Yang KS, Kim SY, Kim WT. Fauna and Relative Abundance of the Insects Collected by Black Light Traps in Gotjawal Terrains of Jeju Island, Korea (Exclusion of Lepidoptera). *J Ecol Field Biol.* 2006; 29(2): 85-103.
10. Kang H, Shin S. Sex ratios and spatial structure of the dioecious tree *Torreya nucifera* in Jeju Island, Korea. *J Ecol Field Biol.* 2012; 35(2): 111-110.
11. Lee K-M, Shin J-H, Jeong H-M, Kim H-R, Kim J-H, Shin D-H, You Y-H. Characteristics of vegetation structure and habitat of *Mankyua chejuense* (Ophioglossaceae), endangered plant in Korea. *J. of Wetlands Research.* 2012; 14(1): 35-45.
12. Jeon HS, Yang KS, Lee GE, Kim WT. Community Characteristics of Ground Beetles in Four Gotjawal Terrains of Jeju Island, Korea. *Korean J Environ Biol.* 2008; 26(3): 226-232.
13. Korea Ministry of Environment. Regulation on Test Methods for Pesticide Usages and Residuals in Golf courses (Ministry of Environment 2011-4). 2011.
14. OECD. OECD Guidelines for testing of chemicals: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, OECD Test Guideline 202. 2004.
15. OECD. OECD Guidelines for testing of chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Test Guideline 211. 2008.
16. Oh S, Choi K. Optimal conditions for three brood chronic toxicity test method using a freshwater macroinvertebrate *Moina macrocopa*. *Environ Monit Assess.* 2012; 184(6): 3687-3695.
17. OECD. OECD Guidelines for testing of chemicals: Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD guideline 210. 1992.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-408.
19. Muncke J, Eggen RIL. Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem.* 2009; 25(10): 2734-2741.

20. Wild S, Berrow M, Jones K. The persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge amended agricultural soils. *Environ pollut.* 1991; 72(2): 141-157.
21. Han S, Choi K, Kim J, Ji K, Kim S, Ahn B, Yun J, Choi K, Khim JS, Zhang X, Giesy JP. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat Toxicol.* 2010; 98(3): 256-264.
22. Elsalini OA, Gartzen J, Cramer M, Rohr KB. Zebrafish *hhex*, *nk2.1a*, and *pax2.1* regulate thyroid growth and differentiation downstream of Nodal-dependent transcription factors. *Dev Biol.* 2003; 263(1): 67-80.
23. Shi X, Du Y, Lam PK, Wu RS, Zhou B. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 230(1): 23-32.
24. Kim S, Ji K, Lee S, Lee J, Kim J, Kho Y, Choi K. Perfluorooctane sulfonic acid exposure increases cadmium toxicity in early life stage of zebrafish, *Danio rerio*. *Environ toxicol chem.* 2011; 30(4): 870-877.
25. Hansen PD, Dizer H, Hock B, Marx A, Sherry J, McMaster M, Blaise C. Vitellogenin—a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal Chem.* 1998; 17(7): 448-451.
26. NIER (National Institute of Environmental Research). Environmental Risk Assessment of Pharmaceutical Residues (II). 2009.
27. Halling-Sørensen B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere.* 2000; 40(7): 731-739.
28. Teixidó M, Pignatello JJ, Beltrán JL, Granados M, Peccia J. Speciation of the ionizable antibiotic sulfamethazine on black carbon (biochar). *Environ Sci Technol.* 2011; 45(23): 10020-10027.
29. Stuer-Lauridsen F, Birkved M, Hansen L, Holten Lützhøft HC, Halling-Sørensen B. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere.* 2000; 40(7): 783-793.
30. Karnjanapiboonwong A, Morse AN, Maul JD, Anderson TA. Sorption of estrogens, triclosan, and caffeine in a sandy loam and a silt loam soil. *J Soil Sediment.* 2010; 10(7): 1300-1307.
31. Kim JW, Ishibashi H, Yamauchi R, Ichikawa N, Takao Y, Hirano M, Koga M, Arizono K. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *J Toxicol Sci.* 2009; 34(2): 227-232.