

중금속이 성계의 배아형성에 미치는 영향에 관한 연구

유 춘 만

전남대학교 자연과학대학 생물학과

A Study on the Effect of Heavy Metals on Embryos Formation of Sea Urchins

Chun Man Yu

Dept. of Biology, Chonnam National University, Kwangju, Korea

ABSTRACT

This study was attempted to carry out the effects of heavy metals when sea urchins (*Hemicentrotus pulcherrimus*, *Anthocidaris crassispina*, *Scaphhechinus brevis*) formed early embryos. Results of the experiment for the effects of heavy metals on the development of sea urchins, in most sea urchins, the ranking of heavy metals according to decreasing effects upon fertilization and development of urchin eggs was follows: Hg, Cu, Zn, Cd, Ni, Cr, Pb, As, and Fe. In addition, in most heavy metals, the ranking of experimental animals according to decreasing effects upon fertilization and development of urchin eggs in the same concentration of heavy metals was follows: *H. pulcherrimus*, *A. crassispina*, and *S. brevis*.

Keyword : *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Anthocidaris crassispina*, *Scaphhechinus brevis*

I. 서 론

최근 급속한 경제성장과 산업화의 촉진으로 대규모의 공업화가 이루어지면서 연안지역에 공업단지가 조성되고 인구의 도시집중으로 대량의 생활하수 및 각종 산업폐수와 중금속 등의 독성이 강한 여러 가지 난분해성 물질들의 수계(水系)유입은 연안해양 오염의 가속화와 생태계 파괴, 자연의 동·식물과 인간의 건강을 위협하고 있으며, 현대사회의 새로운 문제로 대두되고 있다. 이중 주된 해양 환경오염원의 하나인 중금속 물질들은 생물체의 여러 흡입 경로를 통해 체내에 흡수되어지며, 생화학적으로 안정된 특성을 가지고 있어 저농도라 하더라도 생물조직에 영구적으로 존재하여 만성독성 및 급성독성을 야기시키며, 먹이연쇄를 통해 최종적으로 인간에게 누적되어 피해를 주고 있기 때문에 이와같은 피해를 방지하기 위해 생물체의 중금속에 대한 내성연구가 이루어지고 있다.^{1,3)}

자연 상태에서 금속은 해수의 자연 성분이며 토양과 암석의 풍화, 채광 활동이나 화산 폭발 등으로 부

터 유래한다. 금속 가운데 많은 것이 생물에 대해서 필수적이다. 예컨대 척추동물과 많은 무척추동물에서 발견되는 호흡 색소인 헤모글로빈(haemoglobin)은 철을 함유하고 있으며, 많은 연체 동물과 고등 갑각류의 호흡 색소인 헤모시아닌(haemocyanin)은 구리를 포함한다. 피낭류의 호흡 색소에는 바나듐이 들어 있고 많은 효소가 아연을 포함하며 비타민 B₁₂ 효소는 코발트를 함유한다. 이처럼 금속은 생물체에 저농도에서는 필수적이거나 고농도에서는 유독한 전이 금속류인, 철, 구리, 코발트, 망간 등이 있으며, 일반적으로 대사 활동에 요구되지 않으며 매우 낮은 농도에서 세포에 유독한 중금속 또는 준 금속류인, 수은, 납, 비소 등이 있다.⁴⁾

이러한 견지에서 본 연구는 해양유류사고, 도시의 생활하수, 농업배수 및 임해공단의 산업폐수, 수산·어업활동에 따른 직·간접적인 오염 등 다양한 발생원으로부터 연안해양으로 유출되는 중금속이 저서생물(benthos)로서 우리나라 대부분의 연안해양에 서식하고 있는 성게 즉, 분류학적으로 극피동물문(Echinodermata)의 하나인 말뚝성게(*Hemicentrotus*

pulcherrimus), 보라성게(*Anthocidaris crassispina*), 무늬연잎성게(*Scaphhechinus brevis*)의 초기 배발생과 성장에 미치는 영향에 대해 알아보고 이들 실험동물을 지표 생물로 이용한 해수환경의 수질평가와 성체의 환경·생태학적인 특성을 연구하는데 기초자료로 이용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 채집

본 연구에 사용된 실험동물은 분류학적으로 극피동물문의 하나인 말뚝성게, 보라성게, 무늬연잎성게로써 연안해역의 암반이나 사질성 연안이 주 서식처이며, 전라남도 여천군 돌산면 방죽포와 여수시 오동도연안에서 채취, 서식처와 유사한 환경조건을 조성하여 운반하였다(Fig. 1).

2. 방정과 방란

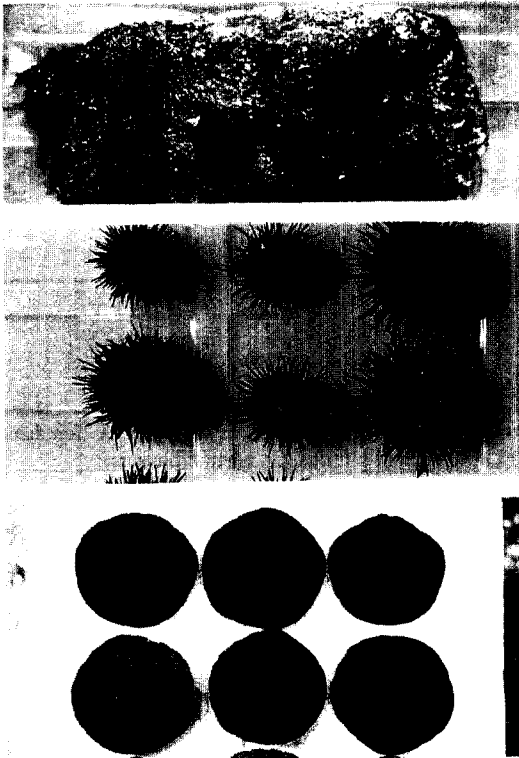


Fig. 1. Test animals.

- *Hemicentrotus pulcherrimus* (the upper part)
- *Anthocidaris crassispina* (the middle part)
- *Scaphhechinus brevis* (the lower part)

실험동물의 방정과 방란에 사용하기 위한 자연해수는 GF/C(pore size 1.2 μ m)로 여과한 후 2조의 황성탄 충전 칼럼(Φ 25 cm \times 100 cm)으로 처리하여 GF/C로 반복 여과한 것을 이용하였으며, 이 여과된 자연해수를 50 ml의 비이커에 가득채운 후 성체의 생식공이 충분히 잠기게 한 다음 0.5M의 KCl 용액 0.5-1 ml를 체강내에 1-2 ml를 주입, 20-30분 동안 방정, 방란을 시켰다. 방정·방란을 유도하여 얻은 배우자를 자연해수로 정자는 1회, 난자는 3회 반복 세정하여 실험에 사용하였다.^{5,6)}

3. 중금속의 농도별 조성

본 실험에 사용된 중금속은 Cd(CdCl_2), Cr($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), Cu(CuCl_2), Hg(HgCl_2), Fe(FeCl_2), Zn($\text{NO}_3)_2$, As(As_2O_3), Ni(NiCl_2), Pb($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)이며, 실험동물의 배우자와 배아를 노출시킬 중금속 시료는 여과된 자연해수와 중금속 990 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 표준용액을 이용하여 각 농도별로 조성하였다.

4. 배우자를 이용한 생물검정

중금속에 따라 각각 다른 농도로 조성된 시료에 방정과 방란을 통해서 얻은 정자를 60분 동안 각 시료에 노출시킨 후, 난자를 접종, 수정막 형성률과 정상적인 유생 형성률에 중점을 두어 관찰했으며, 수정막 형성률은 난자 접종 20분 경과 후, 시험액 5 ml을 일회용 시험관에 분주하여 10%의 초산으로 고정시켰으며, 정상적인 유생 형성률의 관찰은 난자를 첨가한 말뚝성게의 경우 64시간, 보라성게 48시간, 무늬연잎성게 24시간 후 10%의 초산으로 고정시킨 다음 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.⁷⁻¹²⁾

5. 배양조건

실험동물의 초기 발생단계의 배양온도 조건은 말뚝성게는 16 $^{\circ}\text{C}$, 보라성게와 무늬연잎성게는 20 $^{\circ}\text{C}$ 의 배양기에서 정체 배양하였고, pH는 8 ± 1 , 염분도는 30 ± 1 의 배양조건을 조성하였다. 정자와 난자의 비율은 1000:1 정자와 시험액과의 비율은 $5\times 10^6/50\text{ ml}$ 로 hemacytometer counting chamber(Neubauer)을 이용하여 조절하였다.⁷⁻¹²⁾

6. 시료의 관찰 및 자료의 처리

시료의 관찰은 수정막 형성의 여부와 정상적인 유생 형성률에 중점을 두어 관찰하였으며, 대조군(여과된 자연해수 처리군)과 비교하여 normal과 abnormal

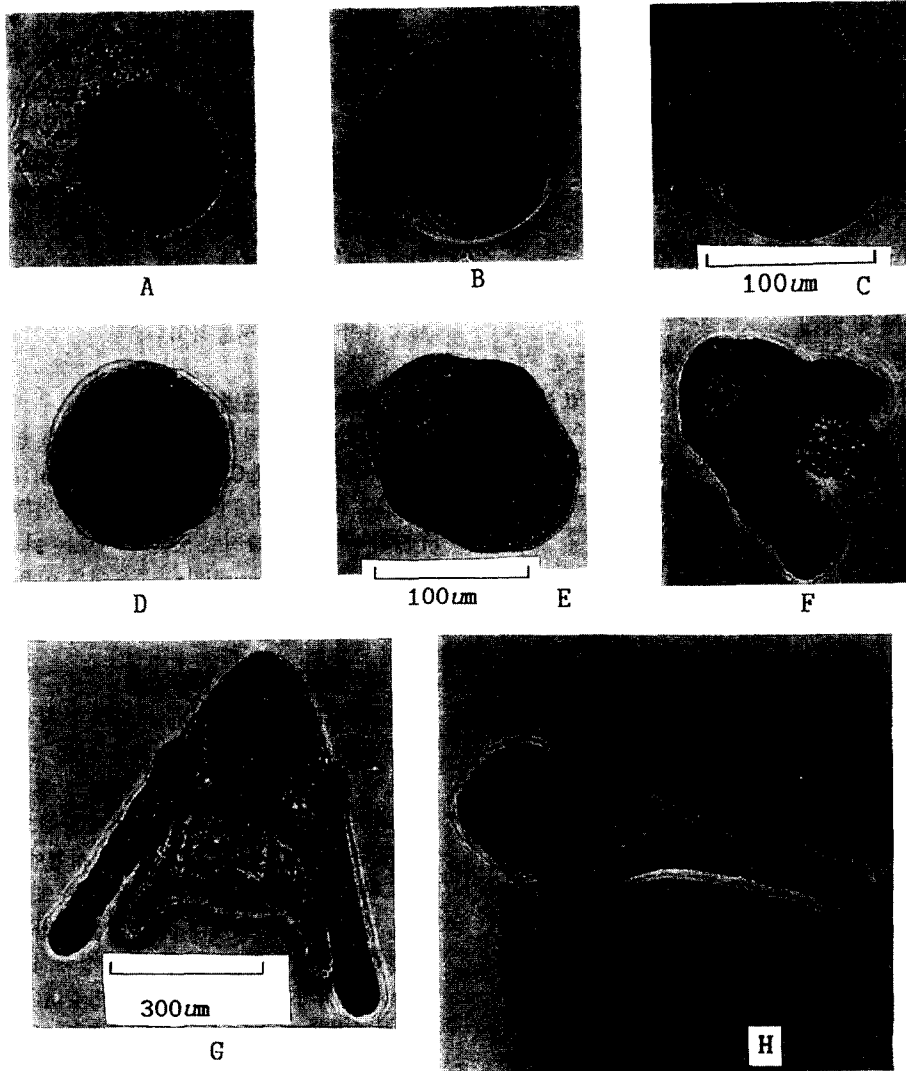


Fig. 2. Diagnostic features of the main development stage from fertilized egg to pluteus in sea stars. A: fertilized egg. B: 2-cell. C: 4-cell. D: Blastula, E: Late gastrula. F, H: Anormal pluteus. G: normal pluteus.

(정상크기의 1/2이하인 것, laval malformation)으로 구분하여 관찰하였다(Fig. 2).

또한 본 실험의 생물검정은 모두 3회이상의 동일한 실험을 실시하였고, 관찰에 있어 배아를 100개이상 계수하여 나타난 결과를 백분율로 환산·처리하였다.^{7,12)}

III. 결과 및 고찰

말뚝성계, 보라성계, 무늬연잎성계의 배우자(정자와 난자)와 배아를 이용하여 Cd, Cr, Cu, Hg, Fe,

Zn, As, Ni, Pb이 각 실험동물의 배아형성에 미치는 영향에 대한 실험결과를 토대로 EC50을 설정해 본 결과, Table 1과, Table 2와 같은 결과를 얻을 수 있었으며, Table 3은 각 실험동물의 초기 배발생에 미치는 중금속의 저해 정도를 보여주고 있으며, 대부분의 실험동물에서 $Hg > Cu > Zn > Cd > Ni > Cr > Pb > As > Fe$ 의 순으로 초기 배발생에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

또한, 실험동물 중, 초기 배발생에 있어 동일한 농도의 중금속에 가장 민감한 반응을 보이며 발생에

Table 1. EC 50 of heavy metals for sea urchins to form fertilization membrane

Heavy metals	Testing animals		
	<i>H. pulcherimus</i>	<i>A. crassispina</i>	<i>S. brevis</i>
	EC(50) ppm		
Hg	0.025±0.005	0.015±0.004	0.072±0.010
Cu	0.035±0.005	0.023±0.005	0.072±0.011
Zn	0.092±0.014	0.033±0.013	0.151±0.053
Ni	0.503±0.063	0.052±0.010	2.267±0.489
Cd	0.723±0.137	0.071±0.023	0.206±0.062
Pb	1.805±0.379	1.687±0.377	4.534±0.903
Cr	3.053±0.743	1.344±0.327	3.044±0.727
As	4.245±0.811	3.632±0.228	3.122±0.536
Fe	3.812±0.723	5.244±0.908	8.211±1.097

[Each number is the average±standrd error for separate three experiments]

Table 2. EC 50 of heavy metals for sea urchins to form normal pluteus

Heavy metals	Testing animals		
	<i>H. pulcherimus</i>	<i>A. crassispina</i>	<i>S. brevis</i>
	EC(50) ppm		
Hg	0.022±0.005	0.013±0.003	0.042±0.013
Cu	0.034±0.007	0.022±0.006	0.051±0.011
Zn	0.072±0.012	0.015±0.005	0.106±0.044
Ni	0.423±0.072	0.383±0.013	1.477±0.406
Cd	0.465±0.103	0.052±0.013	0.153±0.028
Pb	1.543±0.275	1.520±0.308	4.507±0.542
Cr	2.027±0.735	0.512±0.231	3.343±0.406
As	3.121±0.728	3.473±0.8.33	2.521±0.427
Fe	3.543±0.782	4.520±0.842	7.174±1.230

[Each number is the average±standrd error for separate three experiments]

Table 3. Ranking of heavy metals according to decreasing effects upon fertilization and development of sea urchins

Testing animals	Fertilization membrane formation	Pluteus and bipinnaria formation
<i>H. pulcherimus</i>	Hg Cu Zn Ni Cd Pb Cr As Fe	Hg Cu Zn Ni Cd Pb Cr As Fe
<i>A. crassispina</i>	Hg Cu Zn Ni Cd Cr Pb As Fe	Hg Zn Cu Ni Cd Cr Pb As Fe
<i>S. brevis</i>	Hg=Cu Zn Cd Ni As=Cr Pb Fe	Hg Cu Zn Cd Ni As Cr Pb Fe

있어 가장 큰 피해를 받는 실험동물은 보라성게 > 말뚝성게 > 무늬연잎성게의 순으로 나타났다.

1995년 Kobayashi¹³⁾의 중금속이 여러 종류의 성게(*H.pulcherrimus*, *S.drebachiensis*, *A.crassispina*, *S.purpuratus*, et al)의 초기 배발생에 미치는 영향에 관한 연구의 보고에 의하면, 중금속 중 Hg이 초기 배발생에 가장 큰 피해를 보였으며, Cu, Zn, Ni, Cd, Pb, Cr, Mn, Co순으로 성게의 초기 발생에 영향을 미친 것으로 보고 한 바 있다. 각 실험동물에 미치는

중금속의 영향에 있어 본 연구의 결과는 Kobayashi의 연구결과와 순서적으로 약간을 차이를 보이는데 이는 실험동물이 서로 다르며, 설령 같은 종이라 할지라도 환경·생태학적인 종의 특이성에서 그 원인을 찾을 수 있다. 또한 Kobayashi의 1981¹⁴⁾년 연구보고에 의하면, Cu, Zn, Cd, ABS, NH₃가 말뚝성게와 보라성게의 초기 발생에 미치는 영향의 경우, Cu > Zn > Cd > ABS > NH₃의 순으로 피해를 보임을 보고 한 바 있다.

또한, 1989년 Dinnel 등¹⁵⁾은 여러 종의 성게(*S. droebachiensis*, *S. purpuratus*, *C. aggregata*, *et al*)의 초기 배발생과 성체에 Ag, Cu, Cd가 미치는 영향에 관한 연구 보고에서 Cd > Cu > Ag순으로 초기 배발생과 성체의 성장에 저해를 보임을 보고 한 바 있다.

여러 중금속들은 성체와 불가사리의 정자의 활성과 운동성을 둔화시키는 등, 수정을 하는 과정에 있어 생리적인 현상에 영향을 미치고, 배발생을 하는데 있어 소화대사경로(respiratory metabolic pathways)에 독성을 나타내어 초기 배발생에 저해를 입히게 된다.⁴⁾

수용액으로부터 중금속 흡수는 일부 미생물과 성체의 유생의 경우에 능동수송계에 좌우되지만 동식물에서는 일반적으로 표면에서의 흡착에 의해서, 그리고 표면세포, 체액등의 성분으로 결합함으로써 이루어지는 수동확산을 통해서 이루어진다. 동물에 대한 또 다른 중요한 경로는 금속이 음식에 흡착하거나 속에 존재할 경우와 이매패(二枚貝)의 아가미 같은 먹이집합 기작에 의해 입자성 또는 교질상의 금속을 흡수하는 경우이다. 동식물이 체내의 금속농도를 조절할 수 있는 정도에는 상당한 변화가 있다. 식물과 이매패 연체류는 중금속 농도를 조절하는 데 미숙하다. 십각류(十脚類)와 어류는 일반적으로 아연과 구리 같은 필수 금속을 조절할 능력을 갖고 있으나 수은과 카드뮴 같은 필수적이 아닌 금속의 조절은 능력이 훨씬 떨어진다.⁴⁾

해양 생물의 금속농도가 동일 금속의 수중농도 보다 수배나 더 높다는 사실은 금속이 해양의 먹이연쇄상에서 생물학적 확대에 의해 고영양단계에서 점진적으로 농축된 것이라는 추측을 야기시켜왔다. 다랑어, 황새치, 최상위영양단계 육식동물 등에서 발견되는 높은 수은 농도는 생물학적 확대설과 일치한다.⁴⁾

참고문헌

- Norris, P. R. and Kelly, D. P.: Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **99**, 317-324, 1977.
- Bert, L. V. and Ulmer, D. D.: Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 91-128, 1972.
- Dial, N. A.: Methylmercury. Teratogenic and lethal effects in frog embryos. *Teratol.* **13**, 327-334, 1976.
- 심재형: 海洋汚染과 生態系. 137-156, 1991.
- Kobayashi, N.: Marine ecotoxicological testing with echinoderms. *Ecotoxicological Testing for The Marine Environment.* **1**, 798, 1984.
- Fujisawa, H.: Differences in temperature dependence of early development of sea urchins with different growing season. *Reference Biol.* **176**, 96-102, 1989.
- Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E. and Giordano, G. G.: pH-induced Changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis. II. exposure of sperm. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **5**, 113-121, 1985a.
- Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E., and Giordano, G. G.: pH induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis. I. exposure of embryos. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **5**, 101-112, 1985b.
- Dinnel, P.A. and Stober, Q. J.: Crumeley and R.E. Nakatain. Development of a sperm cell toxicity test for marine waters. in *Aquatic Toxicity and Hazard Assessment*. 82-98, 1982.
- Dinnel, P. A., Link J. M. and Stober, Q.J.: Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine water. *Arch Environ Contam Toxicol.* **16**, 23-32, 1987.
- Davydov, P.V., Shubrayvi, O. I. and Vassetzky, S. G.: The starfish *Asterina pectinifera*. Animal species for developmental studies. 287-311, 1990.
- Brown, A. C. and Greenwood, J. J.: Use of the sea urchin *parachinus angulosus* (leske) in determining water quality and acceptable pollution levels for the south african marine environment. *South African J. Sci.* **74**, 102-103, 1978.
- Kobayashi, N.: Bioassay data for marine pollution using echinoderms. *Encyclopedia of Environmental Control Technology* **9**, 539-609, 1995.
- Kobayashi, N.: Comparative toxicity of various chemicals, oil extracts and oil dispersant extracts to canadian and japanese sea urchin eggs. *Publ. Seto Mar. Bio1. Lab.* XXVI (1/3), 123-133, 1981.
- Dinnel, P. A., Link, J.M., Stober, Q.J., Letourneau, M. W. and Roberts, W. E.: Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **18**, 748-755, 1989.