

## 성계를 이용한 해수의 생물학적평가에 있어 온도가 미치는 영향

유 춘 만 · 조 기 안\*  
전남대학교 생물학과 · 초당대학교 환경공학과  
(1998년 7월 20일 접수)

### The Effects of Temperature on Biological Evaluation of Seawater with Seurchins

Chun-Man Yu and Ki-An Cho\*

Dept. of Biology, Chonnam National University, Kwangju, Korea  
\*Dept. of Env. Engineering Chodang University, Mu An Gun, Korea  
(Manuscript received 20 July, 1998)

This study was done to research the effects of temperature on biological evaluation of seawater quality using gametes, embryos and early development system of seurchin species, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Anthocardaris crassispina* and *Scaphechinus brevis*.

As the result of performing effects of temperature on early embryo development, the conditions of appropriate temperature on formation of normal pluteus were appropriate at 5-16°C for *H. pulcherrimus*, 8-20°C for *A. crassispina*, 12-20°C for *S. brevis*.

The conditions of optimum temperature on biological evaluation were 16°C for *H. pulcherrimus* and 20°C for *A. crassispina* and *S. brevis*.

Key words : Embryos, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Anthocardaris crassispina*, *Scaphechinus brevis*

#### 1. 서 론

과학문명의 발달로 인해 환경에 영향을 미치는 유해화학물질도 수많은 종류가 개발되었다. 만약 이들 유해화학물질이 환경 내에 복합된 요소로 구성되어 있을 경우, 유해화학물질의 농도가 환경에 극저농도로 존재할 경우, 이를 전통적인 방법, 즉 이화학적 방법을 통해 환경에 미치는 요인물질의 정확한 파악은 어렵다. 또한 환경요인을 복잡적이고 종합적으로 파악하기엔 많은 시간과 경제적인 비용이 소요되고 생물체에 미치는 영향을 파악하기는 지극히 어렵다. 또한 배출된 유해화학물질의 환경 중에서의 이동과 변환으로 인하여 광역적이고 장기간에 걸친 오염도의 축적을 파악하기란 더욱 더 힘들다.

이러한 이화학적 방법의 단점을 보완코자 근래에 들어 동·식물 플랑크톤, 미생물, 원생생물, 강장동물, 극피동물, 선형동물, 다모류, 연체동물, 갑각류, 어류 등을 이용하여 종합적이고 광역적으로 오염정도를 확인하는 생물학적 조사방법인 생물검정법 또는 지표생물을 이용한 생물학적 환경감시가 요구된다.

생물을 이용한 수환경오염의 판정법은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 하나는 장기간의 영향(만성 유해도)을 조사하는 것으로 실제로 그 장소에 오래 살고 있는 생물, 특히, 그다지 이동하지 않는 저서생물 등의 종류, 개체수 등

을 조사하는 것이다. 또 다른 하나는 그 장소의 어떤 시점에서의 환경이 특정생물에 대해 끼치는 비교적 단시간의 영향(급성 유해도)을 조사하는 것으로서 무엇이 얼마만큼, 어떠한 상태로 포함되어 있는지 잘 모르는 때라도 생물에 대한 영향을 알 수 있는 방법이다.<sup>1)</sup>

성계의 배우체와 배아는 1800년대 중반부터 발생학과 세포학 분야 등에서 기본적인 실험재료로 사용되어 왔었다.<sup>2)</sup> 1920년대와 30년대에 걸쳐서 성계의 배우체 및 배아와 초기 발생계를 이용한 환경·생물·생태학적인 연구가 시도되었으며 성계의 수정과 발생에 미치는 금속이온의 영향에 대해 Lillie<sup>3)</sup>와 Hoadley<sup>4)</sup>에 의해 시도된 바 있다. 1950년대에 이르러 자연해수에서의 성계의 수정과 발생에 미치는 금속이온의 영향에 대한 연구가 이루어진 바 있다.<sup>5)</sup> 1970년대에는 Kobayashi에 의해 일본연안의 자연해수가 성계의 초기 배 발생계에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되어 해수의 수질판정에 있어 효율적인 생물검정 재료로 인정받게 되었다.<sup>6-8)</sup> 또한, 중금속이 성계의 배 발생계에 미치는 연구,<sup>9-11)</sup> 온도가 성계의 성장에 미치는 영향<sup>12-14)</sup>에 대한 연구 등, 성계의 초기 배 발생의 생물검정을 이용한 환경오염 및 독성물질에 관한 연구와 이들의 성장에 미치는 여러 환경요인에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

이러한 관점에서 본 연구는 해양수질 오염의 정도를 종합적으로 판정할 수 있는 생물학적 평가방법, 즉 해산 무척추동물의 하나인 성게(sea urchins)의 배우체(gametes) 및 배아(embryos)와 초기 발생계를 이용한 생물검정을 하는 데 있어 배양온도가 실험동물의 초기 배 발생에 미치는 영향을 밝힘으로써 보다 정확한 생물검정을 실행하는 데 지표로 삼고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험동물 및 채집

본 연구에 사용된 실험동물은 보라성게(*Anthocidaris crassispina*), 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*), 무늬연잎성게(*Asterias amurensis*)로써 연안해역의 암반이나 사질성 연안이 주 서식처이며, 전라남도 여천군 돌산면 방죽포와 여수시 오동도연안에서 채취, 서식처와 유사한 환경조건을 조성하여 운반하였다.

### 2.2. 방정과 방란

실험동물의 방정과 방란에 사용하기 위한 자연해수는 GF/C(pore size 1.2 $\mu$ m)로 여과한 후 2조의 활성탄 충전 칼럼( $\phi$  25 cm  $\times$  100 cm)으로 처리하여 GF/C로 반복 여과한 것을 이용하였으며, 이 여과된 자연해수를 100ml의 비이커에 가득채운 후 성게의 생식공이 충분히 잠기게 한 다음 0.5M의 KCl용액으로 체강내에 1-2 ml를 주입시킨 후, 20-30분 동안 방정, 방란을 시켰다. 방정·방란을 유도하여 얻은 배우자를 자연해수로 정자는 1회, 난자는 3회 반복 세정하여 실험에 사용하였다.<sup>11,12)</sup>

### 2.3. 배양조건

실험동물로부터 채취한 난자와 정자의 첨가비율은 1 : 1000으로 조절하였으며, 시수에 정자를 노출시키기 위한 정자의 수는  $5 \times 10^6/50$  ml가 되게 조정하였다. 배양용기는 borosilicate 재질의 100 ml 배양병을 사용하여 배양액의

용량을 50 ml로 하였다. 배양기간 동안에 유지되어진 배양온도는 모든 실험동물에 있어 각각 5 $^{\circ}$ C, 8 $^{\circ}$ C, 12 $^{\circ}$ C, 16 $^{\circ}$ C, 20 $^{\circ}$ C, 24 $^{\circ}$ C, 28 $^{\circ}$ C의 어두운 장소에서 정체 배양하였다.<sup>15,16)</sup>

### 2.4. 배우자를 이용한 생물검정

여과된 자연해수를 borosilicate 재질의 100 ml 배양병에 50 ml로 채운 후, 방정과 방란을 통해서 얻은 실험동물의 정자와 난자를 동시에 접종, 수정시킨 다음, 각각의 배양온도에서 배양하였다. 수정란 형성부터 16 세포기 발생 단계까지는 배 10분마다, 16 세포기 발생단계부터 Pluteus 유생단계까지는 배 시간마다 일회용 시험관에 분주하여 10%의 초산으로 고정시킨 다음 광학현미경을 이용하여 발생정도를 관찰하였다.<sup>13,14,16)</sup>

### 2.5. 시료의 관찰 및 자료의 처리

시료의 관찰은 2 세포기, 4 세포기, 8 세포기, 16 세포기, morula stage, blastula stage, gastrula stage, pluteus 유생으로 나누어 각각의 발생단계에 50% 이상이 도달하였을 때를 기준으로 하였다. 본 실험의 생물검정은 모두 3회 이상의 동일한 실험을 실시하였다.<sup>12)</sup>

## 3. 결과 및 고찰

보라성게와 말뚝성게 그리고 무늬연잎성게의 초기 배 발생에 온도가 미치는 영향을 알아보려고 5 $^{\circ}$ C, 8 $^{\circ}$ C, 12 $^{\circ}$ C, 16 $^{\circ}$ C, 20 $^{\circ}$ C, 24 $^{\circ}$ C, 28 $^{\circ}$ C의 서로 다른 배양온도 조건에서 배아 형성과정을 관찰하였다.

그 결과, 보라성게의 경우, 8 $^{\circ}$ C부터 28 $^{\circ}$ C 배양조건의 시료에서는 pluteus 유생이 관찰되었으나, 5 $^{\circ}$ C의 배양조건의 시료에서는 4 세포기 이하의 배아 만이 관찰되었다. 또한 8 $^{\circ}$ C, 12 $^{\circ}$ C, 16 $^{\circ}$ C, 20 $^{\circ}$ C의 배양조건의 시료에서는 95% 이상의 정상적인 pluteus 유생이 관찰되었으며, 반면 24 $^{\circ}$ C와 28 $^{\circ}$ C의 시료에서는 각각 22%, 39%의 비정상적인 pluteus 유생(정상크기의 1/2이하인 것, laval malformation, prepluteus embryos)이 관찰되었다(Table 1).

Table 1. Effect of temperature on the time or the relative developmental velocity for *Anthocidaris crassispina* embryos to arrive each developmental stage Numbers indicate times (minutes) taken for 50% of the embryos to arrive at each stage. Each number is the average  $\pm$  standard error for separate three experiments. N.C: non-cleavage

Stage	Temperature ( $^{\circ}$ C)						
	5	8	12	16	20	24	28
2-Cell	250 $\pm$ 10	180 $\pm$ 10	120 $\pm$ 10	70 $\pm$ 5	60 $\pm$ 5	60 $\pm$ 5	60 $\pm$ 5
4-Cell	320 $\pm$ 10	230 $\pm$ 10	190 $\pm$ 10	160 $\pm$ 10	120 $\pm$ 10	110 $\pm$ 5	90 $\pm$ 5
8-Cell	N.C	400 $\pm$ 10	300 $\pm$ 20	260 $\pm$ 10	220 $\pm$ 10	170 $\pm$ 10	110 $\pm$ 10
16-Cell	N.C	650 $\pm$ 20	520 $\pm$ 20	410 $\pm$ 10	360 $\pm$ 20	310 $\pm$ 10	180 $\pm$ 20
Morula	N.C	1000 $\pm$ 50	890 $\pm$ 40	780 $\pm$ 30	680 $\pm$ 30	580 $\pm$ 20	290 $\pm$ 20
Blastula	N.C	2200 $\pm$ 50	1700 $\pm$ 40	1100 $\pm$ 30	990 $\pm$ 40	840 $\pm$ 30	510 $\pm$ 20
Gastrula	N.C	3800 $\pm$ 50	2900 $\pm$ 50	2100 $\pm$ 30	1680 $\pm$ 40	1200 $\pm$ 30	800 $\pm$ 30
Pluteus	N.C	6300 $\pm$ 50	5900 $\pm$ 50	3900 $\pm$ 40	2860 $\pm$ 50	2000 $\pm$ 40	1500 $\pm$ 50

Table 2. Effect of temperature on the time or the reative developmental velocity for *Hemicentrotus pulcherrimus* embryos to arrive each developmental stage Numbers indicate times (minutes) taken for 50% of the embryos to arrive at each stage. Each number is the average  $\pm$  standard error for separate three experiments.

Stage	Temperature(°C)						
	5	8	12	16	20	24	28
2cell	370 $\pm$ 10	340 $\pm$ 10	160 $\pm$ 10	110 $\pm$ 10	70 $\pm$ 5	60 $\pm$ 5	50 $\pm$ 5
4cell	740 $\pm$ 20	650 $\pm$ 10	230 $\pm$ 10	160 $\pm$ 10	120 $\pm$ 10	90 $\pm$ 5	60 $\pm$ 5
8cell	1250 $\pm$ 20	1060 $\pm$ 40	360 $\pm$ 30	250 $\pm$ 30	185 $\pm$ 10	130 $\pm$ 10	80 $\pm$ 10
16cell	1640 $\pm$ 20	1400 $\pm$ 50	550 $\pm$ 40	410 $\pm$ 30	310 $\pm$ 30	190 $\pm$ 10	110 $\pm$ 20
Morula	2640 $\pm$ 40	1800 $\pm$ 50	770 $\pm$ 40	630 $\pm$ 40	550 $\pm$ 30	250 $\pm$ 20	160 $\pm$ 20
Blastrula	3140 $\pm$ 60	2500 $\pm$ 50	1300 $\pm$ 40	1080 $\pm$ 50	850 $\pm$ 40	410 $\pm$ 30	260 $\pm$ 20
Gastrula	4340 $\pm$ 60	3900 $\pm$ 50	2400 $\pm$ 50	1960 $\pm$ 50	1580 $\pm$ 40	750 $\pm$ 30	480 $\pm$ 30
Pluteus	7000 $\pm$ 60	5900 $\pm$ 50	4500 $\pm$ 50	3860 $\pm$ 50	2840 $\pm$ 50	1400 $\pm$ 40	940 $\pm$ 30

Table 3. Effect of temperature on the time or the reative developmental velocity for *Scaphechinus brevis* embryos to arrive each developmental stage Numbers indicate times (minutes) taken for 50% of the embryos to arrive at each stage. Each number is the average  $\pm$  standard error for separate three experiments. N.C : non-cleavage

Stage	Temperature (°C)						
	5	8	12	16	20	24	28
2cell	N.C	350 $\pm$ 10	170 $\pm$ 10	90 $\pm$ 10	60 $\pm$ 5	50 $\pm$ 5	50 $\pm$ 5
4cell	N.C	750 $\pm$ 10	230 $\pm$ 10	100 $\pm$ 10	110 $\pm$ 10	80 $\pm$ 5	60 $\pm$ 5
8cell	N.C	1060 $\pm$ 20	350 $\pm$ 10	210 $\pm$ 10	145 $\pm$ 10	110 $\pm$ 10	80 $\pm$ 10
16cell	N.C	1200 $\pm$ 50	450 $\pm$ 20	370 $\pm$ 10	200 $\pm$ 10	130 $\pm$ 10	100 $\pm$ 20
Morula	N.C	1600 $\pm$ 50	730 $\pm$ 40	790 $\pm$ 30	250 $\pm$ 30	180 $\pm$ 10	120 $\pm$ 20
Blastrula	N.C	2100 $\pm$ 50	1100 $\pm$ 40	1200 $\pm$ 30	450 $\pm$ 40	310 $\pm$ 20	250 $\pm$ 20
Gastrula	N.C	N.C	2400 $\pm$ 50	1960 $\pm$ 30	780 $\pm$ 40	650 $\pm$ 30	450 $\pm$ 30
Pluteus	N.C	N.C	4500 $\pm$ 50	2500 $\pm$ 40	1430 $\pm$ 50	1200 $\pm$ 40	920 $\pm$ 30

말뚝성계의 경우, 5°C부터 28°C의 배양조건의 모든 시료에서는 pluteus 유생이 관찰되었다. 5°C, 8°C, 12°C, 16°C의 배양조건의 시료에서는 95%이상의 정상적인 pluteus 유생이 관찰되었으며, 반면 20°C, 24°C와 28°C의 시료에서는 각각 16%, 23%, 41%의 비정상적인 pluteus 유생이 관찰되었다(Table 2).

무늬연잎성계의 경우, 12°C부터 20°C의 배양조건의 시료에서는 pluteus 유생이 관찰되었으나, 5°C의 배양조건의 시료에서는 수정막이 형성된 배아만이 관찰되었으며, 8°C의 시료에서는 포배기 이하의 배아만이 관찰되었다. 반면 24°C와 28°C의 시료에서는 각각 12%, 22%의 비정상적인 pluteus 유생이 관찰되었다(Table 3).

해산무척추동물인 성계는 변온동물(poikilotherms)로서 서식환경의 온도에 비해 보다 넓은 온도에 대한 적응능력을 갖으며,<sup>17)</sup> 초기 배 발생에 있어 종에 따라 일정수준까지의 온도의 상승은 세포의 신진대사율을 증가시킴으로 발생속도가 빨라지는 것으로 사료되며 온도에 대한 적응

능력 이상의 온도는 신진대사율의 감소를 초래함으로 초기발생에 저해요인으로 작용하고 비정상적인 발생을 초래한다.<sup>12,13)</sup>

1989년 Fujisawa는 *H. pulcherrimus*와 *A. crassispina*의 초기 배 발생 과정에 온도가 미치는 영향에 관한 연구 결과, *H. pulcherrimus*가 정상적인 낭배를 형성하는 데 최적 온도는 5°C-23°C, *A. crassispina*가 정상적인 포배를 형성하는 데 최적온도는 16°C-29°C임을 밝힘 바 있다.

또한 1971년 Kobayashi의 연구보고에 의하면, *H. pulcherrimus*의 산란시기와 산란시기의 해수의 온도는 1월-3월, 14°C-16°C, *A. crassispina*의 경우에는 5월-8월, 20°C-28°C임을 보고한 바 있다.

1992년 Yi et al.<sup>13)</sup>에 의한 sand dollar의 일종인 모래성계(*D. excenticus*)의 성장과 수온의 관계에 관한 연구에서 어린 성계의 성장과 사망률은 오염물질의 양과 밀접한 관계가 있으며 수온이 상승할 수록 온도의 영향에 의한 오염물질의 영향이 희석됨을 보고하였다.

본 연구결과를 전체적으로 살펴보면 모든 실험동물의 발생에 있어 배양온도가 높을 수록 배 발생 속도가 비례적으로 빨라짐이 판명되었고, 보라성계는 8°C-20°C, 말뚝성계는 5°C-16°C, 무늬연잎성계는 12°C-20°C 범위가 정상적인 pluteus 유생형성에 적절한 배양온도이며, 산란시기의 주변 환경온도와 이전의 연구결과 및 본 실험의 연구결과를 종합해보면 생물검정을 하는데 있어서의 신속성과 정확성 및 안정성을 고려해 볼 때 말뚝성계는 16°C의 배양온도 조건이, 보라성계와 무늬연잎성계는 20°C의 배양온도 조건이 가장 적절한 배양온도임을 알 수 있었다. 또한 수정 후 pluteus 유생단계까지 발생하는 데 소요된 시간은 최적의 배양온도 조건에서 보라성계 약 48시간, 말뚝성계 약 64시간, 무늬연잎성계 약 24시간이 소요됨을 알 수 있었다.

해산무척추동물인 성계를 이용한 생물검정을 하는데 있어 실험동물의 부적절한 배양온도의 조건은 실험동물의 초기 배 발생에 저해요인이 되므로 각 개체의 온도에 대한 특이성을 고려하여 적절한 배양온도를 설정해야 만이 보다 정확한 검정을 시행할 수 있다.

#### 4. 요약

보라성계, 말뚝성계, 무늬연잎성계의 초기 배 발생에 있어 배양온도의 조건이 높을 수록 배 발생 속도가 비례적으로 빨라졌으며, 부적절한 배양온도 조건은 비정상적인 배 발생을 초래하였다. 정상적인 pluteus 유생형성에 적절한 배양온도는 보라성계 8°C-20°C, 말뚝성계 5°C-16°C, 무늬연잎성계 12°C-20°C이었다. 또한 생물검정을 하는데 있어 최적의 배양온도는 말뚝성계 16°C, 보라성계와 무늬연잎성계 20°C이며, 수정 후 pluteus 유생단계까지 발생하는 데 소요된 시간은 최적의 배양온도 조건하에서 보라성계 약 48시간, 말뚝성계 약 64시간, 무늬연잎성계 약 24시간이 소요되었다.

#### 참 고 문 헌

- 1) 吉田多摩夫, 1992, 環境化學物質과 沿岸生態系. 韓國學術振興財團翻譯叢書 149, p.96-99.
- 2) Monroy, A., 1986, A centennial debt of development biology to the sea urchin, *Biol. Bull.* 171, 509-519.
- 3) Lillie, F. R., 1921, Studies of fertilization. X the effect of copper salts on the fertilization reaction in *Arbacia* and a comparison of mercury effects, *Biol. Bull.*, 41, 125-143.
- 4) Hoadley, L., 1923, Certain effects of the salts of the heavy metals on the fertilization reaction in *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.*, 44, 255-280.
- 5) Dinnel, P. A., G. G. Pagano, and P. S. Oshida, 1988, A sea urchin test system for marine environmental monitoring, *Echinoderm Biology*, Burke, et al. (eds), Balkema, Rotterdam, ISBN 90, 6191-7557.
- 6) Kobayashi, N., 1973, Studies on the effects of some agents on fertilized sea urchin eggs, as a part of the bases for marine pollution bioassay I. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 19, 109-114.
- 7) Kobayashi, N., 1974, Marine pollution bioassay by sea urchin eggs, an attempt to enhance accuracy, *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 21, 377-391.
- 8) Kobayashi, N., 1977, Bioassay data for marine pollution using sea urchin eggs, *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 23, 427-433.
- 9) Pagano, G., A. Esposito, P. Bove, M. D. Angelis, A. Rota, and G. Giordano, 1983, The effects of hexavalent and trivalent chromium on fertilization and development in sea urchins, *Environ. Res.*, 30, 442-452.
- 10) Kobayashi, N., 1981, Comparative toxicity of various chemicals, oil extracts and oil dispersant extracts to canadian and japanese sea urchin eggs, *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 26, 123-133.
- 11) Kobayashi, N., 1984, Marine ecotoxicological testing with echinoderms. Pp. 341-405 in *Otoxicological Testing for The Marine Environment. Vol. I*. G. Persoone, E. Jaspers, and C. Claus(Eds). State Univ., Ghent and Inst. of *Mar. Scient. Res.*, Bredene, Belgium.
- 12) Fujisawa, H., 1989, Differences in temperature dependence of early development of sea urchins with different growing season, *Ref. Biol.*, 176, 96-102.
- 13) YI, S. K., D. Weber, and C. R. Haley, 1992, Effects of temperature and polluted sediments on the growth and survival of sand dollar, *Ocean Res.*, 14(1), 11-23.
- 14) Johnson, G. L. and R. C. Babcock, 1994, Temperature and the larval ecology of the crown of thorns starfish, *Acanthaster planci*. *Biol. Bull.*, 187, 304-308.
- 15) Pagano, G., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, E. Ragucci, and G. Giordano, 1985, pH-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis. II. Exposure of sperm. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 5, 113-121.
- 16) Dinnel, P. A., J. M. Link, and Q. J. Stober, 1987, Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine water, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16, 23-32.
- 17) Menon, N. R., 1972, Heart tolerance. growth and regeneration in three North Sea bryozoans exposed to different temperature, *Mar. Bio.*, 15, 1-11.