

수소이온농도(pH)가 성계의 초기 배 발생에 미치는 영향

유춘만†

전남대학교 자연과학대학 생물학과

The Effects of pH on Early Embryo Development of Sea Urchins

Chun Man Yu†

Dept. of Biology, Chonnam National University, Kwangju, Korea
(Received April 16, 2004; Accepted June 10, 2004)

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of pH, using gametes, embryos and early development system of three sea urchins species, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Anthocidaris crassispina* and *Scaphechinus brevis*. As the result of performing effects of pH on early embryo development, the conditions of appropriate pH on formation of normal pluteus were pH 7.0-8.0 for *H. pulcherrimus*, *A. crassispina* and *S. brevis*. Otherwise, the conditions of pH 5.0, pH 6.0, pH 9.0 and pH 10.0 damaged the development of early embryos of each testing animal moderately or strongly.

Keywords: embryos, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Anthocidaris crassispina*, *Scaphechinus brevis*

I. 서 론

성계의 배우체와 배아는 1800년대 중반부터 발생학과 세포학 분야 등에서 기본적인 실험재료로 사용되어 왔었다.¹⁾ 1920년대와 30년대에 걸쳐서 성계의 배우체 및 배아와 초기 발생계를 이용한 환경·생물·생태학적인 연구가 시도되었으며 성계의 수정과 발생에 미치는 금속이온의 영향에 대해 Lillie와 Hoadley에 의해 시도된 바 있다.^{2,3)} 1950년대에 이르러 자연해수에서의 성계의 수정과 발생에 미치는 금속이온의 영향에 대한 연구가 이루어진 바 있다.⁴⁾ 1970년대에는 Kobayashi에 의해 일본연안의 자연해수가 성계의 초기 배 발생계에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되어 해수의 수질관정에 있어 효율적인 생물검정 재료로 인정받게 되었다.⁵⁻⁷⁾ 또한, 중금속이 성계의 배 발생계에 미치는 연구,⁸⁻¹⁰⁾ 온도가 성계의 성장에 미치는 영향에 대한 연구¹¹⁻¹³⁾ 등, 성계의 초기 배 발생을 관찰하는 생물검정법을 이용한

환경오염 및 독성물질에 관한 연구와 이들의 성장에 미치는 여러 환경요인에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

최근 급속한 경제성장과 산업화의 촉진으로 대규모의 공업화가 이루어지면서 연안지역에 공업단지가 조성되고 인구의 도시집중으로 대량의 생활하수 및 각종 산업폐수와 중금속, 산성폐수 등의 독성이 강한 여러 가지 난 분해성 물질들의 수계(水系)유입은 연안해역 오염의 가속화와 생태계 파괴, 자연의 동·식물과 인간의 건강을 위협하고 있다.

이러한 견지에서 본 연구는 무기산을 함유하는 공장 폐수, 유기산 발효를 일으키는 유기성 폐수의 유입, 산성천의 유입, 식물사체의 불완전 분해에 의해 생성되는 부식산 등의 영향으로 인한 해수의 산성화와 알칼리 폐수와 알칼리 하천의 유입 등으로 인한 해수의 알카리화가 저서생물(benthos)로서 우리나라 대부분의 연안해역에 서식하고 있는 성계 즉, 분류학적으로 극피동물문(Echinodermata)의 하나인 말뚝성계(*Hemicentrotus pulcherrimus*), 보라성계(*Anthocidaris crassispina*), 무늬연잎성계(*Scaphechinus brevis*)의 초기 배 발생과 성장에 수소이온농도가 미치는 영향에 대해 알아보자 한다.

†Corresponding author : Department of Biology, Chonnam National University
Tel: 82-62-530-3390, Fax: 82-62-530-3409
E-mail : ycm0023@hanmail.net

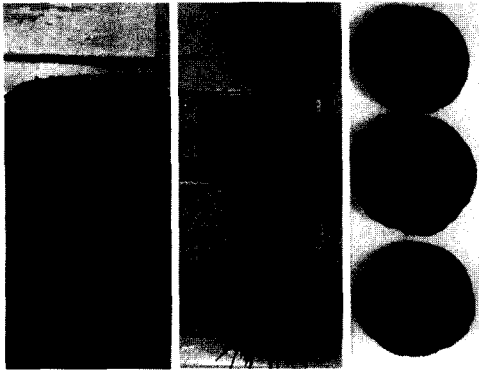


Fig. 1. Test animals. From left, *Hemacentrotus pulcherrimus*, *Anthocidaris crassispina* and *Scaphhechinus brevis*.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 채집

본 연구에 사용된 실험동물은 보라성게(*Anthocidaris crassispina*), 말뚝성게(*Hemacentrotus pulcherrimus*), 무늬연잎성게(*Asterias amurensis*)로써 연안해역의 암반이나 사질성 연안이 주 서식처이며, 전라남도 여천군 들산면 방죽포와 여수시 오동도 연안에서 채취, 운반하였다(Fig. 1).

2. 방정과 방란

실험동물의 방정과 방란에 사용하기 위한 자연해수는 GF/C(pore size 1.2 μ m)로 여과한 후 2조의 활성탄 충전 칼럼(Φ 25 cm \times 100 cm)으로 처리한 다음 GF/C로 반복 여과한 것을 이용하였다. 이 여과된 자연해수를 100 ml의 비이커에 가득채운 후 성계의 생식공이 충분히 잠기게 한 다음 0.5M의 KCl 용액을 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.^{10,11)}

3. 시험액의 농도별 조성

1N HCl과 KOH 용액을 사용, pH 농도를 pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0, pH 10.0이 되도록 6개의 시험액을 조성, 각각의 시험액에서 정체 배양하였고 시험액의 조성에 사용한 해수는 여과된 자연해수를 사용하였다.

4. 배양조건

실험동물로부터 채취한 난자와 정자의 첨가비율은

1:1000으로 조절하였으며, 시수에 정자를 노출시키기 위한 정자의 수는 $5 \times 10^6/50$ ml가 되게 조정하였다. 배양 용기는 borosilicate 재질의 100 ml 배양병을 사용하여 배양액의 용량을 50 ml로 하였다. 배양온도는 말뚝성게 16°C, 보라성게와 무늬연잎성게 20°C이었고, 염분도는 $30 \pm 1\%$ 의 배양조건의 어두운 장소에서 정체 배양하였다.^{12,13)}

5. 배우자를 이용한 생물검정

여과된 자연해수를 borosilicate 재질의 100 ml 배양병에 50 ml로 채운 후, 방정과 방란을 통해서 얻은 실험동물의 정자를 시료에 60분 동안 노출시킨 후, 난자를 접종하여 각각의 배양온도에서 배양하였다. 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 첨가한지 말뚝성게의 경우 64시간, 보라성게 48시간, 무늬연잎성게 24시간 후 10%의 초산으로 고정시킨 다음 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.^{9,10,13)}

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

또한 본 실험의 생물검정은 모두 3회이상의 동일한 실험을 실시하였고, 관찰에 있어 배아를 100개이상 계수하여 나타난 결과를 백분율로 환산·처리하였다.¹¹⁾

III. 결과 및 고찰

본 연구는 실험동물인 성계의 초기 배 발생에 있어 pH가 미치는 영향을 규명하고자 시험액(여과된 자연해수)에 1N HCl과 KOH 용액을 사용, pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0, pH 10.0이 되도록 시험액을 조성, 배우체와 배아를 배양시켰다.

그 결과, 말뚝성게의 경우, pH 5.0의 시험액에서는 10%의 수정막형성이 이루어졌을 뿐, 정상적인 pluteus 유생은 관찰할 수 없었다. pH 6.0의 시험액의 경우 수정막 형성률과 정상적인 pluteus 유생 형성률은 각각 52%와 20%, pH 7.0에서는 각각 91%와 90%가 관찰되었다. pH 8.0에서는 98%와 97%로 가장 높은 수정막 형성률과 정상 pluteus 유생 형성률을 보였다. pH

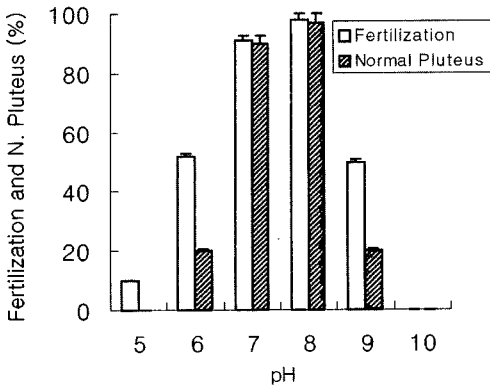


Fig. 2. Relationship between pH and early embryo development of *H. pulcherimus*.

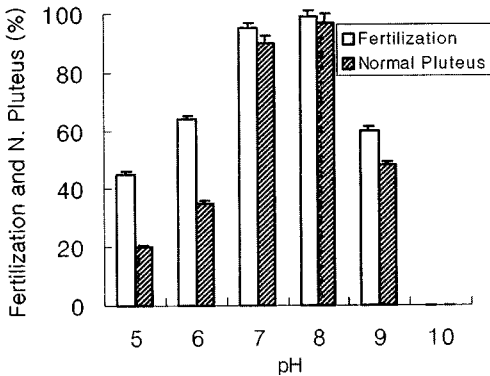


Fig. 3. Relationship between pH and early embryo development of *A. crassispina*.

9.0에서는 50%와 20%의 수정막 형성률과 정상적인 pluteus 유생이 관찰되었으며, 또한, pH 10.0의 시험액에서는 수정막 형성을 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

보라성계의 경우, pH 5.0과 pH 10.0의 시험액에서는 수정막 형성이 이루어지지 않았다. pH 6.0의 시험액의 경우 수정막 형성률과 정상적인 pluteus 유생 형성률은 각각 22%와 13%, pH 7.0에서는 85%와 79%, pH 8.0에서는 97%와 95%로 가장 높은 수정막 형성률과 정상적인 pluteus 유생 형성률을 보였다. pH 9.0에서는 27%와 17%의 수정막 형성률과 정상적인 pluteus 유생이 관찰되었다(Fig. 3).

무늬연잎성계의 경우, pH 5.0의 시험액에서는 45%의 수정막 형성률과 20%의 정상적인 pluteus 유생 형성률을 보였다. pH 6.0의 시험액의 경우 수정막 형성률과 정상적인 pluteus 유생 형성률은 각각 64%와 35%가 관찰되었다. pH 7.0에서는 95%와 90%, pH 8.0에서는 99%와 97%로 가장 높은 수정막 형성률과 정상적인

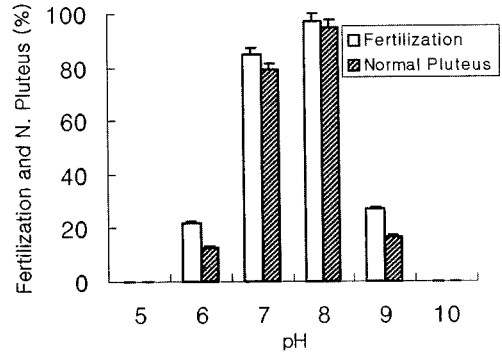


Fig. 4. Relationship between pH and early embryo development of *S. brevis*.

pluteus 유생 형성률을 보였다. pH 9.0에서는 60%와 48%의 수정막 형성률과 정상적인 pluteus 유생이 관찰되었다. 또한, pH 10.0의 시험액에서는 수정막 형성을 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

1973년 Kobayashi는 보라성계의 초기 배 발생에 있어서 가장 적절한 pH농도는 pH 7.8-pH 8.6임을 밝힌 바 있으며⁵⁾ 1985년 Pagano 등은 성계(*Paracentrotus lividus*)의 초기 발생하는 데 있어 pH 7.0 이하의 배양 시험액에서는 수정막과 정상적인 유생의 형성에 큰 저해를 받음을 보고한 바 있다.¹³⁾ 또한, 1986년 Cipollaro의 연구보고에 의하면 *S. granularis*와 *P. lividus*의 초기 배 발생에 가장 적합한 pH농도는 pH 7.0-pH 8.5임을 밝힌 바 있으며¹⁴⁾ 1990년 Davydov는 별불가사리의 초기 배 발생에 가장 적합한 pH 농도는 pH 7.8-pH 8.3임을 보고한 바 있다.¹⁵⁾

동물의 수정과 배 발생 과정에 있어 세포 내·외의 이온농도의 변화는 중요한 의미를 갖는다. 즉, 난자세포의 이온농도의 변화로써 정자가 접촉한 후, 즉시 막의 투과성이 변하여 주위의 환경으로부터 세포 내로 Na⁺이 유입되며 H⁺은 세포 밖으로 나오고 일시적으로 Na⁺와 H⁺바깥으로 인해 난자 내의 pH가 증가한다. 이러한 일시적인 pH의 변화는 수정 후의 합성 과정과 다른 생화학적 변화에 관련된 효소를 활성화시키는 역할을 하며 성계와 불가사리의 초기 배 발생에 있어서 시험액의 pH 감소(pH 7이하)와 증가(pH 8.5이상)는 DNA의 구조에 영향을 미치므로 기형발생물질(teratogen)과 유전적 독성작용(genotoxic action)을 유발시키며 유사분열의 활성도를 억제하는 작용을 한다.¹⁵⁾

IV. 결 론

본 연구는 보라성계, 말뚝성계, 무늬연잎성계 성계의

초기 배 발생에 있어 pH가 미치는 영향을 알아보았다.

그 결과, pH 7.0-8.0 조건의 시험액에서 모든 실험동물이 85% 이상의 수정막 형성률과 79%이상의 정상적인 pluteus 유생 형성률을 보임으로서 성게의 초기 배 발생에 적합한 조건임이 판명되었다. 특히, pH 8.0의 시험액의 경우 성게의 초기 배 발생에 가장 적합한 조건임을 알 수 있었다. 반면, pH 6.0과 pH 9.0의 시험액에서는 낮은 수정막 형성률과 정상적인 유생이 관찰됨으로써 성게의 초기 배 발생에 많은 영향을 미쳤다. 또한 pH 5.0과 pH 10.0의 경우 매우 낮은 수정막 형성률과 정상적인 유생이 관찰됨으로써 성게의 초기 배 발생에 부적합한 조건임을 알 수 있었다. pH에 대한 실험동물의 내성(tolerance) 범위는 무늬연잎성게가 가장 크게 나타났고, 그 다음은 말뚝성게, 보라성게의 순으로 나타났다.

참고문헌

1. Monroy, A. : A centennial debt of development biology to the sea urchin. *Biol. Bull.*, **171**, 509-519, 1986.
2. Lillie, F. R. : 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, 1921.
3. Hoadley, L. : Certain effects of the salts of the heavy metals on the fertilization reaction in *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.*, **44**, 255-280, 1923.
4. Dinnel, P. A., Pagano, G. G. and Oshida, P. S. : A sea urchin test system for marine environmental monitoring. *Echinoderm Biology*, Burke, *et al.* (eds), Balkema, Rotterdam, ISBN **90**, 6191-7557, 1988.
5. Kobayashi, N. : 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, 1973.
6. Kobayashi, N. : Marine pollution bioassay by sea urchin eggs, an attempt to enhance accuracy. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, **21**, 377-391, 1974.
7. Kobayashi, N. : Bioassay data for marine pollution using sea urchin eggs. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, **23**, 427-433, 1977.
8. Pagano, G., Esposito, A., Boye, P., Angelis, M. D., Rota, A. and Giordano, G. : The effects of hexavalent and trivalent chromium on fertilization and development in sea urchins. *Environ. Res.*, **30**, 442-452, 1983.
9. Kobayashi, N. : 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, 1981.
10. Kobayashi, N. : Marine ecotoxicological testing with echinoderms. pp. 341-405 in *Ecotoxicological 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, 1984.
11. Fujisawa, H. : Differences in temperature dependence of early development of sea urchins with different growing season. *Ref. Biol.*, **176**, 96-102, 1989.
12. 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.
13. Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E. and Giordano, G. : pH-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis. II. Exposure of sperm. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **5**, 113-121, 1985.
14. Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E., Staiano, N., Giordano, G. G. and Pagano, G. : Sublethal pH decrease may cause genetic damage to eukaryotic cell: A study on sea urchins and *Salmonella typhimurium*. *Teratogen Carcinogen Mutagen*, **7**, 153-161, 1986.
15. Davydov, P. V., Shubrayvi, O. I. and Vassetzky, S. G. : The starfish *Asterina pectinifera*. Animal species for developmental studies. 287-311, 1990.