

## 말뚝성게 (*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 수정 및 배아 발생률에 대한 비소와 크롬의 독성영향

황운기 · 류향미 · 유 준 · 강한승\*

국립수산과학원 서해수산연구소 해양생태위해평가센터

### Toxic Effects of Arsenic and Chromium on the Fertilization and Embryo Development Rates in the Sea Urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*)

Un-Ki Hwang, Hyang-Mi Ryu, Jun Yu and Han-Seung Kang\*

National Fisheries Research & Development Institute, West Sea Fisheries Research Institute,  
Marine Ecological Risk Assessment Center, Eulwang-dong, Jung-gu, Incheon 400-420, Korea

**Abstract** - Toxic effects of arsenic (As) and chromium (Cr) has been investigated using the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) germ cell and pluteus-larvae. The gametotoxic and embryotoxic effects of As and Cr on *H. pulcherrimus* were each investigated at 6.25, 12.5, 25, 50, 100. Spawning was induced by 0.5 M KCl solution and the normal fertilization and embryogenesis rates were performed for 10 min and 64 hrs after fertilization, respectively. The normal fertilization and embryogenesis rates in the control condition (not including As and Cr) were greater than 94% and 93%, respectively. The fertilization rate was not significantly changed compared with control but embryogenesis rate was significantly decreased with concentration-dependent manner. As and Cr reduced normal embryogenesis rates and a significant reduction occurred at concentration greater than 6.25 ppb ( $P < 0.01$ ) and 25 ppb ( $P < 0.05$ ), respectively. The lowest-observed-effect-concentration (LOEC) of normal embryogenesis rate in As and Cr were each 6.25 and 25 ppb, respectively. From these results, normal embryogenesis rate of *H. pulcherrimus* have toxic effect at greater than the 6.25 ppb concentration of As and 25 ppb concentration of Cr in marine ecosystems. These results suggest that the normal embryogenesis rates of *H. pulcherrimus* are very useful test method for the toxicity assessment of heavy metal as As and Cr in marine ecosystems.

**Key words** : *H. pulcherrimus*, fertilization, embryogenesis, As, Cr, toxicity

## 서 론

해양 오염물질의 약 80% 이상은 하천을 통하여 연안 해역으로 유입됨으로서 인간 활동에 의하여 발생되는

오염물질의 대부분은 해양오염의 원인 물질이라고 할 수 있다. 이런 원인물질 중에서 해양으로 유입된 중금속은 퇴적물과의 결합에 의해 축적률이 높아 다른 오염물질보다도 상대적으로 긴 반감기를 가질 뿐만 아니라 미량일지라도 농축 및 축적이 가능하여 해양생물의 생리적 장애를 유발하며 (DeForest *et al.* 2007; Atici *et al.* 2008), 먹이연쇄 과정을 통해 최상위 포식자인 인체에게

\* Corresponding author: Han-Seung Kang, Tel. 032-745-0684,  
Fax. 032-745-0686, E-mail. hanseungkang66@gmail.com

지 영향을 미칠 수 있어 인류의 보건과도 직결되는 심각한 문제라고 할 수 있다(Martin and Whitfield 1983; Phillips and Segar 1986; Yap *et al.* 2004; Reiley 2007).

중금속 중에서 비소(Arsenic, As)는 인체 대사에 불필요한 유해금속물질(toxic and non-essential metal)로 잘 알려져 있다. 화산활동 등과 같은 자연활동에 의해 지표면에서 흔히 발견되고 광업 및 제련과정에서 광석에 들어있던 비소의 노출 및 비소 성분이 포함된 제초제, 살충제 등의 사용으로 인해 많은 양의 비소가 환경내로 유입되고 있다(Irving *et al.* 2008). 환경내로 유입된 As는 흡입이나 피부 흡수를 통한 노출도 가능하지만 그 양은 미비한 것으로 알려져 있으며(Bae *et al.* 2006), 대부분 물과 식품을 통하여 인체에 흡입되는 것으로 알려져 있다(Gebel 1999). As는 아시아(Bhattacharyya *et al.* 2003; Xia and Liu 2004) 및 유럽 일부지역(Lewis *et al.* 1999; Lamm *et al.* 2004; Caceres *et al.* 2005)에서 이용되는 음수에서 검출되어 전 세계적인 문제로 대두되었다. 크롬(Chromium, Cr)은 화학적 안전성과 내열성, 내부식성, 전기저항성이 강하기 때문에 각종 금속의 도금 및 합금에 널리 사용되며 중독되면 구토와 복통 등이 생기고 심하면 무뇨증과 요독증으로 사망하게 된다(Suh *et al.* 1999). Cr은 자연 상태에서 3가 및 6가 상태로 존재하며, 일반적으로 6가 Cr이 3가 Cr보다 독성이 강하며 발암물질로 알려져 있다(Sivakumar and Subbhuraam 2005).

우리나라의 경우 중금속이 해양생물에 미치는 영향에 관한 연구는 부착성 이매패류(Lee and Lee 1984; Choi *et al.* 1992)를 중심으로 이루어져 왔으나, 대부분은 이화학적 연구가 중심이 되어 생물에 미치는 독성 영향에 대한 연구보다는 생물 체내에 존재하는 중금속 함량을 파악하는 연구가 수행되어져 왔다. 하지만, 최근에는 자연 생태계에 존재하는 단독 또는 혼합 이물질에 대한 생물 영향을 밝혀서 해양생태계의 위해성을 판단하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Han *et al.* 2008; Hwang *et al.* 2009, 2011, 2012). 이러한 연구는 USEPA (U. S. Environmental Protection Agency) 및 ASTM (American Society for Testing and Materials) 등에서도 표준 지침서를 제시하였으며, 오염물질에 대해 민감하게 반응하는 초기 생활사를 이용한 시험법이 널리 활용되고 있다(Martin *et al.* 1981; Beiras and Albentosa 2004; Geffard *et al.* 2004).

해양오염물질이 생물체에 미치는 영향은 오래전부터 무척추동물을 대상으로 진행되어 왔으며(Okubo and Okubo 1962; Kobayashi 1971; Lonning and Hagstrom 1975), 무척추동물 중에서 성체는 유용 수산 생물로서 배아 단계와 같은 초기 생활사를 활용하기 때문에 민감성이 뛰

어날 뿐만 아니라 짧은 시간에 평가할 수 있다는 장점으로 인해 독성평가 생물로 오래전부터 널리 사용되어 왔다(Kobayashi 1977, 1981; Greenwood 1983; Dinnel *et al.* 1989).

이런 장점으로 인해 본 연구에서는 유용 수산생물로서 조간대 암반 지역에 서식하는 말뚝성게(*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 초기생활사를 이용하여, As와 Cr의 독성 영향을 평가함과 동시에 시험방법으로 유용하게 활용할 수 있는지에 대한 타당성을 평가하고자 하였다. 또한, 본 연구결과를 바탕으로 해양 생태계 내에서 이들 중금속의 독성 영향에 대한 *H. pulcherrimus*의 정상 배아 발생률에 대한 반수영향농도(50% Effective Concentration, EC<sub>50</sub>), 반수영향농도에 대한 95% 신뢰구간(95% Confidence limit, 95% CI), 무영향농도(No Observed Effective Concentration, NOEC), 최소영향농도(Lowest Observed Effective Concentration, LOEC)를 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험에 사용된 *H. pulcherrimus*는 2012년 3월 전라북도 부안군 변산면 격포리 인근 해역의 조간대 암반지역에서 채집하여 국립수산물연구원 서해수산연구소 해양생물배양실에서 1~2주간 순치 후 실험에 이용하였다. 해양생물배양실의 수조환경은 자연채광 상태의 유수식으로 9±1°C의 수온을 유지하였다.

### 2. 방정 및 방란 유도

*H. pulcherrimus*는 암, 수 각각 6개체로 크기는 직경 3.5 cm 이상을 사용하였으며, 표면의 원생동물 및 이물질을 제거하기 위하여 멸균된 해수를 이용하여 표면을 세척한 후, 실험에 이용하였다. 배양액으로 사용된 해수는 membrane filter (pore size 0.45 μm)로 여과된 자연해수를 사용하였다. 0.5 M KCl 용액 1 mL을 체강내로 주입시킨 후, 여과 및 멸균한 자연해수가 담긴 100 mL 용량의 비이커에 넣고 생식공이 충분히 잠기게 하였다(Xu *et al.* 2012). 30분 동안 방정, 방란을 유도시켜 얻은 배우자를 정자용액은 1회, 난자용액은 3회 세정하여 실험에 사용하였다.

### 3. 중금속 노출

실험에 사용한 중금속 As (Arsenic standard solution,

**Table 1.** Experimental culture conditions using the normal fertilization and embryogenesis rates in the sea urchin, *H. pulcherrimus*

Test parameters	Conditions
Culture type	Static non-renewal 10 min ~ 64 h toxicity test
Photoperiod	Ambient light condition and 8L : 16D periods
Temperature	16 ± 0.5°C
pH	7.8 ~ 8.2
Salinity	32 ± 1.0
Chamber volume	80 mL glass
Solution	Filtered (0.45 µm) and sterilized seawater
Solution exchange	None
Experiment period	10 min ~ 64 hrs
Investigation item	Fertilization, larval development rates
Acceptability criterion	>90% fertilized eggs and pluteus larvae at control
Test materials	As, Cr

CAS No. 7440-38-2), Cr (Chromium standard solution, CAS No. 7440-47-3)은 JUNSEI (Tokyo, Japan) 제품을 사용하였다. 실험동물의 수정 및 배아 발생률에 미치는 As와 Cr의 영향을 살펴보기 위하여 멸균된 해수를 이용하여 1 ppm 농도로 조성한 stock solution을 준비한 후, 희석하여 사용하였다. As 및 Cr 노출에 의한 *H. pulcherrimus*의 수정률 및 배아 발생률을 조사하기 위한 실험농도는 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppb의 7개 농도구로 설정하였다.

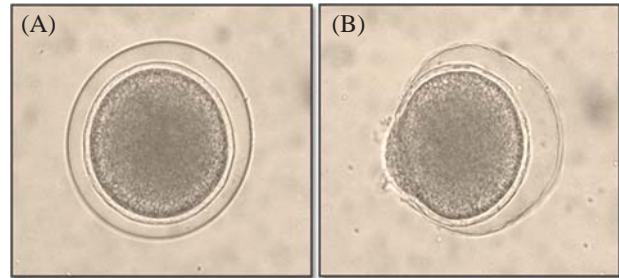
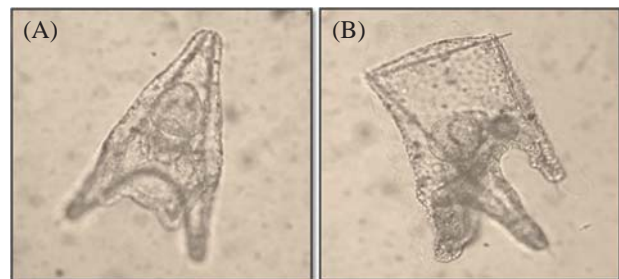
#### 4. 배양조건

실험에 사용된 중금속 농도를 조성한 멸균 해수 배양액의 pH는 7.8~8.2, 배양온도는 16 ± 0.5°C를 유지하였다. 인공수정 (artificial insemination)시 적절한 정자 집종을 위하여 정자는 2,000~2,500배 희석하였으며, 멸균 해수 배양액 1 mL에 수정란 1,500~2,000개를 준비해 Table 1의 조건으로 배양하였다 (Pagano *et al.* 1985a, b).

#### 5. 수정 및 배아 발생 관찰

방정 유도를 통해서 얻은 정자는 각각의 As 및 Cr 실험 농도에 30분간 노출 시킨 후, 방란 유도를 통해 얻은 정상 난자와 인공수정을 시켰다. 수정 10분 경과 후 수정막의 형성 유·무로 수정률을 관찰하였다 (Fig. 1). 발생률은 pluteus 유생기인 수정 후 64시간째 정상 및 비정상 발생으로 나누어 관찰하였다 (Pagano *et al.* 1985a, b) (Fig. 2).

실험은 농도별로 3회 반복 실시하였으며 100개 이상의

**Fig. 1.** Diagnostic features of normal (A) and abnormal (B) fertilized eggs in the sea urchin, *H. pulcherrimus*.**Fig. 2.** Diagnostic features of normal (A) and abnormal (B) pluteus larvae in the sea urchin, *H. pulcherrimus*.

배아를 3회 반복 계수하여 고정된 배아 수에 대한 정상적인 배아 수의 백분율을 산출하였다. 이들 결과를 이용하여 수정 및 배아 발생률에 대한 반수영향농도 (50% Effective Concentration, EC<sub>50</sub>)와 95% 신뢰구간 (95% Confidence Limit, 95% CI)을 probit 통계법을 이용하여 분석하였다. 또한, 무영향농도 (No Observed Effective Concentration, NOEC), 최소영향농도 (Lowest Observed Effective Concentration, LOEC)는 Dunnett's를 이용하여 분석하였다.

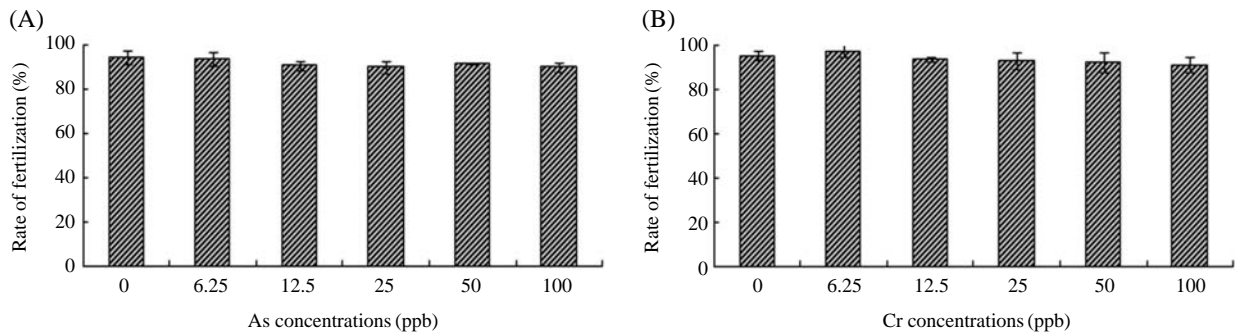
#### 6. 통계학적 분석

대조군과 실험군의 유의성 검정은 Student's *t*-test로 비교하였으며, *p*가 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

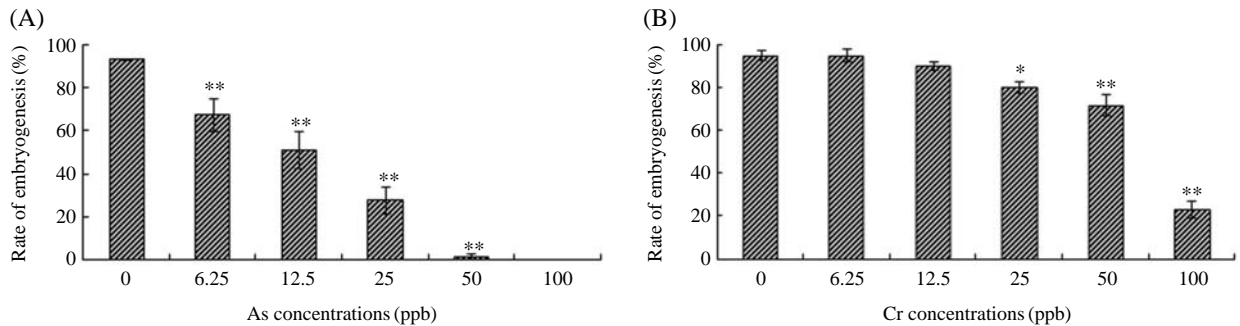
## 결 과

#### 1. As와 Cr 노출에 따른 수정률의 변동

*H. pulcherrimus*의 정자를 중금속인 As와 Cr의 동일농도 (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppb)에 30분간 노출시킨 후,



**Fig. 3.** Changes of normal fertilization rates in the sea urchin *H. pulcherrimus* eggs exposed to As (A) and Cr (B). Vertical bars represent the SE of the mean for three times.



**Fig. 4.** Changes of normal embryogenesis rates in the sea urchin, *H. pulcherrimus* eggs exposed to As (A) and Cr (B). Vertical bars represent the SE of the mean for three times. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  for control (not including As and Cr).

난자와 10분간 수정시켜 현미경으로 정상 수정률을 관찰하여 백분율(%)로 나타내었다(Fig. 3). As를 첨가하지 않은 대조구의 수정률은  $94.33 \pm 3.05\%$ 를 나타냈으며, 실험구 중에 가장 고농도인 100 ppb에서는  $89.33 \pm 3.21\%$ 로 유의적인 차이가 나타나지 않았다. Cr의 경우는 대조구에서  $95.66 \pm 2.30\%$ 로 나타났으며, 가장 고농도인 100 ppb에서는  $91.66 \pm 3.51\%$ 로 이들 금속 첨가로 수정률은 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3).

## 2. As와 Cr 노출에 따른 배아 발생률의 변동

*H. pulcherrimus*의 배아 발생률에 미치는 As와 Cr의 영향을 나타냈다(Fig. 4). 수정 후 64시간 후, pluteus 유생기의 정상 배아 발생률은 As의 경우 대조구에서  $93.66 \pm 0.57\%$ 를 Cr에서는  $95.33 \pm 2.30\%$ 를 나타냈으나, 중금속 농도가 증가할수록 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. As를 첨가한 실험구에서 최소 농도인 6.25 ppb에서  $67.66 \pm 7.63\%$ 로 유의적으로 감소하였으며( $P < 0.01$ ), As 농도가 증가할수록 정상 배아 발생률은 급격히 감소해 50 ppb에서는  $1.33 \pm 1.15\%$  ( $P < 0.01$ )를 나타냈으며 최고

농도인 100 ppb에서는 정상 배아 발생률을 관찰할 수 없었다(Fig. 4). Cr의 경우도 중금속 농도가 증가할수록 정상 배아 발생률이 감소하는 경향을 나타내고 있으나, As 보다는 농도의존성이 다소 덜 한 것으로 관찰되었다. Cr을 첨가한 실험군의 경우는 25 ppb 이상의 농도에서 유의적으로 감소하였으며( $P < 0.05$ ), 최고 농도인 100 ppb에서 정상 배아 발생률이  $23.33 \pm 4.16\%$ 로 급격히 감소하였다( $P < 0.01$ )(Fig. 4).

## 3. 배아 발생률을 이용한 독성 평가

정상 배아 발생률은 As와 Cr 농도가 증가할수록 감소하는 농도 의존성을 나타냈으며, 농도반응 관계식은 표준 독성반응으로 잘 알려진 Sigmoid 형태를 나타냈다(Fig. 5).

*H. pulcherrimus*의 정상 배아 발생률에 대한 As의 영향을 독성치로 나타냈을 때,  $EC_{50}$ 은 14.38 ppb를 나타냈고,  $EC_{50}$ 에 대한 95% CI는 7.82~20.71 ppb를 나타냈다. 정상 배아 발생률에 대한 NOEC와 LOEC는 각각  $< 6.25$ , 6.25 ppb로 나타났다. 정상 배아 발생률에 대한 Cr의 반

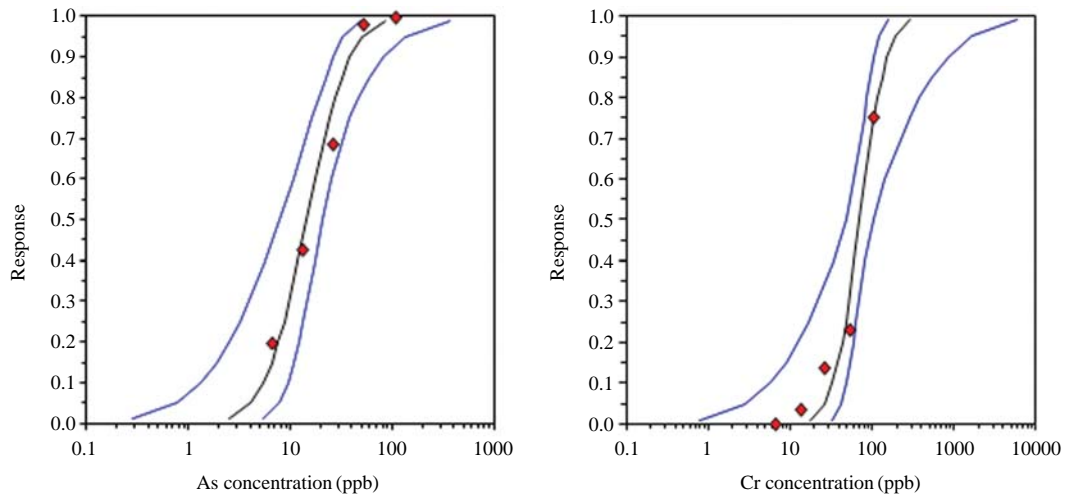


Fig. 5. Concentrations-response by As and Cr treatment using the normal embryogenesis of sea urchin, *H. pulcherrimus*.

Table 2. Toxicological estimation using the form of a fertilization membrane and normal pluteus in the sea urchin, *H. pulcherrimus* exposed to As, Cr

Items	Toxicity (End-points)	As (ppb)	Cr (ppb)
EC <sub>50</sub>	Normal pluteus	14.38	71.49
95% CI	Normal pluteus	7.82-20.71	47.84-104.15
NOEC	Normal pluteus	< 6.25	12.5
LOEC	Normal pluteus	6.25	25

EC<sub>50</sub>: 50% Effective concentration, 95% CI: 95% Confidence limit, NOEC: No observed effective concentration, LOEC: Lowest observed effective concentration.

수영항농도 EC<sub>50</sub>은 71.49 ppb를 나타냈고, 95% CI는 47.84~104.15 ppb를 나타냈으며, NOEC와 LOEC는 각각 12.5, 25 ppb를 나타냈다 (Table 2).

### 고찰

해양으로 유입되는 오염물질로부터 해양생태계를 안전하게 감시할 수 있는 평가방법의 중요성이 인식되고 있으나 (Bidwell *et al.* 1998), 대부분 연안 해역에서 이루어지는 환경조사는 특정 유해물질을 이화학적으로 정량하여 기준치와 비교하는 전통적인 조사방법 위주로 실시되고 있다. 이런 전통적인 조사는 해양에 존재하는 유해물질에 대한 개별 정보를 제공한다는 점에서는 매우 유용하나, 유해물질에 대한 분석 능력이 제한되어 있어 미지의 오염물질에 대한 영향을 판단할 수 없을 뿐만 아니라 유해물질 상호작용에 의해 발생하는 독성의 상승 (synergism), 부가 (addition) 및 길항 (antagonism) 작용에

대해서는 전혀 알 수 없다는 단점을 지니고 있다 (Ahlf *et al.* 2002; Chu and Chow 2002). 이러한 이화학적 분석방법의 한계성을 극복하기 위하여 단일 유해물질의 양을 관찰하기 보다는 생물의 생리 및 행동학적 반응을 이용한 통합적인 독성을 평가하는 해양생태독성 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Beiras *et al.* 2003; Han *et al.* 2008; Hwang *et al.* 2012).

해양에 유입되는 독성물질에 대한 생물반응을 살펴보기 위해서는 시험생물의 선정 및 독성물질에 대한 노출 시기 등과 같은 시험방법의 차이로 인해 생물 체내에 미치는 영향은 다양하게 나타날 수 있는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 시험방법의 표준화 및 유용 시험생물 종을 선정하는 연구는 매우 중요하다. 본 시험에 사용한 시험생물 종인 말뚝성게는 채집이 용이할 뿐만 아니라 생식세포인 정자와 난자를 쉽게 얻을 수 있으며 실험실에서 배아발생 과정을 관찰하기 용이한 장점으로 인해 생태독성 연구에 활발하게 이용될 수 있을 것으로 판단되어, 본 연구에서는 우리나라 조간대 암반 지역에 서식하며 실험실에서 인공배란 및 수정을 쉽게 유도할 수 있으며 실내배양이 용이한 *H. pulcherrimus*를 시험종으로 이용하였다.

본 연구 결과 As (0. 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppb)와 Cr (0. 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppb) 노출에 의한 *H. pulcherrimus*의 수정률은 대조구와 비교해 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 3). 정상적인 배아 발생률의 경우 As는 대조군에서 93.67±0.57%를 보였으나, 농도가 증가할수록 급격히 감소해 최고농도구인 100 ppb에서는 정상 pluteus 유생을 관찰할 수가 없었다 (Fig. 4). Cr의 경우도 농도가

증가할수록 배아발생률은 감소하는 경향을 나타내었으며 100 ppb 농도에서는 정상 발생률이  $23.33 \pm 4.16$ 으로 유의적으로 감소하였다(Fig. 4). 이상의 결과로 보아 As와 Cr은 성계의 정상적인 배아 발생과정을 저해 시키는 것을 알 수 있다. 중금속 농도가 증가할수록 배아 발생률이 농도 의존적으로 감소하는 것은 다른 중금속 연구결과와 유사하게 나타났다(Gopalakrishnan *et al.* 2007, 2008; Hwang *et al.* 2011, 2012). 본 연구결과에서 As와 Cr은 수정률에는 영향을 미치지 않은 것으로 나타났으나, Hwang *et al.* (2012)의 연구결과에서는 중금속인 Zn의 경우는 31 ppb에서 *H. pulcherrimus*의 수정률을 유의적으로 감소시켰다고 보고하였다. 또한, Fathallah *et al.* (2010)이 유럽산 조개류의 일종인 *Ruditapes decussatus*를 이용한 연구결과에서 본 실험과 동일하게 30분간 정자를 Cu, Hg, Zn에 노출시킨 후 난자와 수정시켰을 경우 Cu는 영향이 없었으나 Hg과 Zn은 256 및 512 ppt에서 유의적으로 감소하는 것으로 보고하였다. 그러나 Warnau *et al.* (1996) 등의 연구에 의하면 성계의 일종인 *Paracentrotus lividus*의 정자에 Hg, Cu, Cd 및 Ag을 노출시켰을 때 수정률의 감소를 보고하였다. 해초류인 *Phallusia mammillata*의 경우 Hg이 수정률에 영향을 미치지 않았다(Franchet *et al.* 1997). 이러한 결과들로부터 중금속은 종류에 따라서 수컷 생식 세포인 정자의 활성화에 영향을 미쳐 수정률 감소를 유발하는 것으로 사료된다. 그러나 생물종에 따라 중금속이 정자의 수정 능력에 미치는 영향이 다르게 나타나는 결과도 나타나므로 수정률을 이용한 중금속의 생태위해성의 평가는 충분치 못하다고 생각되며 또한 중금속 종류에 따라 다른 적용이 필요하다고 판단된다.

본 연구결과에서 중금속 노출에 의해 배아 발생률이 수정률보다 저해현상이 민감하게 나타나는 것은 배아가 pluteus 유생시기에 도달 시까지 As와 Cr에 더 오랫동안 노출됨으로 인해 발달 저해가 증가되었을 것으로 사료된다(Hwang *et al.* 2008). 또한, 이들 중금속에 의해 pluteus 유생 이전 시기부터 영향을 받았다 할지라도 형태적으로 분화 정도가 진전된 pluteus 유생시기의 배아가 독성에 대해 증폭되어 표현되기 때문에 pluteus 형성 시기가 수정률에 비해 더욱 민감하게 나타나는 것으로 판단된다(Wui *et al.* 1992).

오염물질에 대한 상대적 독성을 평가하기 위하여 사용되는 반수영향농도를 이용하여 중금속이 *H. pulcherrimus* 배아 발생률에 미치는 영향을 살펴보면 As의 EC<sub>50</sub>은 14.38 ppb, Cr은 71.49 ppb로 나타났다. 우리나라 남, 서해 주요 12지역(인천, 평택, 목포, 해창만, 광양, 통영, 행암만, 감만, 부산남항, 부산북항, 온산, 장생포)항구의 표면 퇴적

물에서의 As 및 Cr의 오염정도를 조사한 결과 As는 3.9 ~ 60.1 ppm의 농도로 조사되었으며 조사 지역 중에서 장생포 지역이 가장 높은 농도로 나타났다. Cr의 경우는 11 ~ 401 ppm으로 부산남항이 가장 높은 농도로 나타났다(Choi *et al.* 2012). 이러한 결과로 보아 우리나라 남, 서해 지역의 As 및 Cr의 오염은 매우 높은 것으로 생각되며 본 연구결과에서 제시한 EC<sub>50</sub>값은 오염정도를 평가하기 위한 중요한 지침으로 활용할 수 있으리라 생각된다. Hwang *et al.* (2009, 2011, 2012)은 *H. pulcherrimus* 배아 발생률에 미치는 영향을 이용한 실험에서 Cd의 EC<sub>50</sub>은 244.04 ppb, Cu는 10.32 ppb, Co는 71.84 ppb, Pb은 45.13 ppb, Zn은 19.82 ppb로 보고하였다. 이들 연구결과를 이용하여 중금속에 대한 *H. pulcherrimus* 배아 발생률에 미치는 독성 영향은 Cu > As > Zn > Pb > Cr > Co > Cd 순으로 나타낼 수 있다. Kobayashi (1994)는 성계(*Diadema setosum*)의 초기 발생에 미치는 영향에서 중금속 중에서 Hg이 가장 큰 독성 영향을 보였으며 Cu > Zn > Ni > Cd 순으로 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 불가사리의 초기 발생에 미치는 중금속 영향을 조사한 Yu (1998)의 결과에서 아모로 불가사리(*Asterias amurensis*)는 Hg > Cu > Zn > Cd > Ni 순으로 영향을 미치며, 별 불가사리(*Asterias pectinifera*)는 Cu > Hg > Zn > Cr > Ni 순으로 독성이 큰 것으로 보고하였다. 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 수정란 부화율을 이용한 Hwang *et al.* (2012)의 연구에서는 Cr > As > Pb 독성의 영향이 큰 것으로 보고하였다. 이들 연구결과로 생물종에 따라 중금속 독성에 대한 민감도와 중금속에 대한 상대적 독성 영향은 차이가 있는 것으로 판단되며, 시험 생물종에 따른 노출시기와 같은 시험방법도 고려해야 할 것이다. Cu와 Zn은 생물 체내에 있어 생명 유지를 위한 필수 미량금속원소로 잘 알려져 있어 독성이 낮게 나타날 것으로 판단했으나, 상대적으로 독성이 큰 것으로 나타나, 향후 독성 영향 기작에 관해 좀 더 구체적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구결과를 활용하여 Dunnett's test를 실시한 통계 분석에 의한 LOEC에 의하면 해양생태계 내에서 As 및 Cr의 농도는 6.25 ppb 및 25 ppb를 초과할 경우, *H. pulcherrimus*의 정상 배아 발생률은 독성 영향을 받을 것으로 판단된다. 본 연구는 사육 및 관리가 편리한 동, 식물 플랑크톤을 대상으로 이루어지던 생태독성 시험연구에서 유용수산생물자원인 *H. pulcherrimus*를 이용한 것으로, 향후 해양유입 유해물질에 대한 수산생물 위해성 평가 시에 유용하게 활용될 것으로 판단된다.

## 적 요

말뚝성게 (*Hemicentrotus pulcherrimus*)의 생식세포 및 pluteus 유생을 이용하여 중금속인 Arsenic (As)와 Chromium (Cr)이 정상 수정률 및 배아 발생률에 미치는 독성 영향을 조사하였다. *H. pulcherrimus*의 수정률 및 배아 발생률에 미치는 As와 Cr의 독성은 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ppb의 농도에서 조사하였다. 0.5 M KCl 용액을 이용하여 방란 및 방정을 유도하였고, 정상 수정률 및 배아 발생률은 수정 후 각각 10분 및 64시간째 관찰하였다. As와 Cr을 첨가하지 않은 대조구에서 정상 수정률과 배아 발생률은 각각 94%와 93% 이상을 나타냈다. 이들 중금속 첨가에 의해 수정률은 아무런 변화가 나타나지 않았지만 배아 발생률은 농도 의존적 감소하는 것으로 나타났다. As의 첨가에 의해 배아 발생률은 6.25 ppb에서 유의적으로 감소하였으며 ( $P < 0.01$ ), Cr의 경우는 25 ppb에서 유의적인 감소를 나타냈다 ( $P < 0.05$ ). *H. pulcherrimus*의 정상 배아 발생률에 대한 LOEC는 As의 경우는 6.25 ppb를 Cr은 25 ppb를 나타냈다. 이들 연구결과로 해양생태계 내에서 As가 6.25 ppb, Cr이 25 ppb를 초과하는 농도일 때는 *H. pulcherrimus*와 같은 무척추동물의 정상 부화율은 급격히 감소할 것으로 판단된다. 본 연구결과를 바탕으로, *H. pulcherrimus*의 정상 배아 발생률을 이용한 생물학적 평가방법은 중금속과 같은 유해물질에 대한 해양생태계의 영향을 판단하기 위한 시험방법으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 사 사

본 논문은 2012년도 국립수산물과학원 경상과제 연구비 지원으로 국립수산물과학원 서해수산연구소 해양생태 위험평가센터에서 수행한 연구입니다.

## 참 고 문 헌

- Ahlf W, H Holler, H Neumann-Hense and M Ricking. 2002. A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality: A german approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *J. Soils Sediment* 2:37-42.
- Atici T, S Ahiska, A Altindag and D Aydin. 2008. Ecological effect of some heavy metals (Cd, Pb, Hg, Cr) pollution of phytoplanktonic algae and zooplanktonic organisms in Saryar Dam Reservoir in turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 7:1972-1977.
- Bae ON, MY Lee, SM Chung, JH Ha and JH Chung. 2006. Potential risk to human health by arsenic and its metabolite. *J. Environ. Toxicol.* 21:1-11.
- Beiras R, N femández, J Bellas, V Besada, A González-Quijano and T Nunes. 2003. Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere* 52:1209-1224.
- Beiras R and M Albentosa. 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; Implication for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture* 230:205-213.
- Bhattacharyya R, D Chatterjee, B Nath, J Jana, G Jacks and M Vahter. 2003. High arsenic groundwater: mobilization, metabolism and mitigation-an overview in the Bengal Delta Plain. *Mol. Cell Biochem.* 253:347-355.
- Bidwell JR, KW Wheeler and TR Burridge. 1998. Toxicant effects on the zoospore stage of the marine macroalga *Ecklonia radiata* (Phaeophyta: Laminariales). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 163:259-265.
- Caceres DD, P Pino, N Montesinos, E Atalah, H Amigo and D Loomis. 2005. Exposure to inorganic arsenic in drinking water and total urinary arsenic concentration in a Chilean population. *Environ. Res.* 98:151-159.
- Choi HG, JS Park and PY Lee. 1992. Study on the heavy metal concentration in mussel and oyster from the Korean coastal water. *Bull. Korean Fish. Soc.* 25:485-494.
- Choi KY, SH Kim, GH Hong and HT Chon. 2012. Distributions of heavy metals in the sediments of South Korean harbors. *Environ. Geochem. Health* 34:71-82.
- Chu KW and KL Chow. 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metal is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquat. Toxicol.* 61:53-64.
- DeForest DK, KV Brix and WJ Adams. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: the inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquat. Toxicol.* 84:236-246.
- Dinnel PA, JM Link, QJ Stober, MW Letourneau and WE Roberts. 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassay to metals and pesticides. *Com. Toxi.* 18:748-755.
- Fathallah S, MN Medhioub, A Medhioub and M Kraiem. 2010. Toxicity of Hg, Cu and Zn on early developmental stages of the European clam (*Ruditapes decussatus*) with potential application in marine water quality assessment. *Environ. Monit. Assess.* 171:661-669.

- Franchet C, M Goudeau and H Goudeau. 1997. Mercuric ions impair the fertilisation potential, the resumption of meiosis, the formation of male pronucleus, and increase polyspermy, in the egg of the ascidian *Phallusia mammillata*. *J. Exp. Zool.* 278:255-272.
- Gebel TW. 1999. Arsenic and drinking water contamination. *Science* 283:1458-1459.
- Geffard OE, H His, JF Budzinski, A Chiffolleau, Coynel and H Etcheber. 2004. Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. *Environ. Pollut.* 129:457-465.
- Gopalakrishnan S, H Thilagam and PV Raja. 2007. Toxicity of heavy metals on embryogenesis and larvae of marine sedentary polychaete *Hydroides elegans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52:171-178.
- Gopalakrishnan S, H Thilagam and PV Raja. 2008. Comparison of heavy metal toxicity in life stages (spermiotoxicity, egg toxicity, embryotoxicity and larval toxicity) of *Hydroides elegans*. *Chemosphere* 71:515-528.
- Greewood PJ. 1983. The influence of an oil dispersant chem-serve OSE-DH on the viability of sea urchin gametes. Combined effects of temperature, concentration and exposure time on fertilization. *Aqua. Toxicol.* 4:15-29.
- Han TJ, YS Han, GS Park and SM Lee. 2008. Development marine ecotoxicological standard methods for *Ulva* sporulation test. *Kor. J. Soc. Ocean.* 13:121-128.
- Hwang UK, CW Lee, SM Lee, KH An and SY Park. 2008. Effects of salinity and standard toxic metal (Cu, Cd) on fertilization and embryo development in the sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*). *J. Environ. Sci.* 17:775-781.
- Hwang UK, CW Rhee, KS Kim, KH An and SY Park. 2009. Effects of salinity and standard toxic metal (Cu, Cd) on fertilization and embryo development rates in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *J. Environ. Toxicol.* 24:9-16.
- Hwang UK, HM Ryu, YH Choi, SM Lee and HS Kang. 2011. Effect of cobalt (II) on the fertilization and embryo development of the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 29:251-257.
- Hwang UK, S Heo, JS Park and HS Kang. 2012. Effects of lead and zinc on the fertilization and embryo development of the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *Korean J. Environ. Biol.* 30:128-135.
- Irving EC, RB Lowell, JM Culp, K Liber, Q Xie and R Kerrich. 2008. Effects of arsenic speciation and low dissolved oxygen condition on the toxicity of arsenic to a lotic mayfly. *Environ. Toxicol. Chem.* 27:583-590.
- Kobayashi N. 1971. Fertilized sea urchin egg as an indicator material for marine pollution bioassay preliminary experiment. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* 19:379-406.
- Kobayashi N. 1977. Preliminary experiments with sea urchin pluteus and metamorphosis in marine pollution bioassay. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* 24:9-21.
- Kobayashi N. 1981. Comparative toxicity of various chemicals, oil extracts and oil dispersant extracts to Canadian and Japanese sea urchin egg. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* 26:123-133.
- Kobayashi N. 1994. Application of eggs of the sea urchin (*Diadema Setosum*) in marine pollution bioassays. *Phuket Mar. Biol. Cent. Res. Bull.* 59:91-94.
- Lamm Sh, A Engel, MB Kruse, M Feinleib, DM Byrd, S Lai and R Wilson. 2004. Arsenic in drinking water and bladder cancer mortality in the United States: an analysis based on 133 U.S. counties and 30 years of observation. *J. Occup. Environ. Med.* 46:298-306.
- Lee SH and KW Lee. 1984. Heavy metals in mussels in the Korean coastal waters. *J. Oceanol. Soc. Korea* 19:111-117.
- Lewis DR, JW Southwick, R Ouellet-Hellstrom, J Rensch and RL Calderon. 1999. Drinking water arsenic in Utah: A cohort mortality study. *Environ. Health Perspect.* 107:359-365.
- Lonning S and BH Hagstrom. 1975. The effects of oil dispersants on the cell in the fertilization and development. *Norw. J. Zool.* 23:131-134.
- Martin JM and M Whitfield. 1983. The significance of river input of chemical elements to the ocean. In *Trace Metals in sea Water*. Plenum Press. New York. pp.265-296.
- Martin M, KE Osborn, P Bilig and N Glicksten. 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and Cancer magister larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12:305-308.
- Okubo K and T Okubo. 1962. Study on the bioassay method for the evaluation of water pollution-II, Use of the fertilized eggs of sea urchins and bivalves. *Bull. Toka. regional Fish Res. Lab.* 32:13-140.
- Pagano G, M Cipollaro, G Corsale, A Esposito, E Ragucciand and GG Giordano. 1985a. Ph-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis, I. Exposure of embryos. *Terato. Carcino. Mutage.* 5:101-112.
- Pagano G, M Cipollaro, G Corsale, A Esposito, E Ragucciand and GG Giordano. 1985b. Ph-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis, II. Exposure of sperm. *Terato. Carcino. Mutage.* 5:113-121.
- Phillips DJH and DA Segar. 1986. Use of bioindicators in monitoring conservative contaminants. *Mar. Pollut. Bull.* 17:10-15.
- Reiley MC. 2007. Science, policy and trends of metals risk assessment at EPA: how understanding metals bioavailability has changed metals risk assessment at USEPA. *Aquat. Toxicol.*



- col. 84:292-298.
- Sivakumar S and CV Subbhuraam. 2005. Toxicity of chromium (III) and chromium (VI) to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 105:51-58.
- Suh KH, KH Ahn, HS Lee, HG Lee, JK Cho and YK Hong. 1999. Biosorption of Pb and Cr by using *Sargassum sargamianum*. *J. Korean Fish Soc.* 32:399-403.
- Warnau M, M Iacarino, A de Biase, A Temara, M Jangoux, P Dubois and G Pagano. 1996. Spermiotoxicity and embryotoxicity of heavy metals in the echinoid *Paracentrotus lividus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:1931-1936.
- Wui IS, JB Lee and SH Yoo. 1992. Bioassay on marine sediment pollution by using sea urchin embryo culture in the south-west inland sea of Korea. *Korean J. Environ. Biol.* 10:92-99.
- Xia Y and J Liu. 2004. An overview on chronic arsenism via drinking water in PR China. *Toxicology* 198:25-29.
- Xu L, H Tian, W Wang and S Ru. 2012. Effects of monocrotophos pesticide on serotonin metabolism during early development in the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34:537-547.
- Yap CK, A Ismail and SG Tan. 2004. Heavy metal (Cd, Cu, Pb and Zn) concentrations in the green-lipped mussel *Perna viridis* collected from some wild and aquacultural sites in the west coast of Peninsular Malaysia. *Food Chem.* 84:569-575.
- Yu CM. 1998. A study on the effect of heavy metals on embryos formation of sea urchins. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* 24:6-10.

Received: 18 February 2013

Revised: 3 April 2013

Revision accepted: 4 April 2013