

Pb²⁺과 Carbofuran이 청개구리(*Hyla japonica*) 배아발달에 미치는 영향

Effect of Pb²⁺ and Carbofuran on the Embryo Development of Tree
Frog(*Hyla japonica*)

윤필상¹, 고선근²

호남대학교 대학원 생물학과¹, 호남대학교 생명과학과²

I. 연구목적

최근 양서류 개체 수는 현저히 감소하고 발생학적 기형이 증가하고 있는 추세이며 이러한 원인으로 서식지 파괴, 수질오염, 중금속, 농약 등을 들 수 있다. 중금속 중 Pb²⁺은 대기 중 미세분진에 흡착되어 호흡기로 노출되거나 제련소 근처의 공기, 토양, 수질의 오염으로 양서류의 배발생 이상 및 아가미기형, 척추기형, 꼬리기형, 신경관 이상 등을 유발하는 것으로 보고 되고 있으며 농약 중 Carbofuran은 미국 FMC사에 의해 1967년에 개발되어 1975년부터 벼멸구(Brown plant hoppers)와 이화명나방(Rice stemborers)등의 방제용 및 각종야채와 토양해충 방제 목적으로 사용되어지고 있다.

본 연구에서는 국내에 서식중인 개구리류 중 서식 및 분포 지역이 가장 넓고 채집이 용이한 청개구리의 배아를 배양하면서 Pb²⁺과 Carbofuran의 일정농도를 노출시켜 일정시간에 따른 사망률, 기형률, 기형양상, 가역성농도 등을 파악하여 Pb²⁺과 Carbofuran의 독성과약에 필요한 기초자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

청개구리는 전라남도 장성군 장성읍 단광리 일대에서 2006년 3월부터 2007년 6월까지 생활주기를 조사하면서 포접중인 암·수를 직접 채집하여 실험실에서 자연배란 및 수정과정이 유도된 배아들 중 세포질들이 균일한 할구들을 가진 배아들을 선택하여 젤리층을 제거하고 포배기 및 낭배기까지 배양하여 각각 실험에 사용하였다.

2. 배양액 및 중금속, 농약

배아의 세척 및 배양시에는 Amphibian Ringer용액(AR; 6.6g NaCl/ℓ, 0.15g KCl/ℓ, 0.15g CaCl₂/ℓ, 0.2g NaHCO₃/ℓ, 0.05g Streptomycin/ℓ, 0.03g Penicillin G/ℓ)을 제조한 후 pH 7.4로 맞추어 사용하였다. 시험물질로 사용했던 Pb²⁺은 1000ppm Stock solution(Junsei Chem.)을 AR용액으로 희석하여 사용하였으며 Carbofuran(75.6%; 2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol N-methylCarbamate, Sigma)을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 Stock solution으로 제조한 다음 AR용액에 희석하여 사용하였다.

3. 정상발생과정 조사

유리 배양접시에 시험물질들이 첨가되지 않는 배양액을 15ml를 넣고 30개의 배아들을 2세포기로부터 올챙이의 아가미 뚜껑 완성시기까지 25℃의 일정한 온도에서 진행되는 정상발생과정과 각 발생단계에 소요되는 시간을 조사하였다.

4. 시험물질 처리

직경이 60mm의 유리 배양접시에 시험물질이 농도별로 포함된 실험군과 시험물질이 포함되지 않는 대조군으로 나누어 24℃~25℃에서 농도구간을 5개 이상으로 정하여 96시간 노출시켜 시험물질의 효과를 조사하였고 아울러 시험물질에 12시간, 24시간, 48시간, 72시간 각각 노출시킨 후 AR용액으로 세척하여 시험물질이 포함되지 않는 배양액에 96시간 까지 배양하여 시험물질의 가역성여부를 조사하였으며 모든 시험은 3회 이상 반복 조사하였다.

5. 결과처리 및 분석

채취된 배아를 배양하면서 시험물질들의 각 농도별로 사망률을 조사하고 96시간 이후 3% Formalin에 고정하여 기형 개체 수 및 양상을 조사하고 그 결과들을 %로 환산하여 Probit analysis Program으로 분석하여 LC₅₀, EC₅₀을 구하였으며 LC₅₀ 값을 EC₅₀값으로 나누어 Teratogenic Index(TI)를 구하여 TI 값이 1.5 이상이 되면 유해성이 있는 물질로 판정하였다. 기형의 종류는 정상발생 올챙이를 기준으로 수포형성기형(Edema), 척추기형, 꼬리기형, 복부기형 등으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 청개구리 외부특징과 배란된 난자 수 및 크기 조사

청개구리 성체 수컷의 체중은 $2.5 \pm 0.6\text{g}$, 체장은 $3.2 \pm 0.2\text{cm}$, 체폭은 $1.3 \pm 0.1\text{cm}$, 뒷다리길이는 $4.2 \pm 0.5\text{cm}$ 정도이며 암컷의 체중은 $4.0 \pm 0.8\text{g}$, 체장은 $3.4 \pm 0.3\text{cm}$, 체폭은 $1.3 \pm 0.2\text{cm}$, 뒷다리길이는 $4.2 \pm 0.5\text{cm}$ 정도였다. 개체당 배란된 난자 수는 584.5 ± 170.0 개 정도이며 배란된 난자 직경은 $1.2 \pm 0.2\text{mm}$ 였다.

2. 청개구리의 발생과정 조사

수정후 낭배기(gastrulation)의 배아는 그 직경이 대략 $1.2\text{mm} \sim 1.3\text{mm}$ 정도의 크기를 나타내었고 수정란에서 낭배기까지 약 13.5시간이 필요하였으며 미아시기에는 약 $2.1\text{mm} \sim 2.2\text{mm}$ 정도의 크기를 나타내었고 대략 36시간이 필요하였다. 아가미구멍에 의해 열려있는 점막의 주름을 갖는 아가미 뚜껑주름시기의 전장길이는 $6.0\text{mm} \sim 6.4\text{mm}$ 정도이며 수정 후 대략 110시간 정도가 필요하였다.

3. Pb^{2+} 의 효과

(1) Pb^{2+} 의 효과 중 LC_{50} 은 0.005ppm , EC_{50} 은 0.003ppm , TI 값은 1.6을 나타내어 Pb^{2+} 은 청개구리 배아 발달에 최기형성 물질로 작용함을 알 수 있었다.

(2) 치사율은 0.001ppm 에서부터 30%의 배아가 치사되었으며 0.05ppm 에서는 90% 이상이 치사되었고 0.5ppm 에서는 100% 치사율을 나타내었다. 또한 기형율은 0.001ppm 에서 43%, 0.005ppm 에서 72%, 0.01ppm 에서 38%, 0.05ppm 에서 50%를 나타내었다. 기형양상은 수포형성기형은 26.3%, 척추기형이 15.8%, 꼬리기형이 15.8%, 복부기형이 42.1%의 비율을 나타내었다.

(3) Pb^{2+} 효과의 가역성 조사

Pb^{2+} 의 효과에 대한 가역성을 조사하기 위해 각 농도별로 12시간, 24시간, 48시간, 72시간씩 Pb^{2+} 에 노출시킨 후 Pb^{2+} 이 포함되지 않는 보통 배양액으로 옮겨 96시간까지 배양하여 배아들의 생존율을 조사한 결과 0.005ppm 에서는 대부분의 배아들이 회복현상을 나타내었으나(회복율 80% 이상) 0.01ppm , 0.05ppm , 0.1ppm 의 경우 12시간, 24시간의 노출에서는 70% 이상의 회복율을 나타내었으나 48시간, 72시간 노출 시에는 50%미만의 회복율을 나타내었고 0.5ppm 이상의 농도에서는 24시간의 비교적 단시간 노출에도 회복율이 20%미만을 나타내

어 거의 회복이 불가능한 비가역적인 효과를 나타내었다.

4. Carbofuran의 효과

- (1) Carbofuran의 효과 중 LC₅₀은 23.9ppm, EC₅₀은 13.8ppm, TI값은 1.7을 나타내어 Carbofuran은 청개구리 배아 발달에 최기형성 물질로 작용함을 알 수 있었다.
- (2) 치사율은 1ppm에서부터 3%의 배아가 치사되었고 25ppm에서는 23%이상이 치사되었으며 50ppm이상에서는 100% 치사율을 나타내었다. 또한 기형율은 0.01ppm에서 10%, 0.1ppm에서 7%, 1ppm에서 7%, 5ppm에서 36%, 10ppm에서 44%, 25ppm에서 39%의 기형율을 나타내었다. 기형양상은 수포형성기형이 4.7%, 척추기형이 37.2%, 꼬리기형이 44.2%, 복부기형이 14.0% 비율을 나타내었다.
- (3) Carbofuran 효과의 가역성 조사

Carbofuran의 효과에 대한 가역성을 조사하기위해 각 농도별로 12시간, 24시간, 48시간, 72h시간 Carbofuran에 노출시킨 후 Carbofuran이 포함되어지지 않는 보통 배양액으로 옮겨 96시간까지 배양하여 배아들의 생존율을 조사하였다. 그 결과 25ppm에서는 75%의 생존율을 나타내었던 배아들이 90%이상의 회복율을 나타내었고 50ppm 이상의 농도에서는 96시간 노출 시 100%의 사망률을 나타내었던 배아들이 90%이상의 회복율을 나타내었다.

IV. 고찰

청개구리의 전국적 분포양상, 채집의 용이성, 배란된 난자 수, 배아들의 배양을 통하여 청개구리 배아는 환경오염물질의 독성효과를 파악하는데 좋은 모델로 활용되어질 수 있음을 확인 할 수 있었다. 본 시험에 사용했던 시험물질 모두가 청개구리 배아의 발생과정에 매우 민감하게 반응하여 Pb²⁺의 경우 배아들을 짧은 시간내에 급성 치사시키거나 매우 낮은 농도에서 발생을 저해하고 기형을 유발하였고 일정농도에서 회복이 불가능한 비가역적인 효과를 나타내었으며 Carbofuran의 경우 Pb²⁺에 비해 높은 농도에서 긴 시간 노출 이후 발생을 저해하고 기형을 유발하는 만성적인 독성현상을 나타내었다. 본 결과들은 청개구리의 배아를 활용한 화학물질 독성평가의 기초자료로 활용되어질 수 있을 것으로 여겨지며 이들의 작용기작을 파

악하기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

V. 참고문헌

1. 고선근, 2003. Carbofuran이 산개구리 배아 발생에 미치는 영향.
2. 정 용, 황만식, 양지연, 조성준, 1999. 납의 다경로 노출에 의한 건강위해성 평가: 우리나라 일부 지역 성인들을 대상으로. *한국환경독성학회지*. 14(4): 203~216.
3. Burkhart, J.G., J.C. Helgen, D.J. Fort, K. Gallager, D. Bowers, T.L. Propst, M. Gemes, J. Magner, M.D. Shelby and G. Lucier, 1998. Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. *Environ. Health Perspect* 106: 841~848.
4. Johnson, R.E. and E.P. Volpe, 1973. Patterns and Experiments in developmental biology. In *Observation and Experiments on the Living Frog Embryo*. W. M. C. Brown Co. pp. 215-227.
5. Perez-Coll, C.S., J. Herkovits, 1990. Stage dependent susceptibility to lead in *Bufo arenarum* embryos. *Environ. Pollut.* 62: 239-245.
6. Perez-Coll, C.S., J. Herkovits, A. Salibian, 1988. Embryotoxicity of lead on *Bufo arenarum*. *Bull. Environ. Contom. Toxicol.* 41: 247-252.
7. Sobotka, J.M., R.G. Rahwan, 1995. Teratogenesis induced by short- and long-term exposure of *Xenopus laevis* progeny to lead. *J. Toxicol. Environ. Health* 44: 469-484.