

## 중금속 이온이 두꺼비 배아 발달에 미치는 영향

# Effect of Heavy Metal Ions on the Embryo Development of *Bufo bufo gargarizans*

노남호<sup>1</sup> · 고선근<sup>2</sup>

<sup>1</sup>호남대학교 대학원 생물학과, <sup>2</sup>호남대학교 생물학과

### I. 서론

환경오염물질의 대표적인 중금속은 공장 폐수 및 차량에서 배출되어 대기, 수질 그리고 토양 오염을 유발하며 생태계 전반에 걸쳐 피해를 일으켜 인간을 포함한 척추동물의 호르몬 이상이나 생물체의 기형 유발의 원인이 된다(Blaustein, 1994; Pechman and Wilbur, 1994). 중금속중 아연과 카드뮴은 타이어가 마모되면서 배출되며, 디젤연료로부터 카드뮴이 가솔린 연료로부터 납이 배출된다(Lindsay, 1979).

양서류중 대형종인 두꺼비는 번식시기에 산지주변의 저수지에 긴 띠모양의 알덩어리를 산란하고 수심이 얇은 저수지의 가장자리에 있는 수초나 물고인 논에 산란한다. 또한 농경지나 계류 등에서 서식하는 점과 매년 일정한 장소에서 산란하는 특이한 습성으로 인해 농약 등의 환경오염 물질에 노출되어 영향을 받기 쉬우므로 환경지표로서 역할을 할 수 있고, 환경의 질을 평가하는데 있어 매우 신빙성 있는 생물로 취급받고 있다(최 등, 2002). 본 연구에서는 국내에 서식하고 있으나 아직까지 연구가 진행되어 있지 않는 두꺼비 배아를 활용하여 번식주기(reproductive cycle) 및 배아 채취 가능시기를 조사하고, 이들의 배아를 배양하면서 중금속중 아연( $Zn^{2+}$ ), 카드뮴( $Cd^{2+}$ ), 납( $Pb^{2+}$ )의 일정농도를 노출시켜 일정시간에 따른 사망률, 성장률, 기형률, 기형양상 등을 파악하여 아연( $Zn^{2+}$ ), 카드뮴( $Cd^{2+}$ ), 납( $Pb^{2+}$ )의 독성 파악에 필요한 자료를 제공하고자 한다.

### II. 재료 및 방법

#### 1. 실험동물 및 생활주기

실험동물은 광주지역에 서식하는 양서류 중 두꺼비를 대상으로 하여 이들의 생활주기를 파악하기 위해 광주지역을 대상으로 2008년 2월부터 2009년 8월까지 연중 생활주기를 조사하였으며 광주광역시 광산구 운수동일대에서 2009년 2월 10일부터 2009년 3월 15일까지 두꺼비를 채집하였다. 이들의 생활주기는 동면에서 깨어나 최초로 활동을 시작하는 개체들이 발견된 시기를 출현기로 정하였으며 출현기부터 동면에 들어가기 전까지 활동하는 시기를 활동기로 정하였다. 또한 번식을 시작하여 포접중인 개체들이 발견된 시기를 번식기로 정하였으며 동면에 들어가 이듬해 출현하기 전까지를 동면하는 시기를 동면기로 정하였다(문교부, 1975; 양, 2000).

#### 2. 수정란 채취

시험에 필요한 배아를 얻기 위해서 자연산란 시기에 포접된 두꺼비 암·수 성체를 직접 채집하여 실험실에서 자연배란 및 수정을 유도시켜 사용하였다.

#### 3. 배양액제조 및 화학물질처리

배아의 세척 및 배양시에는 Amphibian Ringer용액(AR; 6.6g NaCl/L, 0.15g KCl/L, 0.15g  $CaCl_2/L$ , 0.2g  $NaHCO_3/L$ , 0.05g Streptomycin/L, 0.03g Penicillin G/L)을 제조한 후 pH 7.4로 맞추어 사용하였다(고 와 이, 1997). 두꺼비 배아의 발달단계에 미치는 영향을 보기 위해 사용했던  $Pb^{2+}$ 은 1000ppm Stock solution(Junsei Chem.)을  $Cd^{2+}$ 은 1000ppm Stock solution(KANTO Chem.)을  $Zn^{2+}$ 은 1000ppm Stock solution(KANTO Chem.) AR용액으로 희석하여 사용하였다.

#### 4. 배아채취 및 배양

수정을 유도한 후 1시간 30분 이내에 2세포 배아들이 출현하면(Johnson and Volpe, 1973) 2세포 배아들 중 세포질들이 정확히 나누어져 균일한 할구들을 가진 배아들을 선택하여 예리한 forceps으로 켈리층을 제거하고 포배기 및 낭배기까지 배양하여 시험에 사용하였다.

#### 5. 시험물질 처리

직경이 60mm의 유리 배양접시에 시험물질이 농도별로 포함된 실험군과 시험물질이 포함되지 않는 대조군으로 나누어  $20\pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도에서 각 중금속별로 5개 이상의 농도구간을 정하여 배양된 배아들을 10개씩 각 농도별로 96시간 노출시켜 시험물질의 효과를 조사하였으며 실험에 따른 반복성을 조사하기 위해 3회 이상 반복 실험을 하였다.

#### 6. 결과분석

##### (1) 사망률 (Mortality)

24시간마다 관찰하여 죽은 것을 제거하고 96시간 후 생존된 것을 관찰하였다. 운동성이 없는 배아를 죽은 것으로 판정하였으며 (죽은 개체 수÷노출 개체 수)×100으로 계산하여 한 농도의 사망률을 구하였다. 대조군의 사망률이 10%를 넘으면 실험의 신뢰도가 떨어지므로 재 실험을 실시하였다.

##### (2) 기형률 (Malformation)

96시간동안 매 24시간마다 죽은 배아의 수를 계수하고 만 96시간이 경과되는 시점에 살아 있는 올챙이를 대상으로 하여 머리, 복부, 및 꼬리 등 각 부위별로 기형 여부를 조사하였다. 정상 개체의 범위에서 벗어나면 모두 기형으로 판정하였으며 (96시간 후 살아서 영향을 받은 개수÷96시간 후 살아있는 개수)×100으로 계산하여 각 농도 별 기형률을 구하였다.

##### (3) 기형의 종류

기형의 종류는 정상발생 올챙이를 기준으로 올챙이 꼬리가 파상을 나타내는 양상, 꼬리가 휘어지는 양상 등을 관찰하여 꼬리기형(Tail abnormality)으로 판정하였고 끝부분이

등쪽으로 굽어 있거나 활모양을 나타내는 기형양상을 척추기형(Spine abnormality)으로 판정하였다. 복부의 돌출현상 등을 관찰하여 복부기형(Abdominal abnormality)으로 판정하였으며 몸 전체에 형성된 수포(물집)의 형성을 관찰하여 수포형성기형(Edema abnormality)으로 판정하였다 (Bantle *et al.*, 1991).

### Ⅲ. 결과

#### 1. 두꺼비의 생활주기

광주 지역에서 두꺼비는 출현기는 2월 초순에 동면에서 깨어나 활동을 시작하며 번식기는 2월 중순부터 물이 고인 웅덩이 일대에 산란을 시작하여 지역에 따라 3월 중순까지 번식을 한다. 또한 활동기는 2월 중순부터 주로 웅덩이 주변에서 서식하나 임야나 구릉, 밭 주변, 작은 가지, 관목, 풀속 등의 습지에서 동면을 들어가기 전 10월 중순까지 활동을 하며 동면기는 10월 하순에 땅속으로 들어가서 이듬해 2월 초순까지 동면을 하는 것으로 나타났다.

#### 2. 두꺼비 암·수 성체의 체형

포집중인 10쌍의 두꺼비를 채집하여 체중, 체장, 체폭, 뒷다리길이 등을 조사한 결과 번식이 가능한 두꺼비 성체 수컷의 체중은 평균  $64.5\pm 8\text{g}$  정도이고 체장은  $7.5\pm 5.5\text{cm}$  정도이며 체폭은  $2.7\pm 0.3\text{cm}$  정도이고 뒷다리의 길이는  $10.4\pm 0.7\text{cm}$  정도였다. 한편, 암컷의 경우 체중은

평균  $195\pm 43\text{g}$  정도이고 체장은  $10.7\pm 1.2\text{cm}$  정도이며 체폭은  $3.9\pm 0.4\text{cm}$  정도이고 뒷다리길이는  $12.8\pm 0.9\text{cm}$  정도였다.

#### 3. 두꺼비 암컷의 배란된 난자수 및 크기

개체당 배란된 난자 수는  $13000\pm 3300$ 개 정도를 나타내어 평균 약 13000개 정도의 난자를 산란하는 것으로 나타났으며, 배란된 난자의 직경은  $2.1\pm 0.1\text{mm}$  정도였다.

#### 4. $\text{Cd}^{2+}$ 의 효과에 의한 두꺼비 배아의 사망률, 성장률, 기형을 및 기형양상

$\text{Cd}^{2+}$ 이 두꺼비 배아의 발달에 미치는 영향 중 사망률, 성장률, 기형을 및 기형양상을 조사하기 위해  $\text{Cd}^{2+}$  0.01,

0.05, 0.1, 0.5, 1ppm을 처리한 후 96시간 배양하여 그 효과를 대조군과 비교하였다. 그 결과, 0.1ppm에서 4%의 배아가 치사되었으며 0.5ppm에서는 84%의 배아가 치사되었다. 농도가 높아질수록 죽는 배아의 비율도 높아졌으며 1ppm 이상의 농도에서는 배아가 모두 치사하여 100%의 치사율을 나타내었다.

기형은 0.01ppm에서부터 12%의 비율로 나타나기 시작하여 0.1ppm에서는 17%의 기형률을 나타내었고 0.5ppm에서 100%의 기형률을 나타내었다. 0.05ppm에서는 꼬리기형(50%), 머리기형(25%), 복부기형(25%)이 나타났으며 0.01, 0.1, 0.5ppm에서는 꼬리기형(100%) 나타내었다. 성장률은 대조군에서 7.9mm를 나타내었으나 0.01ppm에서는 7.6mm를 나타내었고 0.5ppm에서는 4.3mm를 나타내어 현저히 성장을 억제하였다.

### 5. Pb<sup>2+</sup>의 효과에 의한 두꺼비 배아의 사망률, 성장률, 기형률 및 기형양상

Pb<sup>2+</sup>이 두꺼비 배아의 발달에 미치는 영향 중 사망률, 성장률, 기형률 및 기형양상을 조사하기 위해 Pb<sup>2+</sup> 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1ppm을 처리한 후 96시간 배양하여 그 효과를 대조군과 비교하였다. 그 결과, 0.01ppm에서 24%의 배아가 치사되었으며 0.1ppm에서 16%의 배아가 치사되었고 0.5ppm에서는 60%의 배아가 치사되었으며 1ppm이상의 농도에서는 배아가 모두 치사하여 100%의 치사율을 나타내었다. 기형은 0.01ppm에서는 8%의 낮은 기형률을 나타내었으나 0.5ppm에서는 90%의 비율로 높은 기형을 나타내었다. Pb<sup>2+</sup>의 영향에 의해 나타난 기형의 종류로는 0.01ppm에서는 척추기형(50%), 꼬리기형(50%)이 나타났으며, 0.5ppm에서는 척추기형(37.0%), 꼬리기형(29.6%), 머리기형(11.1%), 복부기형(7.4%), 심한기형(14.8%)로 다양한 기형을 나타내었다. 성장률은 대조군에서 7.8mm를 나타내었으나 0.01ppm에서도 7.8mm를 나타내어 성장에 미치는 영향이 미비하였으나 0.1ppm에서 7.6mm를 나타내어 성장에 영향을 미치다가 1ppm에서는 4.7mm로 현저히 성장을 억제하였다.

### 6. Zn<sup>2+</sup>의 효과에 의한 두꺼비 배아의 사망률, 성장률, 기형률 및 기형양상

Zn<sup>2+</sup>이 두꺼비 배아의 발달에 미치는 영향 중 사망률,

성장률, 기형률 및 기형양상을 조사하기 위해 Zn<sup>2+</sup> 0.1, 0.5, 1, 5, 10ppm을 처리한 후 96시간 배양하여 그 효과를 대조군과 비교하였다. 그 결과, 1ppm 이하의 농도에서는 배아의 치사하지 않았으나 5ppm에서는 50%의 배아가 치사되었고 10ppm에서는 100%의 배아가 치사되었다. 기형은 1ppm의 농도에서는 2%의 낮은 기형률이 나타났으나 5ppm에서는 92%의 기형률을 나타내었다. Zn<sup>2+</sup>의 영향에 의해 나타난 기형의 종류로는 0.1ppm에서 척추기형(20%), 꼬리기형(40%), 머리기형(20%), 복부기형(20%), 0.5ppm에서 수포(14%), 척추기형(29%), 꼬리기형(14%), 머리기형(14%), 복부기형(29%), 5ppm에서 척추기형(46%), 꼬리기형(35%), 머리기형(15%), 복부기형(2%), 심한기형(2%)를 나타내었다. 성장률은 대조군에서 7.8mm를 나타내었으며 0.1ppm ~ 1ppm까지는 성장에 미치는 영향이 대조군과 크게 차이가 나지 않았으나 5ppm에서 4.5mm를 나타내어 현저히 성장에 대한 저해효과를 나타내었다.

## IV. 고찰

두꺼비의 전국적 분포양상, 채집의 용이성, 서식지의 특이성, 배란된 난자 수, 배아들의 배양을 통하여 두꺼비 배아는 환경오염물질의 독성효과를 파악하는데 좋은 모델로 활용되어질 수 있음을 확인할 수 있었다. 본 시험에 사용했던 시험물질 모두가 낮은 농도에서 두꺼비 배아의 발생과정에 매우 민감하게 반응하여 발생을 저해하고 기형을 유발하였으며 카드뮴(Cd<sup>2+</sup>)과 납(Pb<sup>2+</sup>)의 경우 0.5ppm에서 아연(Zn<sup>2+</sup>)의 경우 1ppm에서 성장에 대한 저해효과를 나타냈다. 본 결과들은 두꺼비 배아를 활용한 화학물질 독성평가의 기초자료로 활용되어질 수 있을 것으로 여겨지며 이들의 작용기작 등을 파악하기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## V. 인용문헌

- Blaustein, A. R. 1994. Chicken little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. *Herpetologica*. 50(1): 85-97.
- Pechman, J. H. K. and H. M. Willbur, 1994. Putting declining amphibian populations into perspective: Natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica*. 50: 65-84.
- Lindsay, W.L. (1979) Chemical equilibria in soils. A Wiley-

- Interscience Publication. New York. USA.
- 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.
- 고선근, 이두표, 1997. 중금속 이온이 산개구리 난자성숙에 미치는 영향에 관한 연구. 한국환경생태학회지. 11(3): 310-315.
- Bantle J. A., J. N. Dumont, R. A. Finch and G. Linder, 1991. Atlas of abnormalities: A guide the performance of FETAX. Oklahoma State Publications Department. 71pp.