

## Formalin이 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 난 발생 및 부화자어에 미치는 영향

박창범, 나오수, 이치훈, 김병호<sup>1</sup>, 이영돈\*, 허문수<sup>2</sup>, 이정재<sup>2</sup>, 정상철<sup>2</sup>,  
이기원<sup>2</sup>, 노 섭<sup>2</sup>, 송춘복<sup>2</sup>, 최광식<sup>2</sup>, 이제희<sup>2</sup>, 여인규<sup>2</sup>, 전유진<sup>2</sup>

제주대학교 해양과환경연구소, <sup>1</sup>류큐대학 열대생물권연구센터, <sup>2</sup>제주대학교 해양생산과학부

## Effects of Formalin on the Development of Fertilized Eggs and Hatched Larvae in Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Chang Bum Park, Oh Soo Na, Chi Hoon Lee, Byung Ho Kim<sup>1</sup>, Young Don Lee\*,  
Moon Soo Heo<sup>2</sup>, Jung Jae Lee<sup>2</sup>, Sang Chul Chung<sup>2</sup>, Ki Wan Lee<sup>2</sup>,  
Sum Rho<sup>2</sup>, Choon Bok Song<sup>2</sup>, Kwang Sik Choi<sup>2</sup>, Je Hee Lee<sup>2</sup>,  
In Kyu Yeo<sup>2</sup> and You Jin Jeon<sup>2</sup>

Marine and Environmental Research Institute, Cheju National University, Jeju 695-814, Korea  
<sup>1</sup>Sesoko Station, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus, Motobu, Okinawa, Japan  
<sup>2</sup>Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

### ABSTRACT

Effects of formalin treatment on embryogenesis and larvae growing in fertilized eggs and hatched larvae of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* were investigated. Fertilized eggs and hatched larvae were exposed to aqueous solution with 100, 200, 400, 800 and 1,000 ppm of nominal formalin concentration. They were kept in sea water of 16, 18 and 22°C, respectively. Survival rate and hatchability of fertilized eggs were high in control groups more than formalin treated groups in 16, 18 and 22°C, respectively ( $P < 0.05$ ). A similar effect that survival rate of hatched larvae was also observed for control and treatment groups. On the other hand, fertilized eggs treated with 400 ppm formalin, were all death in kept in 22°C. These results suggest that high-dose of formalin in fertilized eggs and hatched larvae in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* was inhibited the normal embryogenesis for fertilized eggs and growing for hatched larvae. Also, these inhibited effects was promoted in higher temperature.

**Key words** : Formalin, Olive flounder, Survival rate, Hatching rate

### 서 론

대표적인 양식대상 어류인 넙치, *Paralichthys oli-*

*vaceus*의 종묘생산은 육상수조식 양식장에서 이루어지고 있고, 이들 양식장에서 세균성 및 기생충성 질병의 예방과 구제제로 포르말린 (formalin) 이 사용되고 있다.

포르말린은 포름알데히드 (formaldehyde)의 약 37% 수용액으로 어류에 있어 노출된 조직의 손

\* To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-64-782-8922, E-mail: leemri@cheju.ac.kr

상, 혈액학적 수치, 저산소상태 (hypoxia)를 유발한다 (Wedemeyer and Yasutak, 1974; Willians and Wootten, 1981; Beevi and RAdhakrishnan, 1987; Yamamoto, 1991; Boden steiner *et al.*, 1993). 또한, 포르말린이 해산어류에 미치는 영향에 관한 연구로서 포르말린과 중성포르말린으로 약육한 조피볼락, *Sebastes schlegelii*의 formaldehyde 잔존량 측정과 병리 조직학적 관찰 (조와 양, 1996), 넙치에 대한 포르말린 급성독성효과 (박 등, 1995; 방 등, 1996), 넙치 치어에 대한 포르말린의 반수치사농도 및 반수치사시간 (정과 김, 1998), 그리고 포르말린을 이용한 기생충 구제의 안전성 연구 (정과 김, 1997) 등이 있다. 그러나, 지금까지의 연구들은 포르말린에 대한 내성이 비교적 강한 치어시기 이후에 국한되어 있으며, 어류의 생활사 중 환경물질에 가장 민감한 시기인 배발생 시기와 부화자어 시기에 있어서 포르말린의 영향을 평가한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 이 연구는 포르말린이 연안 생물의 수정란과 유생에 미치는 영향을 탐색하고자 넙치, *P. olivaceus* 수정란을 재료로 사용하여 포르말린 농도와 수온에 따른 넙치 수정란의 발생과 부화율 그리고 부화된 자어의 생존율과 기형 개체 발생 등을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 수정란

실험 시작시 넙치 수정란의 발생 단계는 상실기 단계였다. 실험구별로 1L 유리 비이커에 여과해수를 900 ml를 넣고 100개씩 수용하였다.

수온의 변화에 따른 포르말린의 영향을 조사하기 위해 수온은 일반적으로 넙치 종묘생산시의 사육수온 범위인 16, 18 그리고 22°C로 설정하였다. 실험에 사용한 포르말린은 포름알데히드 37%가 용해된 포르말린 (Yakuri Pure Chemical, Japan)을 사용하였다. 포르말린의 처리농도는 각 수온별로 100, 200, 400, 800 그리고 1,000 ppm으로 설정하였고, 8시간마다 포르말린 침적 처리와 사육수를 전량 환수 시켰다. 그리고 대조구는 여과한 해수만을 공급하였고, 포르말린 처리구와 동일하게

8시간마다 사육수를 전량 환수시켰다.

수정란의 생존율은 포르말린 처리 후 48시간 동안 8시간 간격으로 죽은 개체를 관찰하여, 실험 개시할 때 수용한 100개의 수정란에 대한 백분율로 산출하였다. 수정란의 부화율은 포르말린 처리 후 32시간까지 부화된 개체를 관찰하여 100개의 수정란에 대한 백분율로 산출하였다. 각각의 실험 결과는 2회 반복 실험 자료의 평균값으로 구하였다.

### 2. 부화자어

부화자어는 수정란에서 부화한 후 1시간 이내의 것을 1L 유리 비이커에 100마리씩 수용하였다. 포르말린의 처리 방법은 수정란 실험과 동일하게 하였다. 부화자어의 생존율은 포르말린 처리 후 0, 2, 4, 8, 16 그리고 32시간후에 죽은 개체를 관찰하여 실험 개시할 때 수용한 100마리에 대한 백분율로 산출하였다. 각각의 실험 결과는 2회 반복 실험자료의 평균값으로 구하였다.

### 3. 통계분석

각각의 실험결과는 Statistical Analysis (SAS Institute North Caroline, USA) 통계처리 프로그램을 이용하여 ANOVA-test를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 1. 생존율

#### 1) 수정란

수온 16, 18 그리고 22°C에서 48시간 동안 포르말린 100, 200, 400, 800 그리고 1,000 ppm 농도로 침적 처리한 수정란의 생존율은 Fig. 1과 같다.

수온 16°C에서 대조구의 생존율은 87.5%였고, 처리구의 생존율은 각각 65.0, 62.5, 66.0, 63.5 그리고 52.5%로 대조구의 생존율에 비해 낮았고 ( $P < 0.05$ ), 포르말린 1,000 ppm 처리구를 제외하고 처리구간에 유의한 차이는 없었다 ( $P > 0.05$ ).

수온 18°C에서 대조구의 생존율은 89.5%였고, 처리구의 생존율은 각각 78.0, 79.0, 75.0, 72.0 그리고 62.0%로 대조구의 생존율에 비해 낮았고 ( $P <$

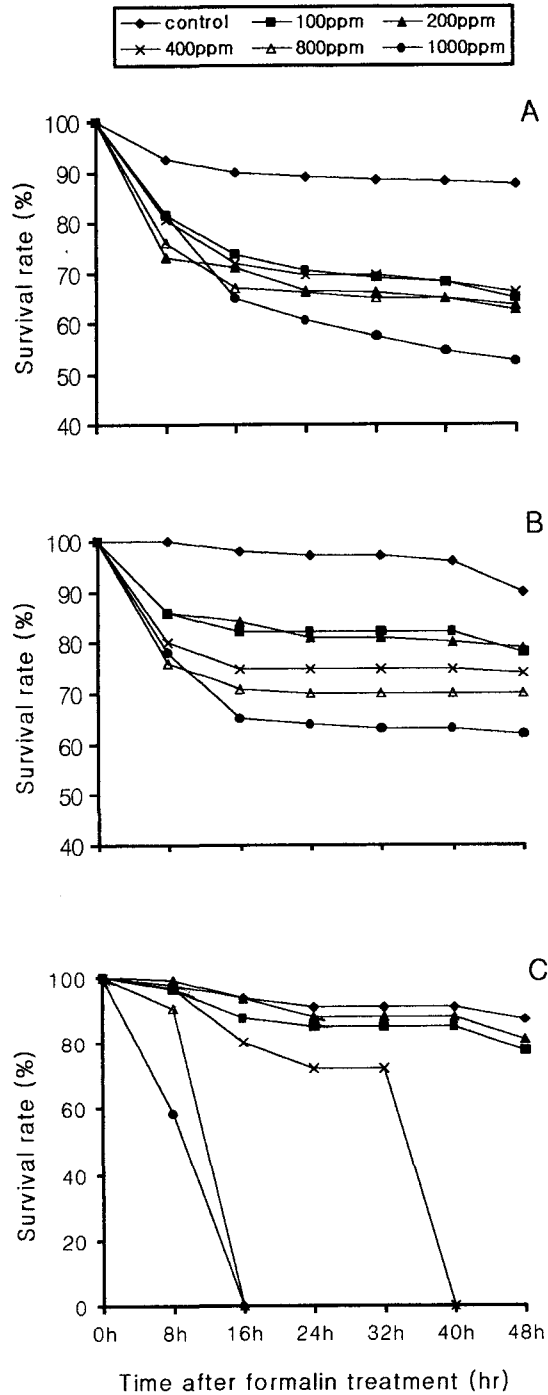


Fig. 1. Survival rate by formalin treatment of various concentration in fertilized eggs of olive flounder, *P. olivaceus*. Fertilized eggs were kept in sea water of 16 (A), 18 (B) and 20°C (C), respectively.

0.05), 1,000 ppm을 제외하고 처리구간에 유의한 차이는 없었다 ( $P > 0.05$ ).

수은 22°C에서 대조구의 생존율은 86.5%였고, 포르말린 100과 200 ppm 처리구들의 생존율은 각각 78.5와 80.5%로 대조구와 유의한 차이는 없었으나, 포르말린 400 ppm 처리구는 40시간 이내에 전 개체가 사망하였으며, 포르말린 800과 1,000 ppm 처리구는 16시간 이내에 전 개체가 급격히 사망하였다.

2) 부화자어

수은 16, 18 그리고 22°C에서 32시간 동안 포르말린 100, 200, 400, 800 그리고 1,000 ppm 침적 처리한 부화자어의 생존율은 Fig. 2와 같다.

수은 16°C에서 대조구의 생존율은 71.5%였고, 처리구의 생존율은 24.0, 34.0, 22.0, 20.0 그리고 12%로 대조구 보다 생존율이 낮았고 ( $P < 0.05$ ), 1,000 ppm을 제외하고 처리구간에 유의한 차이는 없었다 ( $P > 0.05$ ).

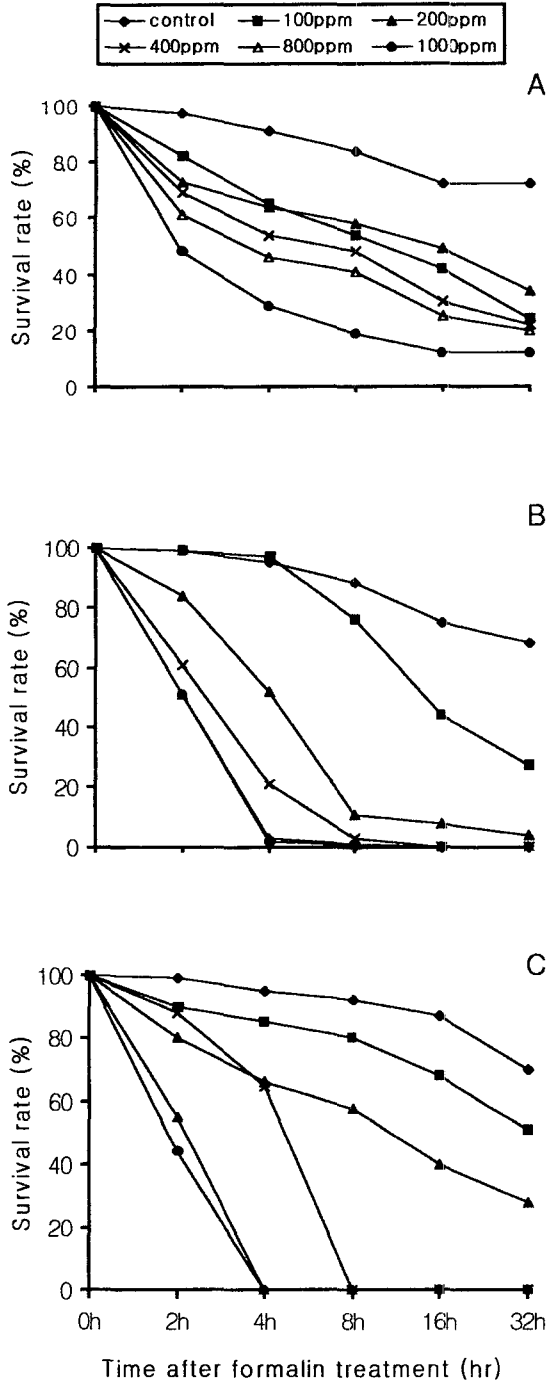
수은 18°C에서 대조구의 생존율은 68.0%였고, 포르말린 100과 200 ppm 처리구의 생존율은 27.5와 3.5%로 대조구에 비해 급격히 낮았으며, 포르말린 400 ppm 이상 처리구는 16시간 이내에 전 개체가 사망하였다.

수은 22°C에서 대조구의 생존율은 70.0%였고, 포르말린 100과 200 ppm 처리구의 생존율은 50.5와 27.5%로 대조구의 생존율 보다 낮았고, 포르말린 100 ppm에서 보다 포르말린 200 ppm 처리구의 생존율이 낮았다 ( $P < 0.05$ ). 포르말린 400 ppm 처리구는 8시간 이내에 전 개체가 사망하였고, 포르말린 800 ppm 이상 처리구는 4시간 이내에 전 개체가 사망하였다.

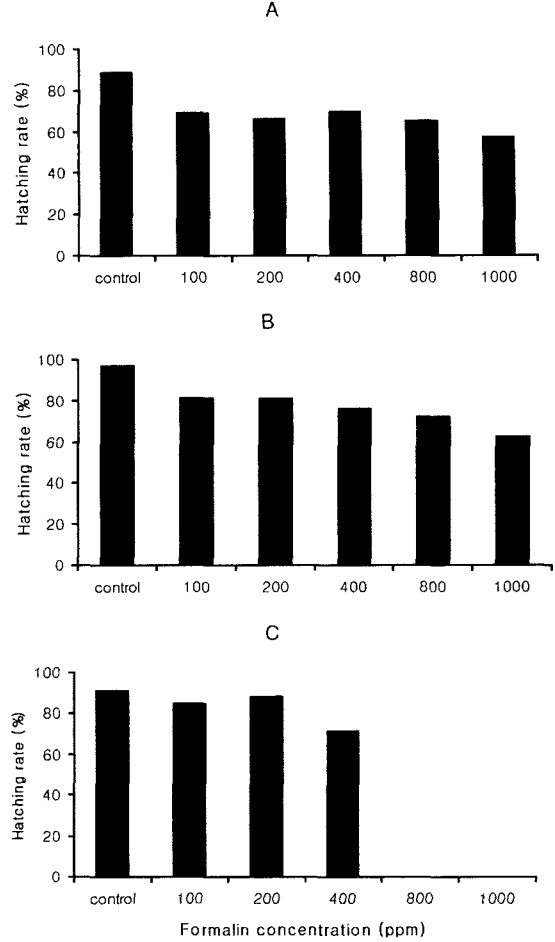
2. 부화율

수은 16, 18, 그리고 22°C에서 32시간 동안 포르말린 100, 200, 400, 800 그리고 1,000 ppm 농도로 침적 처리한 수정란의 부화율은 Fig. 3과 같다.

대조구의 부화율은 각각 89.0, 97.0 그리고 91.0 %였다. 수은 16과 18°C에서 처리구의 부화율은 대조구 보다 낮았고, 수은 22°C에서 포르말린 100과 200 ppm 처리구의 부화율은 84.5와 88.0%로 대조구와 유의한 차이는 없었으나, 포르말린 400 ppm 처리구의 부화율은 71.5%로 대조구와 유의



**Fig. 2.** Survival rate by formalin treatment of various concentration in hatched larvae of olive flounder, *P. olivaceus*. Fertilized eggs were kept in sea water of 16 (A), 18 (B) and 20°C (C) temperature, respectively.



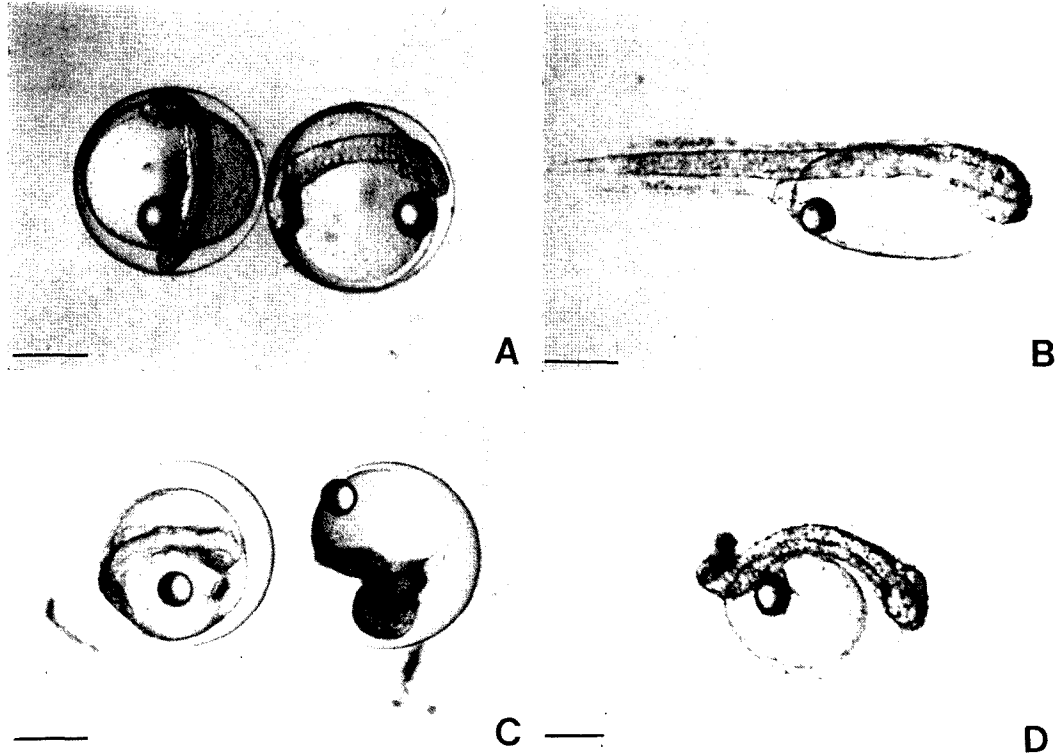
**Fig. 3.** Hatching rate by formalin treatment of various concentration in fertilized eggs of olive flounder, *P. olivaceus*. Fertilized eggs were kept in sea water of 16 (A), 18 (B) and 20°C (C), respectively.

한 차이가 있었다 ( $P < 0.05$ ). 그리고 포르말린 800 ppm 이상 처리구는 부화하기 전에 전 개체가 사망하였다.

### 3. 기형 개체

수온을 달리하여 포르말린 처리시, 수정란과 부화자의 초기 발달과정에서 이상발생을 한 개체는 Fig. 4와 같다.

대조구에서 수정란은 정상적인 발생과정을 거쳐 부화가 일어났으나 (Fig. 4A, B), 포르말린 처리구에서 수정란은 배체 형성 단계 중에 정상 발생



**Fig. 4.** Photomicrographs of embryo and larvae by formalin treatment in fertilized eggs of olive flounder, *P. olivaceus*. Normal embryo (A) and hatched larvae (B). Formalin treated embryo (C) and hatched larvae (D). Scale bars indicate 430  $\mu\text{m}$ .

하는 수정란의 배체 형성과 달리 난막이 찌그러지거나 비정상적인 배체 형성이 발생했고 (Fig. 4C), 부화자어들은 정상개체의 외부형태와 척추형성과 달리 척추만곡이나 꼬리 부분의 탈락이 관찰되었다 (Fig. 4D).

### 고 찰

포르말린의 독성은 사육수조의 여러 환경 요인 중 암모니아성 질소, 용존산소, pH, 수온 등과 깊은 관련이 있고, 특히 높은 수온과 낮은 pH 조건에서 그 독성이 증가한다 (Piper and Smith, 1973). 조피볼락을 대상으로 수온 15와 25°C에서 포르말린과 중성 포르말린 100, 300 그리고 500 ppm 침적 처리하여 병리학적인 영향을 조사한 결과 아가미, 근육, 상피 조직의 손상을 주지만, 저농도 처

리시 수온 15와 25°C에서는 별다른 차이가 없었다 (조와 양, 1996). 그리고, 수온 19°C에서 넙치 치어에 24시간 동안 포르말린 100, 120, 140, 160, 180 그리고 200 ppm 침적처리시 고농도일수록 생존율이 감소하였다 (박 등, 1995). 그리고, 수온 19°C에서 넙치 치어를 포르말린 100과 200 ppm 침적 처리한 처리구의 생존율은 24시간 동안 각각 75와 100%로 비교적 높았고, 포르말린 400과 500 ppm 처리구의 생존율은 6시간 내에 50% 이하로 감소하였으며, 10시간 내에 전 개체가 사망하였다 (정과 김, 1998). 이 실험에서도 수정란의 경우, 수온 16과 18°C에서는 포르말린 1,000 ppm 처리구의 생존율이 가장 낮았고, 수온 22°C에서는 포르말린 400 ppm 이상 처리구는 40시간 내에 전 개체가 사망하였다. 부화자어의 경우, 수온 16°C에서 포르말린 1,000 ppm 처리구의 생존율이 가장 낮았고, 수온 18과 22°C에서는 포르말린 400 ppm 이상

처리구가 16시간 내에 전 개체가 사망하였다. 포르말린 고농도 처리시 넘치의 수정란과 부화자어의 생존율이 빠르게 감소하였고, 동일한 수온 조건에서는 수정란보다 부화자어 시기의 생존율이 빠르게 감소하였다. 이것은 부화 직후몸체 상피가 미분화된 상태로 외부 환경 물질에 보다 민감한 것으로 사려된다.

Flagfish (*Jordanella floridae*)의 수정란을 2시간 동안 살충제의 일종인 methoxycolor에 침적 처리하였을 때 부화율이 현저하게 감소하였고(Holdway and Dixon, 1986), brook trout, *Salvelinus fontinalis*의 초기발생 동안에 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)을 노출시키면 난황낭의 부종 및 난 발생단계의 진행을 지연시킨다(Walker and Peterson, 1994). 그리고, medaka, *Oryzias latipes*의 수정란을 플라스틱의 원료인 bisphenol A에 50과 100 ppm 침적 처리하였을 때, 부화율은 대략 23과 22%로 부화율이 감소하였다(Na et al., 2000). 이 실험의 수온 16과 18°C에서는 포르말린 고농도 처리시 부화율이 감소하였다. 수온 22°C에서는 포르말린 800 ppm 이상 처리구는 부화하기 전에 전 개체가 사망하였는데, 이것은 수정란이 배체 형성 과정시 고농도의 포르말린 영향을 받아 사망한 것으로 사려된다.

Medaka, *Oryzias latipes* 수정란에 염화제2수은 15 µg/L을 침적 처리하였을 때, 기형 개체가 관찰되었고(Heisinger and Green, 1975), minnow, *Phoxinus phoxinus* 초기발생 단계동안에 Tributyltin (TBT)를 10 µg/L 노출 시켰을 때, 꼬리지느러미가 구부러지는 심한 골격이상을 보였다. 그리고, diazinon, femtrothion, carbaryl and malathionr 같은 pesticides에 노출된 *Cyprinus carpio communis* 수정란에서도 골격이상과 같은 기형개체들이 관찰되었다(Kaur and Toor, 1977). 이 실험에서도 포르말린에 침적 처리하였을 때 비정상적인 배체 형성, 부화자어의 척추만곡이나 꼬리 부분의 탈락 등이 관찰되었다. 이것은 수정란의 세포분화 교란과 부화자어의 초기 발달저해로 사려된다.

포르말린은 세균성 및 기생충 구제제로 사용될 때 짧은 시간동안 고농도 처리를 하거나 오랜 시간동안 저농도 처리를 하고 있다. 하지만 일반적으로 짧은 시간 내에 구제효과를 기대하기 때문에 고농도 처리를 많이 하는 경우가 있다. 세균성

및 기생충 구제하기 위해 고농도의 포르말린 처리 후 그대로 방류하게 되면 연안에 서식하는 해양생물과 접촉하게 되어 유생의 발생 분화에 영향을 미칠 가능성이 있을 것이다. 그러므로 포르말린 처리 후 방류 시에는 사육수를 혼합하여 포르말린 농도를 희석한 후 방류하거나 이를 제거하는 여과 시스템 개발이 필요한 실정이며, 앞으로 이에 대한 많은 연구가 이루어져야 한다고 사려된다.

## 결 론

포르말린이 넘치, *P. olivaceus*의 수정란과 부화자어의 초기발달에 미치는 영향을 조사하였다. 수정란과 부화자어는 수온 16, 18 그리고 22°C에서 포르말린 100, 200, 400, 800 그리고 1,000 ppm 농도로 침적처리 하였다. 수온별 대조구에서, 수정란의 생존율은 각각 87.5, 89.5 그리고 86.5%였고, 부화율은 89.0, 97.0 그리고 91.0%였다. 그리고 부화자어의 생존율은 각각 71.5, 68.0 그리고 70.0%였다. 반면에, 수정란의 생존율과 부화율은 대조구에 비해 수온별 포르말린 농도별 처리구는 보다 낮았다( $P < 0.05$ ). 특히, 수온 22°C에서 포르말린 400 ppm 이상 노출시 수정란은 40시간 이내에 전 개체가 사망하였고, 부화자어는 수온 18과 22°C에서 포르말린 400 ppm 이상 노출시 각각 16과 8시간 이내에 전 개체가 사망하였다. 이들 결과에서, 수온과 포르말린 농도가 높을수록 넘치의 초기 발생과정에서 수정란의 분화와 발달에 저해를 끼치는 것으로 사려된다.

## 감사의 글

이 연구는 2001년도 두뇌한국21사업 핵심분야에 의하여 지원되었습니다.

## 참 고 문 헌

- 나오수, 오성립, 이영돈, 백혜자, 김형배. Bisphenol A가 송사리, *Oryzias latipes*의 수정란 부화와 어미의 산란에 미치는 영향. J. Korea Fish. 2000; 33(5) : 378-382.

- 박인석, 김형배, 김민석, 박철원. 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에 대한 포르말린의 급성독성 효과. 한국어병학회지. 1995; 8 : 57-67.
- 방종득, 류호영, 이 주, 김봉석. 화학적 처리가 성장기 넙치 및 수질에 미치는 영향. 제2회 연구발표 및 귀국 보고 요약집. 국립수산진흥원. 1996; 109pp.
- 정승희, 김진우. 넙치치어에 대한 포르말린의 반수치사능도 (LC<sub>50</sub>) 및 반수치사시간 (LT<sub>50</sub>). 수진연구보고서. 1998; 54 : 125-129.
- 정승희, 김진우. 기생충 구제제의 안전성 연구. 수진사업 보고서. 1997; 342-349.
- 조재권, 양한춘. Determinaton of formaldehyde residue and histopathological observation in formalin and neutral-formalin treated Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). J. Fish Pathol. 1996; 9(2) : 157-168.
- Beevi MR and Radhanrishnan S. Heamatological effects of sublethal concentration of formalin on *Sarotherodon mossambicus* (Peters). Proc. Indian. Acad. Sci. 1987; 96 : 721-725.
- Bodensteiner LR, Sheehan RJ, Lewis WM and Wills PS. Effects of repetitive formalin treatment on channel catfish juveniles. J. Aquat. Anim. 1993; 5 : 59-63.
- Fent K. Embryonic effects of tributyltin on the minnow, *Phoxinus phoxinus*. Environ. Poll. 1992; 76 : 187-194.
- Heisinger JF and Green W. Mercuric chloride uptake by eggs of the ricefish and resulting teratogenic effects. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1975; 14 : 665-673.
- Holdway DA and Dixon DG. Effect of methoxychlor exposure of flagfish eggs, *Jordanella floridae* on hatchability, juvenile methoxychlor tolerance and whole-body levels of tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid. Wat. Res. 1986; 20(7) : 893-897.
- Kaur K and Toor HS. Toxicity of pesticides to embryonic stages of *Cyprinus carpio communis* Linn. Ind. J. Exp. Biol. 1977; 15 : 193-196.
- Piper RG and Smith CE. Factors influencing formalin toxicity in trout. Prog. Fish-Cult. 1973; 35 : 78-81.
- Walker MK and Peterson RE. Toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to brook trout, *Salvelinus fontinalis* during early development. Environ. Toxic. Chem. 1994; 13(5) : 817-820.
- Wedemeyer G and Yasutake WT. Stress of formalin treatment in juvenile spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Board Can. 1974; 31 : 179-184.
- Williams HA and Wootten R. Some effect of the rapeutic levels of formalin and copper sulphate on blood parame-tens in rainbow trout. Aquaculture 1981; 24 : 341-353.
- Yamatomo KL. Effects of formalin on gas exchange in the gills of carp *Cyprinus carpio*. Comp. Biochem. physiol. 1991; 98C(2-3) : 463-465.