

대복, *Gomphina veneriformis*의 성장과 외투막 구조에 미치는 TBTCI의 독성

박정준, 이정식

전남대학교 수산해양대학 수산생명의학과

Tributyltin Chloride (TBTCI) Toxicity on the Growth and Mantle Structure of the Equilateral Venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae)

Jung Jun Park and Jung Sick Lee

Department of Aqualife Medicine, College of Fisheries and Ocean Science,
Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

ABSTRACT

Changes of growth and histopathological feature in the mantle structure of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* exposed to tributyltin chloride (TBTCI) for 36 weeks were observed. Concentrations of TBTCI were 0, 0.4, 0.6, and 0.8 $\mu\text{g/L}$. A regression analysis by power function of SPSS was shown that the growth of experimental groups was significantly decreased after 12 weeks of exposure. For histological analysis, mantle tissues were characterized using H-E stain, AB-PAS (pH 2.5) reaction and Masson's trichrome stain, and epidermal layer thickness and mucous cell distribution were analysed using the image analyser. The mantle had 4-folds (inner-inner, inner-outer, middle, and outer) and its epidermal layer consisted of simple epithelia. A periostracum was observed in the periostracal groove between middle and outer fold. Inner epidermal layer consisted of simple ciliated columnar epithelia, but the outer epidermal layer consisted of simple non-ciliated columnar epithelia. Alcian blue positive mucous cells showed blue color (7462c, 653c) in the inner fold, violet color (2583c) in the middle fold, and blue color (647c, 7455c) in inner epidermal layer (numbers in the parenthesis are codes of Pantone process coated color). Hemolymph sinus in the mantle was extended, and mucous cells in inner plica of the middle fold were stained as blue (7455c) and violet (2587c), after 12 weeks of TBTCI exposure. Cilia and striated border were disappeared, and number of mucous cells in the inner epidermal layer was reduced. Serious histopathological changes in middle and outer fold near the periostracum were observed after 36 weeks. Moreover, epidermal layer thickness and mucous cell distribution were showed decreasing tendency as exposure time to TBTCI was increased. Results of this study suggested that TBTCI induced growth disorder with histopathological changes.

Key words: *Gomphina veneriformis*, growth, mantle, TBTCI.

서 론

유기주석화합물(organotin compound)인 TBT(tributyl-

tin)는 1850년대 처음 발견된 이후 1960년대부터 상업적으로 많이 이용되어 왔는데(Dubey and Roy, 2003), 특히 선박 방오용 페인트에 널리 사용되면서 이들의 효과를 증대시키기 위하여 triphenyltin(TPT)도 함께 사용되어 왔다(U.S. EPA, 2003).

유기주석화합물의 생물에 대한 영향은 1970년대 프랑스 아카송만에서 굴의 폐각 기형 현상이 처음 보고된 이후, 오염지역의 조사 및 독성실험 통해서 굴의 성장 억제 및 폐각 기형을 유발하는 것으로 보고되었다(Waldock and Thain, 1983;

Received September 9, 2008; Accepted December 6, 2008
Corresponding author: Jung Jun Park
Tel: +82 (61) 659-3172 e-mail: jungjun515@hanmail.net
1225-3480/24308

Alzieu *et al.*, 1986; Stephenson, 1991). 특히 동물의 생식 관련 내분비계를 교란시켜 성의 표현이나 기능을 변화시키게 되는데, 암컷의 난소에 기형을 유발하며 수컷을 암컷으로 전환시키기도 하며, 수서생물의 면역독성, 호르몬 분비 억제, 먹이 섭취율 저하 및 성장 장애 등의 문제를 야기 하는 것으로 알려져 있다(Kannan *et al.*, 1997; Regoli *et al.*, 2001; Halldórsson *et al.*, 2004). 또한 TBT는 기관계의 구조적 변화를 유도하여 기능적인 장애를 초래한다는 사실이 여러 연구자들에 의해서 보고 되어왔다(Rasmussen *et al.*, 1983; Hinch and Stephenson, 1987; Regoli and Orlando, 1994; Quinn *et al.*, 2004). 이매패류를 환경오염물질에 대한 환경관찰자로서의 연구가 활발하게 진행되고 있지만 만성적인 TBT 노출에 의한 이매패류 기관계의 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이며, 구조적인 변화와 생리학적인 변화의 상관관계를 조사한 연구는 찾아보기 힘들다.

대북, *Gomphina veneriformis*은 이매패 강(*Bivalvia*), 백합 목(*Veneroidea*), 백합 과(*Veneridae*)에 속하는 식용 이매패류로서 우리나라 전 연안에 걸쳐 수심 1-5 m의 모래저질에 분포하며, 강원도 연안에 가장 많이 서식하고 있다(Yoo, 1988). 대북의 생물학적 최소형은 25 mm이며, 주 산란시기는 7월에서 9월까지이다(Lee *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2003).

대북은 실내사육이 다른 이매패류에 비해 비교적 용이하여 카드뮴이나 아연과 같은 중금속(Ju *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006)과 노닐페놀(Lee and Park, 2007) 같은 내분비계 장애물질 노출 실험에 이용되어 왔다.

이매패류의 외투막은 상피층의 자유면에 존재하는 섬모 운동에 의해 외투강을 정화시키고, 외투막 가장자리에 존재하는 다수의 주름에 존재하는 각피층홈(periostracum groove)에서 분비되는 분비물질이 수중에 존재하는 칼슘이온과 결합하여 패각을 형성한다(Lee *et al.*, 2007). 따라서 본 연구는 TBTCl (tributyltin chloride)에 노출된 대북의 성장과 외투막의 조직병리학적인 변화의 연관관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 대북(*Gomphina veneriformis*)은 2005년 10월에 강원도 주문진읍 연안(37°54' 27.23"N, 128°49' 38.95"E)에서 채집된 것으로 각장 30.00-35.00 mm의 성체 125 개체를 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 사육조건

채집한 개체들은 실험실로 운반하여 실험 수조에 약 2주 동

안 순치시켰다. 순치 기간 동안 환경상태 등을 측정하였고, 사망개체는 사육수조 안에서 제거하였다. 본 실험에서 사용한 수조는 30 L의 지수형 순환여과식 사각 유리수조로써 사육수의 양은 실험 기간동안 25 L로 일정하게 유지하였으며, 수조의 내부는 실험종의 서식환경과 비슷한 저질환경을 제공하였고 실험 개체들의 저질잡입이 가능하도록 채집지역의 모래를 10 cm 정도의 두께로 깔아 주었다.

실험기간은 2005년 10월 25일부터 2006년 7월 3일까지 36주 동안 시행하였다.

실험기간 동안 광주기와 온도는 인위적인 조절없이 자연조건으로 설정하였으며, 먹이는 *Isochrysis galbana* 3-4 × 10⁵ cell/ml를 2일에 1 회씩 공급하였다. 실험기간 동안 실험 개체들의 배설물에 의한 pH의 변화 및 배설물 처리 그리고 수중의 TBTCl(tributyltin chloride) 농도를 일정하게 조절해 주기 위하여 먹이 공급시 사육수의 2/3를 교환하였고, 각 노출구의 설정 농도에 따라 교환 해수의 양에 맞춰서 TBTCl을 재투여하였다.

2) 오염원

사용된 오염원은 tributyltin chloride ([CH₃(CH₂)₃]₃SnCl, Sigma)를 acetone(CH₃COCH₃, Junsei)으로 10,000 mg/L 농도의 stock solution을 만든 다음 dimethyl sulfoxide ((CH₃)₂SO, Junsei)를 이용하여 100 mg/L 농도의 substock solution을 만들었다. TBTCl substock solution은 각각의 TBTCl 노출 실험수조에 희석하여 사용하였다.

3) 실험구

TBTCl 노출실험에 노출구의 농도를 정하기 위해 TBTCl을 인위적으로 노출시키지 않은 수조를 대조구로 하였으며, 두 차례에 걸친 예비실험을 통하여 LC₉(20.0 μg/L TBTCl)의 1/25 농도인 0.8 μg/L를 가장 높은 농도구로 정하고, 그 보다 낮은 0.6과 0.4 TBTCl μg/L 농도구를 추가로 설정하였다.

4) 각장 성장

대북의 각장 성장은 실험 개시기에 각 실험개체들의 각장을 측정하여, 패각에 개체의 고유번호를 표시하였다. 36주 동안 각각의 실험구에서 사육하면서 매회 채집시기에 측정된 45 개체의 각장과 개시기의 각장 차이를 구하였다. 각각의 각장 차이(mm)는 SPSS (Ver. 14) 통계프로그램을 이용하여 power function으로 회귀분석 하였으며, 프로그램 상에서 도출되어진 계수 값과 상수 값은 다음과 같은 성장식으로 사용하였다.

$$Y = b_0 * \exp^{b_1}$$

Y: shell length growth
 exp: exposure time (week)
 b₀, b₁: coefficients

5) 조직학적 방법

대조구를 포함한 각 노출구의 수조에서 매주 5 개체씩을 무작위로 조직학적 분석에 이용하였다. 대복의 각장, 각고, 전중량, 육중량을 측정하고, 해부하여 왼쪽 외투막의 가장자리 부분을 절취하였다.

광학현미경 표본제작을 위해 절취한 시료들은 Drury and Wallington(1980)의 방법에 따라 aqueous Bouin's fluid에 12시간 동안 고정한 다음, 24시간 동안 수세하였다. 그 후 ethanol을 이용한 단계별 탈수 후 Paraplast(McCormick, USA)에 포매하였다. 포매된 시료는 microtome(RM2235, Leica, Germany)을 이용하여 4-6 μm 두께로 연속절편하여 조직표본을 만들었다.

제작된 조직표본은 Mayer's hematoxylin-eosin(H-E) 염색, alcian blue-periodic acid and Schiff's solution (AB-PAS, pH 2.5) 반응, Masson's trichrome 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

조직화학적 반응 후 점액세포의 염색 친화도 판정은 Pantone® formula guide coated first edition 2002 (Pantone Inc., USA)를 기준으로 고유번호를 () 안에 표시하였다.

6) 조직학적 변화양상의 정량화

외투막의 조직학적인 변화 양상들(상피층 두께, 점액세포 분

Table 1. Shell length growth model of *Gomphina veneriformis*.

TBTCl concentration (μg/L)	Equation	r ²
Control	Y = 0.0043 * exp ^{2.0405}	0.899
0.4	Y = 0.0694 * exp ^{0.5397}	0.225
0.6	Y = 0.0087 * exp ^{1.0887}	0.497
0.8	Y = 0.0059 * exp ^{1.1328}	0.471

*Y = shell length growth
 exp = exposure time (week)

포 비율)을 정량화하기 위해 매주 농도별로 5 개체씩 화상분석장치(image analyser; IMT, Visus, U.S.A)를 사용하여 분석하였다.

실험구들의 외투막 내부 및 외부 상피층 두께(μm)를 조사하기 위해 개체 당 40-50 회 측정하여 평균 두께를 계산하였다.

AB-PAS(pH 2.5) 반응에서 상피층의 점액세포의 분포비율은 아래의 식으로 계산하여 백분율(%)로 나타냈다.

$$\text{Distribution of mucous cell} = \frac{\text{mucous cell area } (\mu\text{m}^2)}{\text{epidermal layer area } (\mu\text{m}^2)} \times 100$$

대조구에 대한 농도구들의 유의적인 차이(p < 0.05)를 알아보기 위한 통계처리는 SPSS 통계 프로그램을 이용하여

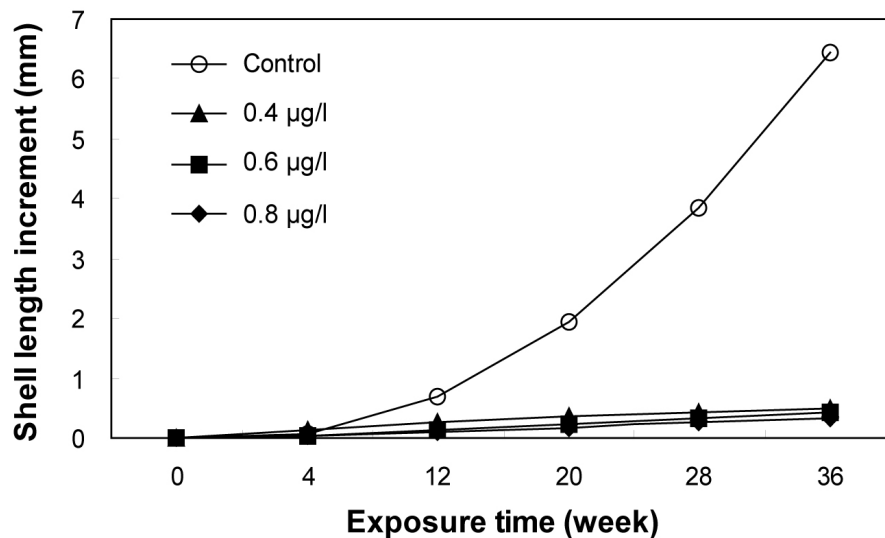


Fig. 1. Shell length increment of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* exposed to a different concentration of tributyltin chloride.

paired sample t-test를 하였다.

결 과

1. 성장

Power function으로 회귀분석한 결과 대조구와 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서의 각장 성장식은 Table 1과 같다.

노출기간 동안 실험 개체들의 각장 성장은 Fig. 1에서와 같이 대조구의 개체들은 36주까지 6.44 mm의 각장 성장을 보인 반면 0.4, 0.6, 0.8 μg 농도구에서는 각각 0.48 mm, 0.43 mm, 0.34 mm의 각장 성장을 나타내었다. 농도구 각각은 모두 대조구에 대하여 유의적인 성장 차이를 보였다 ($p < 0.001$).

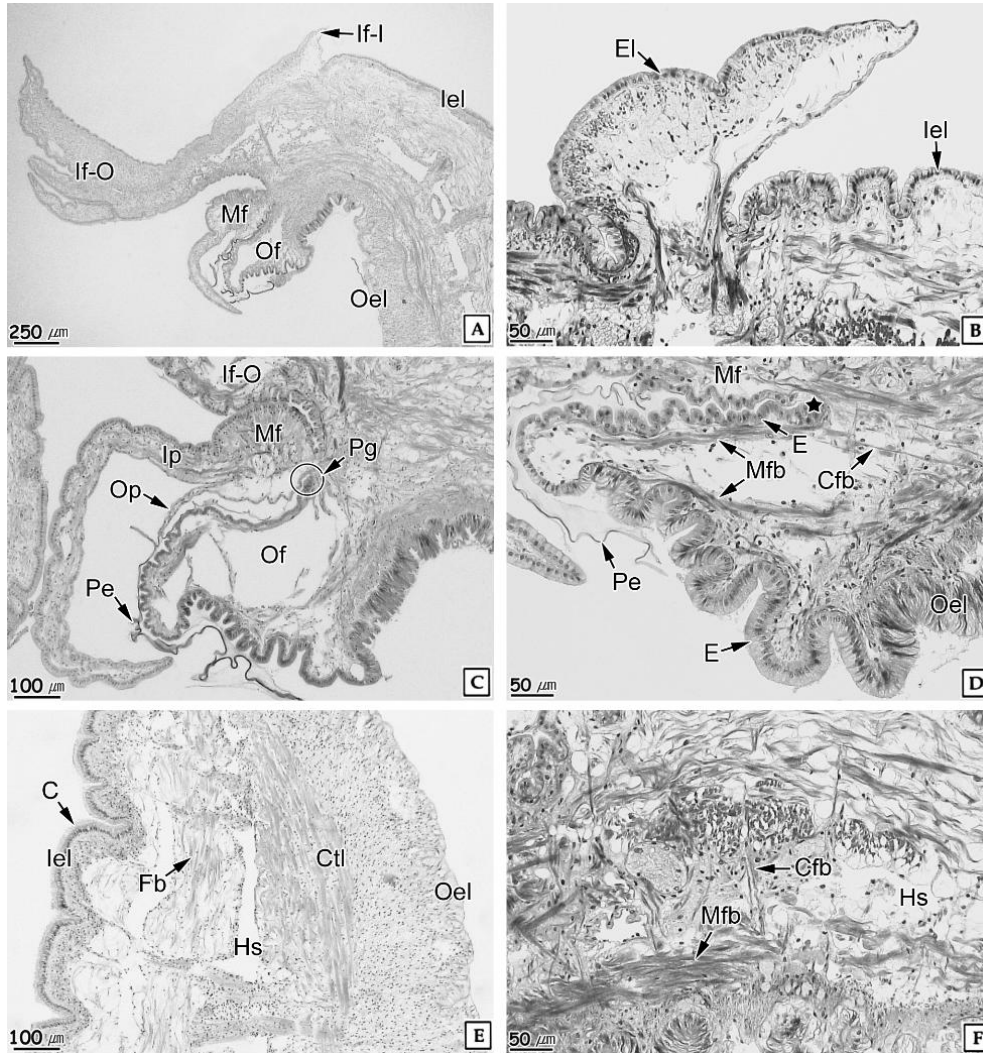


Fig. 2. Light microscopical feature of the mantle of *Gomphina veneriformis*. **A:** Mantle fold was divided into four folds; inner-inner fold (If-I), inner-outer fold (If-O), middle fold (Mf), and outer fold (Of). H-E stain. **B:** Inner-inner fold, note squamous, cuboidal and low columnar epithelia in epidermal layer (El). Masson's trichrome stain. **C:** Periostracal groove (Pg), showing the periostracum (Pe) between the inner plica (Ip) of the middle fold and outer fold. Masson's trichrome stain. **D:** Outer fold, showing the periostracal groove (asterisk) and columnar epithelia in the outer epidermal layer (Oel). Masson's trichrome stain. **E:** Sagittal section of mantle, showing the connective tissue layer (Ctl) with numerous fiber bundle (Fb) between the inner epidermal layer (Iel) and outer epidermal layer (Oel). H-E stain. **F:** Connective tissue layer, showing numerous collagen fiber bundles (Cfb) and muscle fiber bundle (Mfb). Masson's trichrome stain. Hs, hemolymph sinus; Mc, mucous cell; Op, outer plica.

2. 외투막의 구조적 변화

대복의 외투막은 각정 부위로 갈수록 점점 얇아지는 막 형태로서 패각의 가장자리 부위에는 내부 안쪽 주름(inner-inner fold), 가장 큰 외부 안쪽 주름(inner-outer fold), 가운데 주름(middle fold), 바깥쪽 주름(outer fold)이 존재하였다(Fig. 2A, B, C). 가운데 주름의 끝은 안쪽 분지(inner plica)와 바깥쪽 분지(outer plica)로 나누어져 있었으며, 각피층은 가운

데 주름의 바깥쪽 분지와 바깥쪽 주름 사이에 존재하는 각피층 홈에 존재하였다(Fig. 2C).

대복 외투막의 주름들에는 상피세포로 구성된 단층 상피층이 존재하였다. 내부 안쪽 주름 부위의 상피층은 편평형, 입방형 그리고 키가 작은 원주형 상피세포로 구성되어 있었으며 (Fig. 2B), 외부 안쪽 주름부위의 상피층은 원주형 상피세포로 구성되어 있었다. 또한 가운데 주름부위의 안쪽 분지에 존재하는 상피세포들은 입방형이었지만, 바깥쪽 분지와 바깥쪽

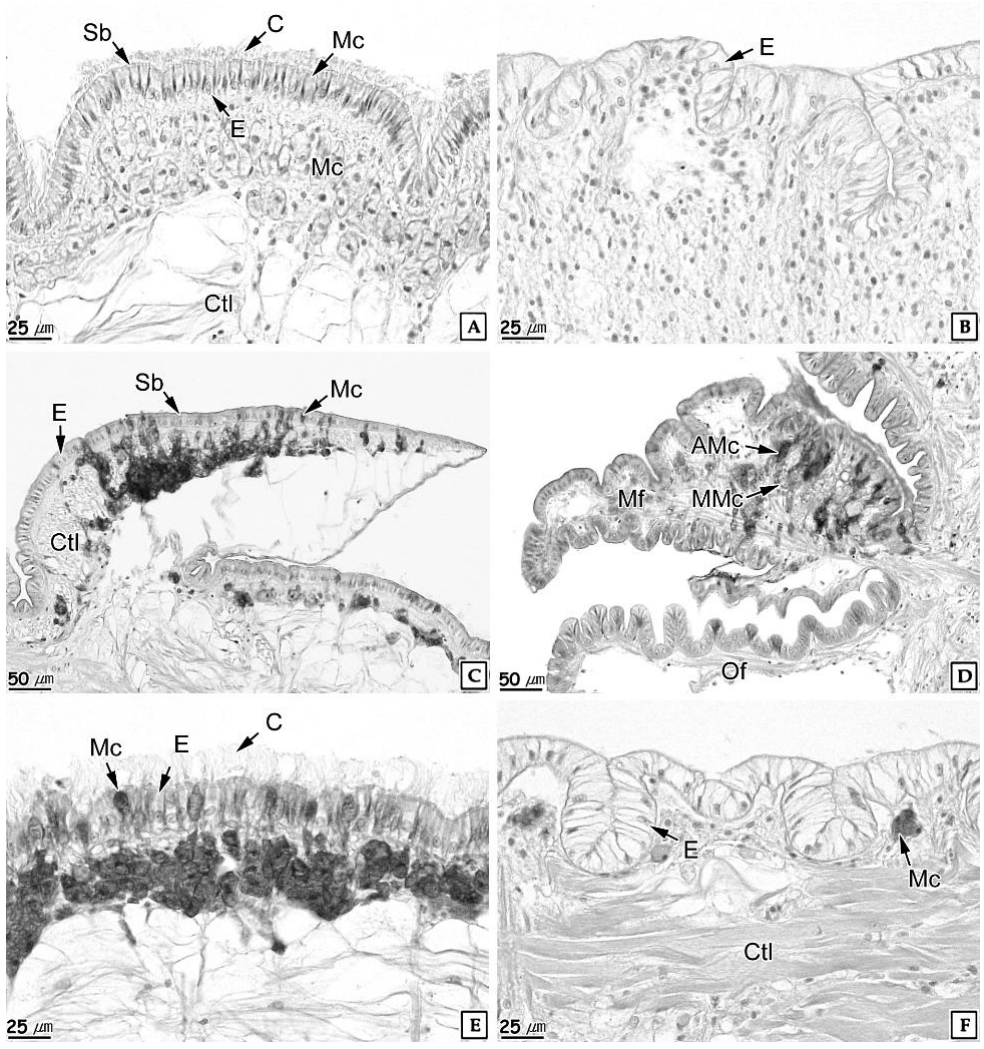


Fig. 3. Histochemical characteristics of the mantle of *Gomphina veneriformis*. **A:** Inner epidermal layer, showing the cilia (C) and striated border (Sb) on free surface of the epithelium. H-E stain. **B:** Outer epidermal layer, showing the simple long columnar epithelia (E). H-E stain. **C:** Inner-inner fold, showing the numerous alcian blue positive mucous cell (Mc) in epidermal layer and connective tissue layer (Ctl). AB-PAS (pH 2.5) reaction. **D:** Middle fold (Mf), showing the alcian blue positive (AMc) and alcian blue negative mucous cell (MMc). AB-PAS (pH 2.5) reaction. **E:** Inner epidermal layer, showing the cilia (C) on the free surface and alcian blue positive mucous cell. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **F:** Outer epidermal layer, note a few mucous cell and cilia. AB-PAS (pH 2.5) reaction. Of, outer fold.

주름 부위에서 각피층과 인접한 부위의 상피층은 입방형 상피 세포로 구성되어 있었다(Fig. 2D).

외투막의 횡단면은 폐각과 인접한 외부상피층과 외투강과 인접한 내부 상피층 사이에 결합조직층이 존재하였다(Fig. 2E). 이들 결합조직층은 교원섬유다발과 근섬유다발로 이루어진 소

성결합조직으로 구성되어있으며, 다수의 혈림프동을 가지고 있었다(Fig. 2F). 내부와 외부 상피층은 단층의 원주형 상피세포로 구성되어 있었으며, 이들의 자유면에는 선조연이 발달하였고, 핵은 세포의 기저부에 존재하고 있었다. 하지만 내부 상피층의 상피세포는 다수의 섬모를 가지는 원주형 세포였으며

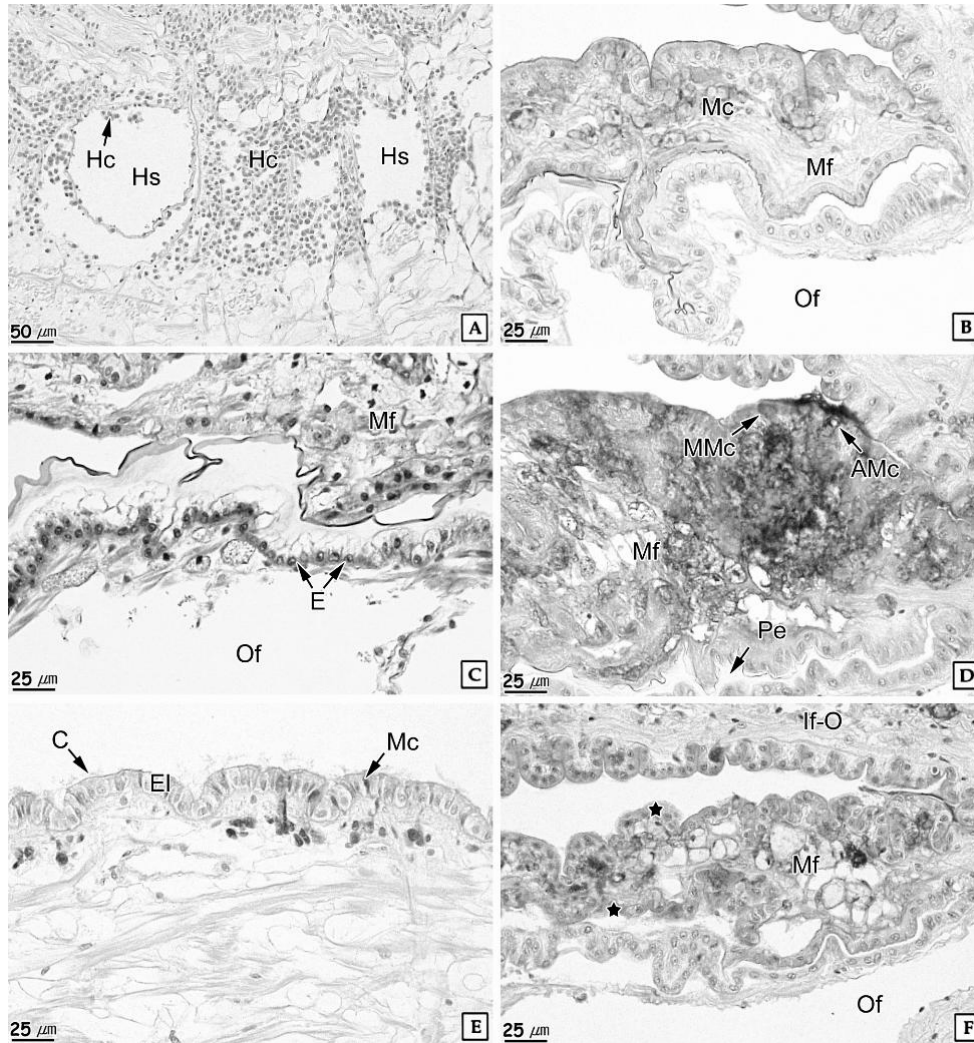


Fig. 4. Histopathological changes of the mantle of *Gomphina veneriformis* exposed to tributyltin chloride (TBTC1). **A:** Extended hemolymph sinus (Hs) and increased hemocyte (Hc) in the connective tissue layer were observed after 12 weeks exposure to 0.6 $\mu\text{g/L}$ of TBTC1. H-E stain. **B:** Decreased mucous cell (Mc) in the middle fold was seen after 20 weeks exposed to 0.4 $\mu\text{g/L}$ of TBTC1. AB-PAS (pH 2.5). **C:** Destruction of epithelium (E) in the outer fold (Of) was seen after 20 weeks exposed to 0.6 $\mu\text{g/L}$ of TBTC1. Masson's trichrome stain. **D:** Increased alcian blue negative (MMc) and positive (AMc) mucous cells in inner plica of the middle fold (Mf) were seen after 20 weeks exposed to 0.8 $\mu\text{g/L}$ of TBTC1. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **E:** Partial disappearance of cilia (C) and decreased mucous cell in the inner epidermal layer (EI) were seen after 28 weeks exposed to 0.4 $\mu\text{g/L}$ of TBTC1. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **F:** Deformation of epithelium (asterisk) and decreased mucous cell in the middle fold were seen after 28 weeks exposed to 0.8 $\mu\text{g/L}$ of TBTC1. AB-PAS (pH 2.5) reaction. If-O, inner fold-outer; Pe, periostracum.

(Fig. 3A), 외부 상피층의 상피세포는 섬모와 선조연의 발달이 미약하였다(Fig. 3B).

AB-PAS (pH 2.5) 반응 결과, 내부 안쪽 주름 부위에서는 alcian blue에 파란색(7462c)으로 반응하는 점액세포들이 관찰되었다(Fig. 3C). 가운데 주름 부위에서는 alcian blue에 파란색(653c)으로 반응하는 점액세포와 alcian blue에 양성으로 반응하는 점액물질을 모두 가지고 있어서 보라색(2583c)으로 나타나는 혼합 점액세포가 나타났지만 alcian blue에 양성으로 반응하는 점액물질들의 활성이 두드러지게 나타났다(Fig. 3D). 하지만 외부 안쪽 주름 부위와 바깥쪽 주름 부위에서는 이들 점액세포의 분포 정도는 약하게 나타났다. 내부 상피층에 존재하는 점액세포들은 alcian blue에 파란색(647c, 7455c)으로 반응하였으며(Fig. 3E), 외부 상피층에 존재하는 점액세포들은 분포 정도가 미약하였지만 결합조직층에 존재하는 점액세포들은 보라색(2727c)으로 반응하였다(Fig. 3F).

TBTCl 노출 12주 후의 0.6 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서는 결합조직

내의 혈림프동이 확장되었으며(Fig. 4A), 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서는 바깥쪽 주름 부위의 결합조직 내 혈림프동의 확장과 근섬유다발의 분절이 나타났다.

TBTCl 노출 20주에는 0.4 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서 혈림프동이 확장되었고, 부분적인 근섬유다발의 분절이 관찰되었으며, 가운데 주름 부위의 안쪽 분지에서 점액세포가 감소하였다(Fig. 4B). 0.6 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서도 가운데 주름부위의 바깥 분지에서 파란색(7453c)으로 반응하는 점액세포가 관찰되었으며, 바깥쪽 주름 부위의 상피층이 부분적으로 변형되었다(Fig. 4C). 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서는 부분적으로 섬모가 탈락되었고, 선조연이 소실되었으며, 가운데 주름부위의 안쪽 분지에서 AB-PAS 반응 시 파란색(7455c)으로 반응하는 점액세포와 보라색(2587c)으로 반응하는 점액세포가 증가하였다(Fig. 4D).

이후 노출 28주에는 0.4 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서 혈림프동의 확장과 함께 혈구가 증가하였고, 내부 상피층에서 점액세포가 감소하였으며(Fig. 4E), 가운데 주름 부위의 바깥 분지에서 AB-PAS 반응 시 파란색(7453c)으로 반응하는 점액세포가 관

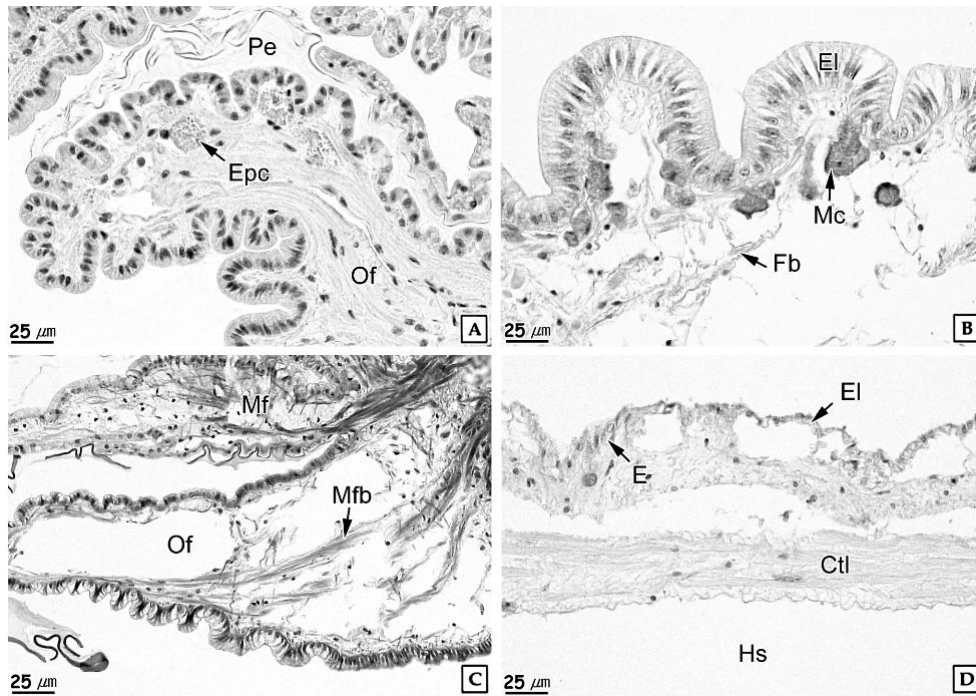


Fig. 5. Histopathological changes of the mantle of *Gomphina veneriformis* exposed to TBTCI. **A:** Appearance of the eosinophilic cell (Epc) in the outer fold (Of) were observed after 36 weeks exposed to 0.4 $\mu\text{g/L}$ of TBTCI. H-E stain. **B:** Appearance mixed mucous cell (Mc) and cut fiber bundle (Fb) in the outer fold were seen after 36 weeks exposed to 0.4 $\mu\text{g/L}$ of TBTCI. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **C:** Destruction of the muscle fiber bundle (Mfb) in outer fold was seen after 36 weeks exposed to 0.4 $\mu\text{g/L}$ of TBTCI. Masson's trichrome stain. **D:** Destroyed epithelium (E) and deserted outer epidermal layer (EI) were seen after 36 weeks exposed to 0.8 $\mu\text{g/L}$ of TBTCI. AB-PAS (pH 2.5) reaction. Ctl, connective tissue layer; Hs, hemolymph sinus; Pe, periostracum.

찰되었다. 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구의 내부 상피층에서는 점액세포가 감소하였고, 상피세포의 부분적인 변형이 관찰되었으며, 외부 상피층의 부분적인 파괴가 관찰되었다. 또한 가운데 주름 부위의 안쪽 분지에서 상피세포의 변형이 나타나고, 점액세포들은

다시 감소하였다(Fig. 4F).

노출 종료 시기인 36주에는 0.4 $\mu\text{g/L}$ 농도구의 경우 바깥 쪽 주름 부위에서 분홍색(514c)의 호산성 과립세포들이 관찰 되었으며(Fig. 5A), AB-PAS 반응 시 보라색(2655c)으로 나

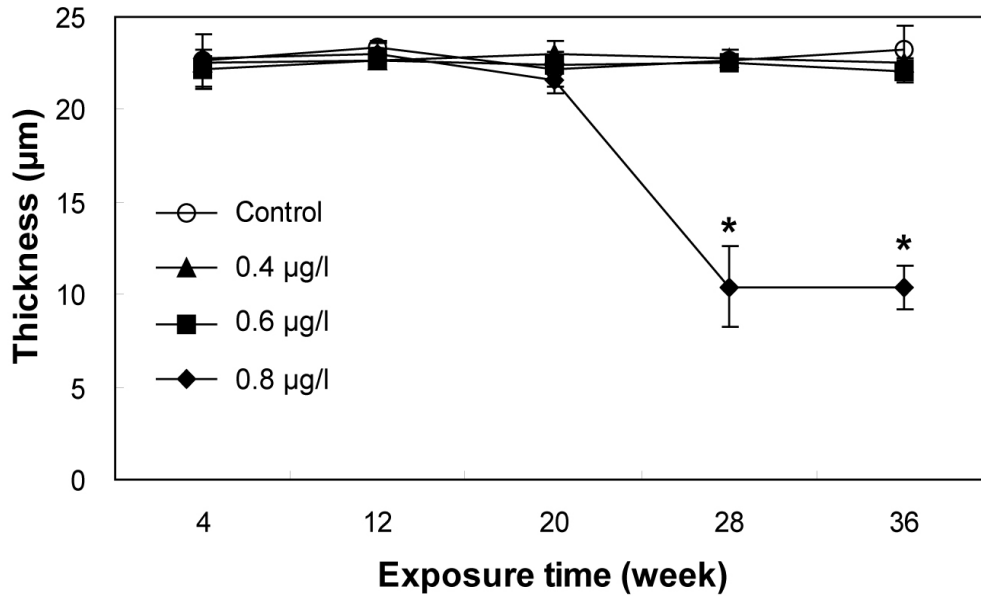


Fig. 6. Thickness of inner epidermal layer in the mantle of *Gomphina veneriformis* exposed to a different concentrations of tributyltin chloride. Vertical bar: SD. *: significantly different from control ($p < 0.05$).

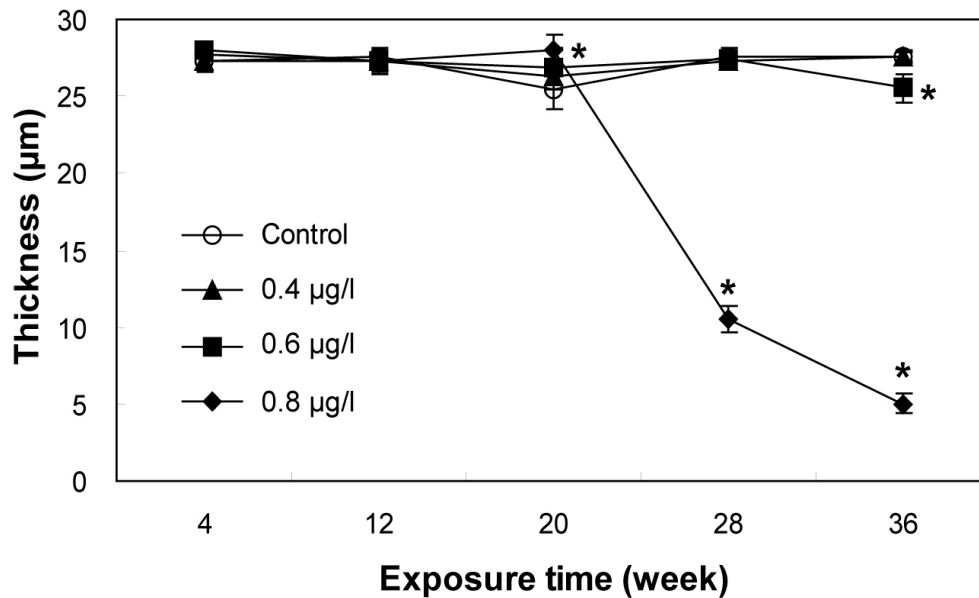


Fig. 7. Thickness of outer epidermal layer in the mantle of *Gomphina veneriformis* exposed to a different concentrations of tributyltin chloride. Vertical bar: SD. *: significantly different from control ($p < 0.05$).

타나는 점액세포가 관찰되었다 (Fig. 5B). 또한 0.6 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서는 바깥쪽 주름부위의 결합조직층의 근섬유다발이 대부분 분절되었으며(Fig. 5C), 가운데 주름 부위의 바깥 분지에서 상피세포의 변형과 파괴로 인한 상피층의 붕괴가 관찰되었다. 가장 높은 농도구인 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서는 내부 상피층에서 섬모와 선조연의 소실, 점액세포의 감소, 상피세포의 변형이 관찰되었으며, 외부 상피층의 상피세포들은 입방형 또는 편평형으로 위축되었고, 상피층 또한 붕괴되었다(Fig. 5D). 가운데 주름 부위의 안쪽 분지에서는 상피층의 부분적인 파괴와 점액세포의 감소가 나타났으며, 바깥쪽 분지에서도 상피층의 파괴가 관찰되었다.

TBTCl에 노출된 대복 외투막의 내부와 외부 상피층 두께 변화는 대조구의 경우 내부 상피층과 외부 상피층 모두 실험기간 동안 각각 평균 22.81 μm , 27.09 μm 였지만, 0.4 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서는 각각 22.69 μm , 27.16 μm 였고, 0.6 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서는 22.39 μm , 27.01 μm , 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구의 개체들은 각각 17.61 μm , 19.73 μm 로 나타났다. 하지만 실험기간 동안 실험구들의 내부 상피층의 변화는 대조구와 0.4, 0.6 $\mu\text{g/L}$ 농도구의 개체들의 경우에는 변화가 없었지만, 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구의 개체들은 노출 20주 이후부터 감소하여 28주와 36주에는 대조구와 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 5). 외부 상피층의 경우에도 대조구와 0.4, 0.6 $\mu\text{g/L}$ 농도구의 개체들은 실험기간 동안 상피층 두께의 변화가

없었지만, 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구의 개체들은 노출 12주 이후부터 대조구와 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 6).

TBTCl에 노출된 대복 외투막 상피층에 존재하는 점액세포의 분포 비율을 분석한 결과, 대조구와 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구들의 개체들은 실험기간 동안 각각 평균 22.64%, 15.39%, 15.74%, 11.64%로 나타나 대조구에 비해 TBTCl 노출구의 개체들에서 점액세포 분포 비율이 낮았다. 노출 12주까지는 대조구와 노출구들은 유의적인 차이를 보이지 않았지만 ($p > 0.05$), 노출 20주 이후부터는 유의적인 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 특히 20주에 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구의 개체들은 9.25%로 감소하였고, 36주에 0.4와 0.6 $\mu\text{g/L}$ 농도구들의 개체들은 각각 2.23%와 2.25%로 감소하여 대조구와 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 7).

고 찰

이매패류에서 화학물질 및 중금속 등의 오염원들은 외투막, 아가미, 신장, 발 그리고 소화선에 주로 축적되며 (Pekkarinen, 1996), 직간접적으로 이들은 수서생물의 기관계 구조의 변화를 일으켜 생리학적 불균형을 초래한다 (Watling and Watling, 1982; Otludil *et al.*, 2004).

von Bertalanffy (1938)는 생물의 성장이란 주위환경으로부터 얻어지는 물질의 동화작용에 의한 생물체조직의 증대로서 동화작용은 영양물의 흡수면에 비례하며, 이화작용은 질량

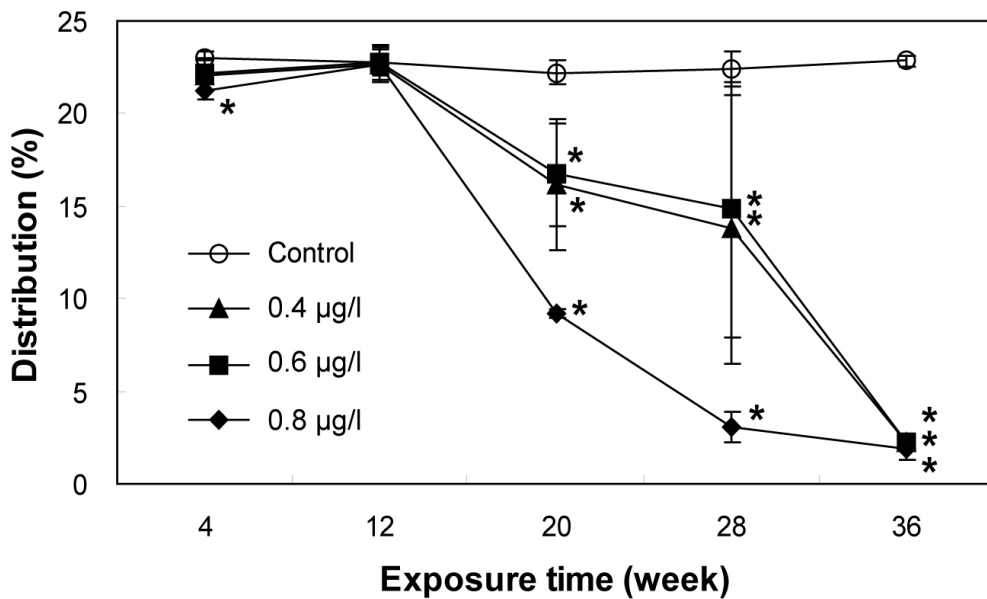


Fig. 8. Mucous cell distribution in the mantle of *Gomphina veneriformis* exposed to a different concentrations of tributyltin chloride. Vertical bar: SD. *: significantly different from control ($p < 0.05$).

에 비례한다는 원리는 적용하여 성장식을 창안하였으며, 해양 오염물질에 의한 영향을 측정하는데 이매패류의 성장은 사망률보다 유용한 자료로 이용되고 있다. 또한 담치류에 있어서 성장률은 환경스트레스의 지표로 매우 유용하며, 성장률의 감소는 자원의 감소와 연관이 있다(Salazar, 1989).

오염원에 노출된 이매패류들의 폐각기형과 비정상적인 성장은 많은 연구자에 의해 보고된바 있다. 카드뮴에 노출된 진주담치(*Mytilus edulis*)와 *Biomphalaria glabrata*는 성장이 감소함과 동시에 폐각의 기형이 증가하였고(Sunila and Lindström, 1985; Abd Allah *et al.*, 1997), 48시간 동안 0.77 μg 농도에 노출된 버지니아굴(*Crassostrea virginica*) 유생은 비정상적으로 폐각이 형성하였다(Roberts, 1987). TBT에 오염된 지역에서 서식하는 이매패류 또한 성장의 감소와 비정상적인 폐각성장이 관찰되었는데, TBT 농도 0.014 $\mu\text{g/L}$ 에 서식하는 굴(*Crassostrea gigas*)은 폐각이 두꺼워졌고(Wolniakowski *et al.*, 1987), 체내 TBT 농도가 110-350 ng/g인 Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*의 경우에는 폐각이 파괴되고, 굽어진 형태로 성장하였다(Batley *et al.*, 1989).

TBT와 polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)의 오염이 심각한 지역(Reykjavik harbour, Iceland)에 35일 동안 진주담치, *Mytilus edulis*를 이식 실험한 결과 이들 실험종의 성장률(scope for growth)은 대조구를 비롯한 다른 오염지역 보다 감소하였으며, 현장 채집한 개체들도 다른 지역보다 크기가 작거나 자원량이 적었다(Halldórsson *et al.*, 2005).

TBTO(tributyltin oxide)와 TBTF(tributyltin fluoride)로 오염된 해수에서 사육된 굴, *Crassostrea gigas*은 110일 이후 폐각의 기형이 관찰되었고(Alzieu and Heral, 1984), 실내 실험의 경우 TBTO에 노출된 굴(*Crassostrea gigas*) 진주담치(*Mytilus edulis*), *Ostrea edulis*, *Venerupis decussata*, *Venerupis semidecussata* 또한 대조구에 비해 성장이 감소하였으며, 농도구에 따라서도 성장의 차이를 보였다(Waldock and Thain, 1983; Thain, 1986). 또한 0.1-10.0 $\mu\text{g/L}$ TBTO에 7일 동안 노출된 진주담치(*Mytilus edulis*) 중에서 0.4 $\mu\text{g/L}$ 이상의 농도에 노출된 개체들은 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이며 성장이 감소하였고(Strömgren and Bongard 1987), 56일 동안 TBT 농도 0.157 $\mu\text{g/L}$ 에 노출된 경우와 196일 동안 0.07 $\mu\text{g/L}$ 농도에 노출된 경우에도 성장이 감소하였다(Salazar and Salazar, 1987; Salazar *et al.*, 1987). 본 실험의 경우에는 12주 이후부터 모든 농도구 (0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g/L}$)의 개체들은 대조구와 유의적인 성장의 차이를 보였다.

이매패류의 폐각이 외부 물질로부터 방어할 수 있는 1차적

인 방어기작이라고 한다면 외투막은 2차적인 방어기작으로 방어기능 뿐만 아니라 점액분비, 외투강 강화, 폐각 형성 기능을 수행한다(Kawaguti and Ikemoto, 1962; Saleuddin, 1974; Morrison, 1993).

대복의 외투막은 폐각 가장자리에서 각정 부위로 갈수록 점점 얇아지는 막의 형태이며, 내부 상피층의 상피세포는 섬모의 발달이 뚜렷한 원주형이며, 외부 상피층은 섬모의 발달이 뚜렷하지 않은 원주형 상피세포로 이루어져 있었다. 하지만 *Mercenaria mercenaria*의 외투막에서는 외부 상피층은 섬모의 발달이 미약한 원주형 세포로서 핵이 세포의 중앙에 위치하고 있으며, 내부 상피층의 세포는 키가 작은 입방형 세포로서 핵이 세포의 중앙에 위치한다(Eble, 2001). *Mercenaria mercenaria*의 외투막에서와 마찬가지로 대복의 외투막 또한 다수의 혈림프동을 가지는 결합조직층은 외부 상피층과 내부 상피층으로 둘러싸여 있었다.

수중오염원에 의한 이매패류 외투막의 조직병리학적 변화는 상피층의 정단부에 존재하는 선조연과 섬모들이 탈락, 점액 세포들의 활성 감소, 결합조직층에서 교원섬유와 근섬유 다발의 변성을 들 수 있다. 아가미에서는 새엽 상피층의 분리, 혈림프동의 확장, 새엽 섬모대의 소실 그리고 새엽 상피층의 분리와 파괴 등 아가미로써의 기능을 상실한 조직상이 관찰되었다(Kim and Lee, 1988).

Endosulfan 0.4 mg/l와 0.8 mg/l에 30일 동안 노출된 *Planorbarius corneus*의 외투막은 노출 초기에 저농도에서는 점액세포와 단백질세포가 증가한 후, 노출 20일 이후 고농도에는 다시 감소하였다. 이후 결합조직층을 둘러싸고 있는 상피세포가 탈락되었다. 노출 30일째의 개체들에서는 지방과립이 관찰되었으며, 상피세포의 탈락과 더불어 근섬유들이 위축되는 조직상이 관찰되었다(Otludil *et al.*, 2004). 카드뮴에 노출된 대복의 외투막은 노출 초기에 섬모가 탈락하였으며, 노출 시간이 경과하고, 고농도로 갈수록 외부 상피층과 섬유성 근육층의 분리, 혈림프동 확장, 선조연 소실 그리고 상피세포 탈락이 관찰되었다(Park *et al.*, 2006). 아연에 노출된 대복 외투막은 내부 상피층의 자유면에 발달한 선조연의 일부가 소실되었으며, 부분적으로 결합조직층에 존재하는 근섬유다발의 분절화와 혈림프동의 확장이 관찰되었다. 가장 높은 농도에서 실험 종료시에는 단층의 외부상피층이 다층으로 관찰되었다(Ju *et al.*, 2006).

본 실험에서 TBTCl 노출 20주에는 대복 외투막의 내부 상피층에 존재하는 점액세포들은 감소하였지만, 가운데 주름부위의 바깥 분지에서는 점액세포가 증가하였는데, 이는 오염물질의 유입으로 인해 감소하는 폐각 형성을 보완하기 위한 방어기작으로 생각되어진다. 노출 20주 이후부터 0.8 $\mu\text{g/L}$ 농도구에서 내부와 외부 상피층의 두께가 감소하였는데, 이는 원주

형상피세포들이 입방형 또는 편평형으로 변형되거나 상피세포가 파괴되었기 때문이다.

노출 12주 이후부터 외투막 상피층과 결합조직층의 구조적인 변화가 나타나고, 각피층 형성의 중요한 기능을 담당하는 가운데 주름과 바깥주름의 상피세포 변형 및 상피층과 결합조직층에 존재하는 점액물질의 변화가 나타났다. 이러한 증상들은 각피층의 형성의 장애로 인한 패각형성 장애를 초래하여 대조구에 비하여 농도구의 개체들의 성장이 감소하게 되는 것으로 생각된다.

전자현미경 상에서 각피층은 전자밀도가 다른 두 층으로 구성되어 있으며, 이들 각피층은 가운데 주름의 바깥 분지에 의해서 지탱되고 있다(Lee *et al.*, 2007). 본 연구에서는 전자현미경적 연구를 시행하지 않았기 때문에 TBTCI에 의한 미세구조적 영향을 설명할 수는 없지만 추후 전자현미경적 연구가 수행된다면 성장의 감소 원인을 세포학적으로 더욱 자세하게 규명할 수 있을 것이다.

요 약

TBTCI에 36주 동안 노출된 대복(*Gomphina veneriformis*)의 성장과 외투막의 조직학적 변화를 관찰하였다. 대복의 성장은 모든 실험구의 개체들이 12주 이후부터 대조구에 비해 유의적인 차이를 보이며 감소하였다($p < 0.05$). 대복의 외투막은 가장자리에 4 개의 주름 (내부 안쪽, 외부 안쪽, 가운데, 바깥쪽)을 가지며, 단층의 원주형 상피층이 결합조직층을 둘러싸고 있는 구조였다. 대복의 외투막은 TBTCI 노출 12주 이후부터 헬름프동이 확장과 근섬유 다발의 분절이 관찰되었다. 노출 20주에는 내부상피층에 존재하는 점액세포들이 대조구보다 유의적인 차이를 보이며 감소하였지만($p < 0.05$), 외투막 가장자리에 존재하는 주름들에서는 노출 12주까지 감소하였던 점액세포가 증가하면서 AB-PAS (pH 2.5) 반응시 보라색 (2587c)으로 관찰되는 점액물질이 관찰되었다. 이후 노출 28주에는 가운데 주름 부위의 안쪽 분지에서 상피세포의 변형이 관찰되었고, 외부 상피층에서는 상피세포의 부분적인 파괴가 관찰되었다. 실험 종료시기인 36주에는 바깥쪽 주름 부위에 호산성 과립들이 관찰되었으며, 가운데 주름부위의 바깥 분지에서 상피세포의 변형과 파괴로 인한 상피층의 붕괴가 관찰되었다. 또한 외부 상피층의 상피세포들은 입방형 또는 편평형으로의 변화와 함께 부분적인 상피층의 붕괴가 나타났고, 그로 인하여 상피층의 두께가 감소하였다. 따라서 섬모의 탈락과 점액세포의 감소 그리고 상피층의 파괴는 외투막 정화 기능의 장애로 인한 먹이 섭식의 장애를 유발할 것으로 생각되며, 특히 외투막 가장자리에 존재하는 주름들의 구조적인 변화는 각피층 형성을 억제하여 패각 성장 장애의 직접적인 원인으로 생각되어진다.

REFERENCES

- Abd Allah, A.T., Wanas, M.Q.S. and Thompson, S.N. (1997) Effects of heavy metals on survival and growth of *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda: Pulmonata) and interaction with schistosome infection. *Journal of Molluscan Study*, **63**(1): 79-86.
- Alzieu, C. and Heral, M. (1984) Ecotoxicological effects of organotin compounds on oyster culture. In: *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*. (ed. by Persoone, G., Jaspers, E. and Claus, C.) pp. 187-196. University of Ghent and Institute of Scientific Research, Bredene, Belgium.
- Alzieu, C., Sanjuan, J., Deltreil, J.P. and Borel, M. (1986) Tin contamination in Arcachon Bay: effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin*, **17**: 494-498.
- Batley, G.E., Fuhua, C., Brockbank, C.I. and Flegg, K.J. (1989) Accumulation of tributyltin by the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research*, **40**: 49-54.
- Drury, R.A.B. and Wallington, E.A. (1980) *Carleton's Histological Technique*. 520 pp. Oxford University Press, Oxford.
- Dubey, S.K. and Roy, U. (2003) Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *Applied Organometallic Chemistry*, **17**: 3-8.
- Eble, A.F. 2001. Anatomy and histology of *Mercenaria mercenaria*. In: *Biology of the Hard Clam*. (ed. by Kraeuter J.N. and Castagna, M.) pp. 117-220. Elsevier, New York.
- Halldórsson, H.P., Svavarsson, J. and Granmo, Å. (2005) The effect of pollution on scope for growth of the mussel (*Mytilus edulis* L.) in Iceland. *Marine Environmental Research*, **59**: 47-64.
- Hinch, S.G. and Stephenson, L.A. (1987) Size- and age-specific patterns of trace metal concentrations on fresh water clams from an acid-sensitive and a circumneutral lake. *Canadian Journal of Zoology*, **65**: 2436-2442.
- Ju, S.M., Lee, J.W., Jin, Y.G., Yu, J. and Lee, J.S. (2006) Effect of zinc bioaccumulation on survival rate, activity, growth and organ structure of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Environmental Toxicology*, **21**: 115-126.
- Kannan, K., Senthilkumar, K., Logannathan, B.G., Takahashi, S., Odell, D.K. and Tanade, S. (1997) Elevated accumulation of tributyltin and its breakdown products in bottle nose dolphins (*Tursiops truncatus*) found stranded along the U.S. Atlantic and Gulf coasts. *Environmental Science & Technology*, **31**: 296-301.
- Kawaguti, S. and Ikemoto, N. (1962) Electron microscopy on the mantle of a bivalve, *Fabulina nitidula*. *Biological Journal of Okayama University*, **8**: 1-20.

- Kim, S.Y. and Lee, T.Y. (1988) The effects of pollutants effluent from a steam-power plant on coastal bivalves. *Oceanology Research*, **10**(1): 47-56. [in Korean]
- Lee, J.S. and Park, J.J. (2007) Risk assessment of nonlyphenol using sex ratio, sexual maturation, intersex and lipofuscin accumulation of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Korean Fisheries Society*, **40**(1): 16-23. [in Korean]
- Lee, J.S., Joo, J.Y. and Park, J.J. (2007) Histology and ultrastructure of the mantle epidermis of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Shellfish Research*, **26**: 413-421. [in Korean]
- Lee, J.Y., Park, Y.J. and Chang, Y.J. (1999) Gonadal development and reproductive cycle of *Gomphina melanaegis* (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Korean Fisheries Society*, **32**(2): 198-203. [in Korean]
- Morrison, C.M. (1993) Histology and cell ultrastructure of the mantle and mantle lobes of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin): a summary atlas. *American Malacological Bulletin*, **10**(1): 1-24.
- Otludil, B., Cengiz, E.I., Yildirim, M.Z., Unver, O. and Ünlü, E. (2004) The effects of endosulfan on the great ramshorn snail, *Planorbis cornutus* (Gastropoda, Pulmonata): a histopathological study. *Chemosphere*, **56**: 707-716.
- Park, J.J., Lee, J.Y., Lee, J.S. and Chang, Y.J. (2003) Gonadal development and gametogenic cycle of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Korean Fisheries Society*, **36**(4): 352-357. [in Korean]
- Park, J.J., Lim, K.H., Park, J.C., Jeong, S.A., Kwak, I.S., Cho, H.S., Shin, H.C. and Lee, J.S. (2006) The effect of long-term cadmium exposure on the organ structure of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *Bulletin of the Fisheries Science Institute Chonnam National University*, **15**: 10-20. [in Korean]
- Pekkarinen, M. (1996) Scanning electron microscopy, whole-mount histology, and histochemistry of two *Anodontine glochidia* (Bivalvia: Unionidae). *Journal of Zoology*, **74**(11): 1964-1973.
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson J. and Mothersill, C. (2004) The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*, **66**: 279-292.
- Rasmussen, L.P.D., Hage, E. and Karlog, O. (1983) Light and electron microscopic studies of the acute and chronic toxic effects of N-nitroso compounds on the marine mussel, *Mytilus edulis* (L.). II. N-methyl-N-nitro-N-nitroguanidine. *Aquatic Toxicology*, **3**: 301-311.
- Regoli, F. and Orlando, E. (1994) Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment. *Marine Pollution Bulletin*, **28**(10): 592-600.
- Regoli, L., Chan, H.M., de Lafontaine, Y. and Mikaelian, I. (2001) Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec City Harbour area of the St. Lawrence River. *Aquatic Toxicology*, **53**: 115-126.
- Roberts, Jr., M.H. (1987) Acute toxicity of tributyltin chloride to embryos and larvae of two bivalve mollusks, *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **39**: 1012-1019.
- Salazar, M.H. (1989) Mortality, growth and bioaccumulation in mussels exposed to TBT: difference between the laboratory and the field. *Oceans '89. Proceedings*, **2**: 530-536.
- Salazar, M.H. and Salazar, S.M. (1987) Tributyltin effects on juvenile mussel growth. In: Oceans 87, Vol. 4. Proceedings International Organotin Symposium. pp. 1504-1510. Marine Technology Society, Washington, DC.
- Salazar, S.M., Davidson, B.M., Salazar, M.H., Stang, P.M. and Meyers-Schulte, K.J. (1987) Effects of tributyltin on marine organisms: Field assessment of a new site-specific bioassay system. In: Oceans 87, Vol 4. Proceedings International Organotin Symposium. pp. 1461-1470, Marine Technology Society, Washington, DC.
- Saleuddin, A.S.M. (1974) An electron microscopic study of the formation and structure of the periostracum in *Astarte* (Bivalvia). *Canadian Journal of Zoology*, **52**: 1463-1471.
- Stephenson, M.D. (1991) A field bioassay approach to determining tributyltin toxicity to oysters in California. *Marine Environmental Research*, **32**: 51-59.
- Strömberg, T. and Bongard, T. 1987. The effect of tributyltin oxide on growth of *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, **18**: 30-31.
- Sunila, I. and Indström, R. (1985) Survival, growth and shell deformities of copper- and cadmium- exposed mussels (*Mytilus edulis* L.) in brackish water. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **21**: 555-565.
- Thain, J.E. and Waldock, M.J. (1986) The impact of tributyltin (TBT) antifouling paints on molluscan fisheries. *Water Science Technology*, **18**: 193-202.
- U.S. EPA. (2003) Ambient aquatic life water quality criteria for tributyltin (TBT)-final. pp. 1-129. United States Environmental Protection Agency, Washington DC.
- von Bertalanffy, L. (1938) A quantitative theory of organic growth (Inquiries on growth laws. II). *Human Biology*, **10**: 181-213.
- Waldock, M.J. and Thain, J.E. (1983) Shell thickening in *Crassostrea gigas*: Organotin antifouling or sediment induced? *Marine Pollution Bulletin*, **14**: 411-415.
- Watling, H.R. and Watling, R.J. (1982) Comparative

effects of metals on the filtering rate of brown mussel, *Perna perna*. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, **29**: 651-657.

Wolniakowski, K.U., Stephenson, M.D. and Ichikawa, G.S. (1987) Tributyltin concentrations and Pacific oyster deformations in Coos Bay, Oregon. *In: Oceans 87, Vol. 4. Proceedings International Organotin Symposium.* pp. 1438-1442. Marine Technology Society, Washington, DC.

Yoo, J.-S. (1988) Korean shells in color. 196 pp. Iljisa Pub. Co., Seoul. [in Korean]