

## 참개구리 배아를 이용한 화학물질의 독성평가 연구

고 선 근\*

호남대학교 생물학과

Toxicity Evaluation of Chemicals using Black-spotted Pond Frog Embryos, *Rana nigromaculata*

Sun-Kun Ko\*

Department of Biology, Honam University, Gwangju 506-714, Korea

**Abstract** - Toxicity of  $\text{Ni}^{2+}$  and Tebuconazole were investigated via FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*) protocol using domestic frog embryos. Embryos of Black-spotted pond frog, *Rana nigromaculata*, were incubated and toxic effects of  $\text{Ni}^{2+}$  and Tebuconazole were investigated by probit analysis. As a result, mortality and malformation rates were increased and larval body length was decreased in a dose dependant manner of  $\text{Ni}^{2+}$  and Tebuconazole. The half maximal effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) of  $\text{Ni}^{2+}$  and Tebuconazole were 0.07, 12.7  $\text{mg L}^{-1}$ , respectively and the half maximal lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ ) of  $\text{Ni}^{2+}$  and Tebuconazole were 4.2, 39.1, respectively. The teratogenic index (TI) were 61.4 in  $\text{Ni}^{2+}$  and 3.1 in Tebuconazole, respectively. These results reveals that  $\text{Ni}^{2+}$  and Tebuconazole suppress the development of Black-spotted pond frog embryos at the low concentration as showing teratogenic effects in other assay system. Therefore, teratogen assay system using the *Rana nigromaculata* embryos could be useful as a tool to evaluate the toxicity of the pollutants in environment.

**Key words** :  $\text{Ni}^{2+}$ , Tebuconazole, teratogenicity, *Rana nigromaculata*

## 서 론

개구리의 배아를 활용하여 화학물질에 대한 독성평가와 환경오염물질의 독성 및 기형유발에 대한 시험법으로 Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX) 방법을 널리 사용하고 있다 (Fort *et al.* 1988; Bantle *et al.* 1990; Presutti *et al.* 1994; Morgan *et al.* 1996). FETAX는 남아프리카산 개구리의 수정란에서 배아발달과정을 거

쳐 올챙이로 변화하는 단계를 활용하는 활용성이 매우 높은 시험기법으로 알려져 있다 (Bantle *et al.* 1996). FETAX 방법에 따른 독성유발 여부는 사망률 (Mortality) 과 기형율 (malformations) 등을 측정하여 평가한다. 사망률과 기형율은 노출시킨 배아들의 50%가 영향을 받는 지수 half maximal lethal concentrations ( $\text{LC}_{50}$ ) 및 half maximal effective concentrations ( $\text{EC}_{50}$ )으로 나타내며 두 값의 비율인  $\text{LC}_{50}/\text{EC}_{50}$ 을 기형유발 지수 (teratogenic index, TI) 로 표시하여 나타낸다. 시험대상 물질에 의한 TI 지수의 범위가 1.5 이상의 경우에 시험대상 물질은 독성에 의한 최기형성 물질로 판정한다 (Bantle and Courchesne 1985). 이러한 FETAX 방법에 따라 최근 다른 여러 나라에서는

\* Corresponding author: Sun-Kun Ko, Tel. 062-940-5432, Fax. 062-940-5207, E-mail. sunkun@honam.ac.kr

그 나라에 서식중인 개구리들의 배아를 활용하여 화학물질들의 독성을 파악하는 연구가 진행되어지고 있다 (Gutleb *et al.* 1999; Mann and Bidwell 2000). 그러나 우리나라에서는 아직 국내에 서식중인 개구리의 배아를 활용하여 화학물질 및 환경오염물질의 독성을 평가 하려는 연구는 북방산개구리의 배아 (Ko 2006)와 무당개구리의 배아 (Kang *et al.* 2004)를 활용한 연구가 일부 진행되었다. 본 연구에서는 국내에 서식중인 개구리 중 전국적으로 분포지역이 넓고 다른 종에 비해 채집이 비교적 용이하며 번식주기 등이 알려져 있는 참개구리 (*Rana nigromaculata*) (Ko *et al.* 1997; Ko *et al.* 1998)를 대상으로 배아의 정상발달 과정을 관찰하면서 참개구리 배아의 발달단계별로 FETAX 기법을 적용하여 대표적 유해화학물질로 알려진 중금속류인  $Ni^{2+}$ 과 농약류 중 진균제인 Tebuconazole에 의한 초기형성 등의 독성을 평가가능 여부를 판단하고 이를 토대로 화학물질 및 환경오염물질의 독성을 평가할 수 있는 기법을 확보하여 화학물질 및 환경매체의 유해성을 평가하는 기법으로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험동물

시험에 사용했던 참개구리 (*Rana nigromaculata*)는 2012년 5월 하순~6월 초순까지 광주 전남 일대에서 번식 시기에 포집중인 참개구리 암·수 성체를 직접 채집하여 사용하였다.

### 2. 배양액 제조

Amphibian Ringer 용액 (AR;  $6.6 \text{ g L}^{-1}$  NaCl,  $0.15 \text{ g L}^{-1}$  KCl,  $0.15 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.2 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ ,  $0.05 \text{ g L}^{-1}$  Streptomycin,  $0.03 \text{ g L}^{-1}$  Penicillin G)을 제조하여 pH 7.4로 맞추어 사용하였다.

### 3. 수정란 채취 및 배양

채집된 암·수 개체들에 의한 자연 배란 및 수정을 유도한 후 3시간 이내에 2세포의 배아들이 출현하기 시작하면 (Johnson and Volpe 1973; Mathews 1986) 2세포의 배아들 중 세포질들이 정확히 나누어져 균일한 할구들을 가진 배아들을 선택하여 예리한 포셀으로 젤리층을 제거하고  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 포배기까지 배양하여 시험에 사용하였으며 배양과정 중 24시간마다 새로운 배양액으로 교환하였다.

### 4. 정상발생과정 조사

직경이 100 mm의 유리 배양접시에 시험물질이 첨가되지 않는 배양액을 60 mL씩 넣고 30개의 배아를 배양하면서 2세포기에서 올챙이의 꼬리지느러미 순환시기까지 일정 온도에서 진행되는 정상발생과정과 각 발생단계에 소요되는 시간 등을 조사하였다.

### 5. 시험물질 처리

배아의 발달에 미치는 영향을 파악하기 위해  $Ni^{2+}$ 은 1,000 ppm Stock solution (KANTO Chem.)을 구입하여 사용하였으며 Tebuconazole (농업진흥청 제공)은 DMSO에 녹여 1,000 ppm Stock solution으로 제조하고 이를 AR용액으로 희석하여 사용하였다.  $Ni^{2+}$  및 Tebuconazole에 의한 생존율 및 기형율을 조사하기 위해 배양된 배아들을  $Ni^{2+}$  (0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0  $\text{mg L}^{-1}$ )와 Tebuconazole (1.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0  $\text{mg L}^{-1}$ )을 처리한 유리 배양접시에 시험물질이 농도별로 포함된 실험군과 시험물질이 포함되지 않는 대조군의 배양액 10 mL에 각 농도별로 30개씩 넣고  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 96시간 배양하면서 24시간마다 새로운 용액으로 교환하였다. 모든 농도구간에 대해 각기 다른 개체에서 채취한 배아들을 사용하여 3회 이상 반복 시험하였다.

### 6. 결과처리 및 분석

사망률은 각 농도별로 24시간마다 관찰하여 죽은 것을 제거하고 96시간 후 (죽은개체수/노출개체수)  $\times 100$ 으로 계산하여 한 각 농도별의 사망률을 구하였다. 96시간 후 생존한 개체들을 대상으로 머리, 복부, 꼬리 등의 각 부위 별 기형여부를 조사하여 각 농도별로 (영향을 받은 개체수/영향을 받지 않은 개체수)  $\times 100$ 으로 계산하여 기형율을 구하였으며 이들 값을 대상으로 Probit analysis Program을 활용하여  $LC_{50}$ ,  $EC_{50}$  값을 산출하였다.  $LC_{50}$  값을  $EC_{50}$  값으로 나누어 Teratogenic Index (TI)를 구하였으며 TI 값이 1.5 이상이 되면 유해성이 있는 물질로 판정하였다 (Bantle and Courchesne 1985). 기형의 종류는 정상발달 올챙이를 기준으로 올챙이 꼬리가 파상을 나타내는 양상, 꼬리가 휘어지는 양상 등을 관찰하여 꼬리 기형으로 판정하였고, 복부의 돌출현상 등을 관찰하여 복부기형으로 판정하였으며, 몸 전체에 형성된 수포(물집)의 형성을 관찰하여 수포형성기형 (Edema)으로 판정하였다 (Bantle *et al.* 1998). 배아의 발달과 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 AM-423x Dino-Eye와 Dinocapture 2.0 프로그램 (ANMO)을 사용하여 배아의 직경 및 유생의 머리 끝부터 꼬리 끝까지 체장을 측정하였다.

결 과

1. 배아발달과정

참개구리 암컷 한 개체에서 배란된 난자들은 약 1,000 ~ 1,500개 정도였으며 직경은  $1.8 \pm 0.1$  mm였다. 수정이 후 배아의 발달과정을 조사한 결과 시험에 사용했던 포배기(blastula)의 배아는 수정 후 대략 25시간 이내에 나타나기 시작하였으며 배아의 직경은  $1.9 \pm 0.1$  mm 정도였으며 이후 신경관(neural plate), 신경습(neural fold), 신경구(neural groove) 등을 형성하는 기관형성(organogenesis) 단계에서는 그 크기가 다소 증가되어 약  $2.3 \pm 0.1$  mm 정도를 나타냈다. 신경관(neural tube)이 완성되는 시기까지는 대략 60시간 정도 소요되었으며 올챙이의 기본 형태가 나타나기 시작한 꼬리, 눈 형성시기에서부터는 크기가 급격하게 증가하여 그 전장이  $5.0 \pm 0.9$  mm 정도를 나타내었다. 현미경 시야에서 올챙이의 운동성을 관찰해 볼 수 있는 근육반응 시기에는 배아의 전장이

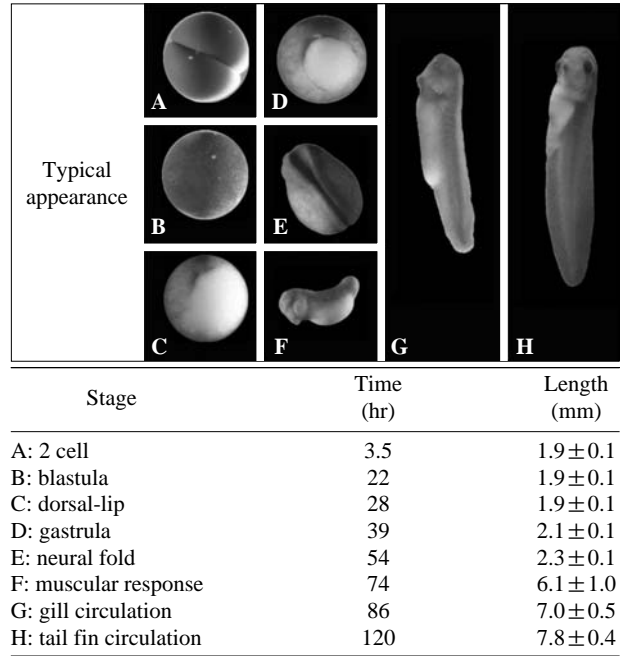


Fig. 1. Embryonic development of the frog, *Rana nigromaculata*.

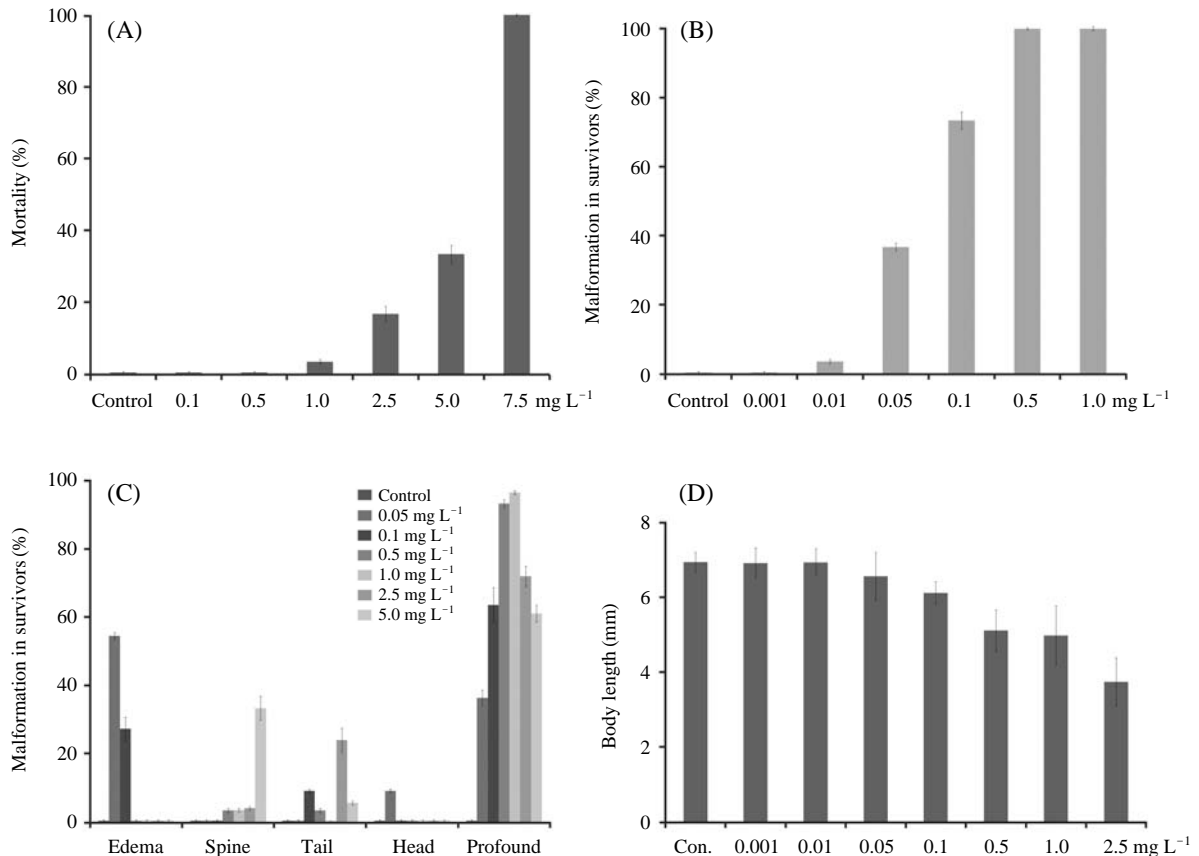
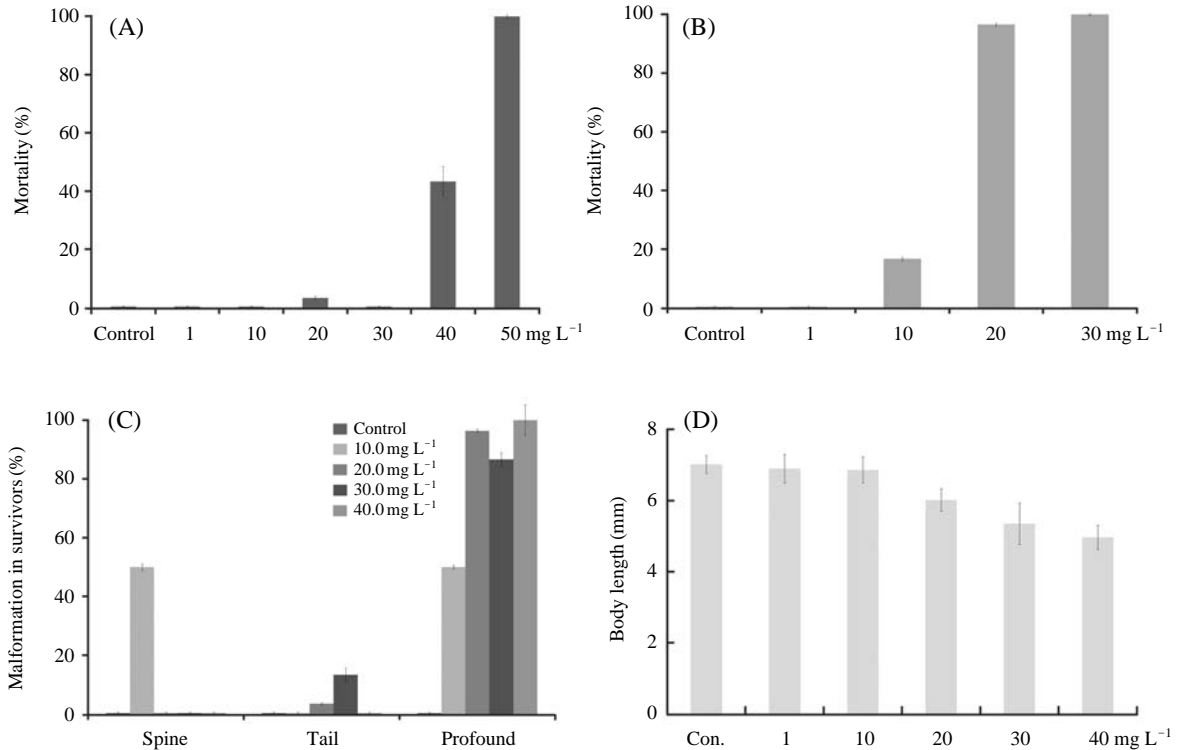


Fig. 2. Frequencies of the mortality (A), malformation (B), pattern of malformation (C) and body length (D) of Ni<sup>2+</sup>-treated *Rana nigromaculata* embryo.



**Fig. 3.** Frequencies of the mortality (A), malformation (B), pattern of malformation (C) and body length (D) of Tebuconazole-treated *Rana nigromaculata* embryos.

6.1 ± 1.0 mm 정도였으며 수정 후 대략 74시간 정도에서 나타나기 시작하였다. 또한, 올챙이의 걸아가미가 나타난 시기에서는 그 전장의 길이는 대략 7.0 ± 0.5 mm 정도였으며 86시간 정도가 소요되었다. 올챙이가 헤엄치며 이동하는 시기인 꼬리지느러미 순환기에는 그 전장이 7.8 ± 0.5 mm 정도로 자랐으며 소요시간은 대략 120시간 정도였다 (Fig. 1).

## 2. 참개구리 배아발달에 미치는 Ni<sup>2+</sup>의 효과

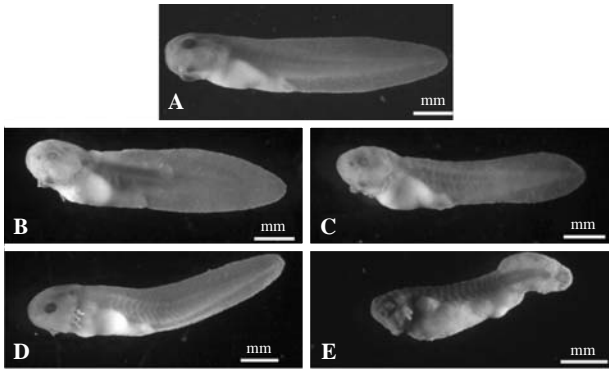
참개구리의 배아 발달에 미치는 Ni<sup>2+</sup>의 효과를 알아보기 위해 낭배기의 배아들을 Ni<sup>2+</sup>이 첨가되지 않는 대조군과 배양액내 Ni<sup>2+</sup> 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mg L<sup>-1</sup>를 각각 처리하여 96시간 배양 후 치사율, 기형율, 기형의 종류 등을 조사하였다. 배양액내 Ni<sup>2+</sup> 7.5 mg L<sup>-1</sup> 이상의 농도에서는 모든 배아가 치사하였고 1 mg L<sup>-1</sup>에서는 3.3%의 치사된 배아들이 나타나기 시작하였으며 2.5, 5 mg L<sup>-1</sup>으로 농도가 높아지면서 치사된 배아들의 비율도 16.7%, 33.3%로 증가하여 나타났다 (Fig. 2A). 기형을 나타내는 개체는 0.01 mg L<sup>-1</sup>에서부터 3.5%의 배아들에서 나타나기 시작하였으며 0.05, 0.1 mg L<sup>-1</sup>으로 농도가 증가할수록 기형율도 36.7%, 73.3%로 증

**Table 1.** LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> (malformation) and TI of *Rana nigromaculata* embryos exposed to heavy metal (Ni<sup>2+</sup>) and pesticide (Tebuconazole)

	Exposure time (hr)	LC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	TI (LC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )
Heavy Metal				
Ni <sup>2+</sup>	96	4.2	0.07	61.4
Pesticides				
Tebuconazole	96	39.1	12.7	3.1

가하여 나타났다 (Fig. 2B). Ni<sup>2+</sup>에 의한 참개구리의 배아의 LC<sub>50</sub>은 4.2를 나타내었고 EC<sub>50</sub>은 0.07을 나타내어 TI는 61.4를 나타냈다 (Table 1).

Ni<sup>2+</sup>의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 수포형성, 꼬리기형, 척추기형, 복합기형 등이었으며 복합기형의 비율이 다른 기형 종류에 비해 높았다 (Fig. 4). 이들의 비율을 농도별로 살펴보면 LC<sub>50</sub>을 나타내는 농도보다 낮은 0.1 mg L<sup>-1</sup>에서는 수포형성기형의 비율이 높았으며 LC<sub>50</sub>을 나타내는 농도와 가까운 5 mg L<sup>-1</sup>에서는 복합기형이 높은 비율로 나타났다 (Fig. 2C). 배아의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 대조군 (6.9 ± 0.4 mm)에 비해 Ni<sup>2+</sup>의 농도가 0.05, 0.5, 2.5 mg L<sup>-1</sup>로 증가함에 따라 유생의



**Fig. 4.** Tadpoles of *Rana nigromaculata* exposure to  $\text{Ni}^{2+}$ , Tebuconazole at the blastula stage. (A) *Rana nigromaculata* tadpole of control approximately 120 h after fertilization. (B) *Rana nigromaculata* tadpole after 96 h exposure to  $0.075 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$  displaying edema. (C) *Rana nigromaculata* tadpole after 96 h exposure to  $0.25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$  displaying flexure of the tail. (D) *Rana nigromaculata* tadpole after 96 h exposure to  $10 \text{ mg L}^{-1}$  Tebuconazole displaying wave spine. (E) *Rana nigromaculata* tadpole after 96 h exposure to  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$  displaying profound.

체장은  $6.6 \pm 0.6$ ,  $5.1 \pm 0.6$ ,  $3.7 \pm 1.6 \text{ mm}$ 로 감소하였다 (Fig. 2D).

### 3. Tebuconazole이 참개구리 배아발달에 미치는 효과

참개구리의 배아 발달에 미치는 Tebuconazole의 효과를 알아보기 위해 낭배시기의 배아들을 Tebuconazole이 첨가되지 않는 대조군과 Tebuconazole 1.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0  $\text{mg L}^{-1}$ 를 각각 처리하여 96시간 배양 후 배아들에게 나타난 치사율, 기형율, 기형의 종류 등을 조사하였다.

치사율을 조사한 결과  $20 \text{ mg L}^{-1}$ 에서부터 죽는 배아들이 3.3%의 비율로 나타나기 시작하여 40, 50  $\text{mg L}^{-1}$ 으로 농도가 높아지면서 43.3%, 100%로 비율도 각각 증가하였다 (Fig. 3A). 기형은  $10 \text{ mg L}^{-1}$ 에서부터 16.7%의 비율로 나타나기 시작하였으며 기형율도 20, 30  $\text{mg L}^{-1}$ 으로 농도가 높아지면서 96.6%, 100%로 각각 증가하였다 (Fig. 3B). Tebuconazole에 의한 참개구리의 배아의  $\text{LC}_{50}$ 은 39.1를 나타내었고  $\text{EC}_{50}$ 은 12.7를 나타내어 TI는 3.1을 나타냈다 (Table 1).

Tebuconazole에 의해 나타난 기형의 종류는 척추기형, 꼬리기형, 복합기형 등이었으며 복합기형의 비율이 다른 기형 종류에 비해 높았다 (Fig. 3C). 이들의 비율을 농도별로 살펴보면  $\text{LC}_{50}$ 을 나타내는 농도보다 낮은  $10 \text{ mg L}^{-1}$ 의 농도에서는 척추기형과 복합기형의 비율이 비슷하게 나타났으나  $\text{LC}_{50}$ 와 가까운  $30 \sim 40 \text{ mg L}^{-1}$ 의 농도

에서는 척추기형보다 복합기형의 비율이 높게 나타났다 (Fig. 3C). 배아의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 대조군 ( $7.0 \pm 0.3 \text{ mm}$ )에 비해 Tebuconazole의 농도가 20, 40  $\text{mg L}^{-1}$ 로 증가함에 따라 유생의 체장은  $6.0 \pm 0.4$ ,  $5.1 \pm 0.2 \text{ mm}$ 로 감소하여 나타났다 (Fig. 2D).

## 고 찰

본 연구에서 참개구리의 자연배란 및 수정에 의한 수정란의 채취와 배아의 배양을 통하여 발생과정을 확인하고 (Fig. 1) 배양조건 등을 확립할 수 있었다. 참개구리의 수정란-배아-올챙이의 발달 양상은 *Rana pipiens* (Johnson and Volpe 1973; Mathews 1986) 및 *Xenopus laevis*의 양상 (Deuchar 1972)과 거의 유사한 경향을 나타내었다. 암컷 참개구리 1개체에서 배란되어진 난자는 약 1,000~1,500개 정도였으며 이들 대부분이 수정과정에 의해 배아로 변화되어져 균일화된 다량의 배아확보가 가능하고 배양이 용이하여 화학물질의 독성을 평가하기에 적합한 시험 동물임을 알 수 있었다.

$\text{Ni}^{2+}$ 의 시험결과  $1 \text{ mg L}^{-1}$ 에서 치사된 배아들이 나타나기 시작하였으며  $7.5 \text{ mg L}^{-1}$  이상의 농도에서는 모든 배아가 치사하였고 2.5, 5  $\text{mg L}^{-1}$ 으로 농도가 높아지면서 치사된 배아들의 비율도 16.7%, 33.3%로 증가하여 나타났다. 또한 Tebuconazole의 시험결과  $20 \text{ mg L}^{-1}$ 에서부터 죽는 배아들이 3.3%의 비율로 나타나기 시작하여 40, 50  $\text{mg L}^{-1}$ 으로 농도가 높아지면서 43.3%, 100%로 비율도 각각 증가하여  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole 모두 농도에 의존하여 치사율이 증가하는 경향을 나타냈다. 체장의 경우  $\text{Ni}^{2+}$ 의 시험결과 대조군 ( $6.9 \pm 0.4 \text{ mm}$ )에 비해 농도가 0.05, 0.5, 2.5  $\text{mg L}^{-1}$ 로 증가함에 따라 유생의 체장은  $6.6 \pm 0.6$ ,  $5.1 \pm 0.6$ ,  $3.7 \pm 1.6 \text{ mm}$ 로 감소하였으며 Tebuconazole의 시험결과도 대조군 ( $7.0 \pm 0.3 \text{ mm}$ )에 비해 농도가 20, 40  $\text{mg L}^{-1}$ 로 증가함에 따라 유생의 체장은  $6.0 \pm 0.4$ ,  $5.1 \pm 0.2 \text{ mm}$ 로 감소하였다. 시험물질의 농도증가에 따라 치사율이 증가하고 체장의 길이가 짧아지는 현상들은 시험에 사용했던  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole이 참개구리 배아 성장에 유해하게 작용하는 것으로 해석된다. 이러한 현상들은 *Xenopus laevis* 배아발달에 미치는  $\text{Ni}^{2+}$ 의 효과는  $\text{LC}_{50}$  365  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $\text{EC}_{50}$  2.5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , TI 147로 나타났으며 올챙이의 체장도 농도 증가에 따라 감소하여 본 실험과 유사한 경향을 나타내었다 (Hopfer *et al.* 1991). 한편 *Xenopus laevis* 배아발달에 미치는 Tebuconazole의 효과는  $\text{LC}_{50}$ 이 82.35  $\mu\text{mol L}^{-1}$ 로 나타났으며 농도 증가에 따른 체장의 길이가 감소하는 등 본 실험과

유사한 경향을 나타냈다(Hwang *et al.* 2010).

화학물질의 독성 판정을 위한 주요 생물학적 판정지표인 기형율을 조사한 결과  $\text{Ni}^{2+}$ 의 경우 기형 개체는  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ 에서 나타나기 시작하였고 Tebuconazole에 의한 기형은  $10 \text{ mg L}^{-1}$ 에서부터 16.7%의 비율로 나타나기 시작하여 기형율도 20, 30  $\text{mg L}^{-1}$ 으로 농도가 높아지면서 그 비율도 96.6%, 100%로 각각 증가하였다. 기형율도 성장률과 유사하게  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole 모두 농도에 의존하여 증가하는 경향을 나타내어 참개구리 배아발달 과정에 기형을 유발하는 것으로 해석되어진다. Australian frog (*Litoria adelaidensis*, *Crinia insignifera*) 배아를 활용하여 nonylphenol ethoxylate에 노출시킨 결과와 비교해 볼때  $\text{LC}_{50}$ ,  $\text{EC}_{50}$ , MCIG (minimum concentration inhibit growth)가 각각 9.2, 8.8,  $5.1 \sim 6.0 \text{ mg L}^{-1}$ 와 6.4, 4.5,  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$ 을 나타내었고 TI는 1.0, 1.6을 나타내었으며 농도 증가에 따라 올챙이의 체장의 감소를 나타내어 본 실험의 결과들과 유사한 경향을 나타내었다(Mann and Bidwell 2000). FETAX 기법을 적용한  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole에 의한 TI가 61.4, 3.1로 계산되었다. 이러한 TI는 1.5보다 값이 클 때 시험물질이 최기형성을 갖는 것으로 판단하게 된다(Bantle and Courchesne 1985). 따라서  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole은 모두 참개구리 배아발달에 최기형성 물질로 작용하는 것으로 나타났으며 TI값이 Tebuconazole에 비해  $\text{Ni}^{2+}$ 이 약 20배 높은 값을 나타내어 이는  $\text{Ni}^{2+}$ 이 보다 강력한 최기형성 물질임을 시사하는 것으로 판단된다. 한편,  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는  $\text{Ni}^{2+}$ 의 경우 수포형성기형, 꼬리기형, 척추기형, 복합기형 등이 나타났고 Tebuconazole의 경우 척추기형, 꼬리기형, 복합기형 등이 나타났으며 이들은  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole의 농도에 의존하여 그 비율도 증가하였다. 이러한 결과들은 국내산 개구리인 무당개구리 (*Bombina orientalis*) 배아, 북방산개구리 (*Rana dybowskii*)의 배아발달에 화학물질을 처리하여 나타난 기형의 종류(수포형성기형, 꼬리기형, 복부기형, 두부기형, 성장장애, 척추기형)와 유사한 경향을 나타내었다(Kang *et al.* 2004; Ko 2004).

이상의 결과들로 보아  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole 모두 낮은 농도에서 치사율, 기형율, 기형양상, 성장률 등이 농도증가에 의존하여 배아의 발달 과정에 민감하게 반응하였으며 각각의 문헌상 자료와 비교할 때 유사한 결과들을 나타내어 참개구리 배아를 활용한 화학물질의 독성시험 기법은 신뢰성을 확보한 것으로 사료되어지며 국내산 개구리 중 북방산개구리는 서식지의 제한과 2~3월 사이에 번식하여 농약 등 오염물질들을 주로 사용하는 시기와 계절적으로 차이가 있으며 무당개구리의 경우 서

식지의 제한 및 배란된 난자 수가 20~30개 정도이며 난자 크기 차이가 커서 같은 크기의 난자를 대량 확보하는데 어려움이 있다. 본 실험에 사용했던 참개구리는 분포지역이 넓고 번식시기도 다른 개구리에 비해 길며 균일한 크기의 난자를 대량채취 할 수 있는 장점을 가지고 있어 화학물질 및 환경오염물질의 독성검정에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

## 적 요

국내에 서식하는 개구리의 배아를 이용하여 화학물질의 독성평가에 대한 가능성을 파악하기 위해 FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus) 기법에 따라 참개구리 (*Rana nigromaculata*)의 배아를 배양하면서  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole의 효과를 probit 분석법으로 조사하였다. 그 결과,  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole의 농도에 의존하여 유생의 체장 길이는 감소하고 치사율과 기형율은 증가하였으며  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole의 half maximal effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ )은 각각 0.07,  $12.7 \text{ mg L}^{-1}$ 을 나타내었고 half maximal lethal concentrations ( $\text{LC}_{50}$ )은 4.2,  $39.1 \text{ mg L}^{-1}$ 을 나타내었다. Teratogenic index ( $\text{TI}=\text{LC}_{50}/\text{EC}_{50}$ )는  $\text{Ni}^{2+}$ 의 경우 61.4, Tebuconazole의 경우 3.1을 나타내어 참개구리 배아 발달에 최기형성 물질로 작용함을 알 수 있었다. 이상의 결과는 참개구리 배아의 발달에 대표적 유해 화학물질인  $\text{Ni}^{2+}$ 과 Tebuconazole이 민감하게 영향을 미침을 보여준다. 또한 참개구리 배아는 다량의 배아 확보가 가능하며 배양이 용이하고 치사율, 기형율, 성장률, 기형양상 등이 참고문헌들과 비교하였을 때 유사한 결과를 나타내어 참개구리 배아를 활용한 시험기법은 화학물질 및 환경오염물질의 독성검정에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

- Bantle, JA and CL Courchesne. 1985. The combined use of genotoxicity and whole embryo teratogenicity screening assays in predicting teratogenic risks, Proceedings of the Second International Conference on Ground-Water Quality Research, Oklahoma State University Press, OK, USA. pp. 175-176.
- Bantle JA, DJ Fort, JR Rayburn, DJ Deyoung and SJ Bush. 1990. Further validation of FETAX: evaluation of the developmental toxicity of five known mammalian teratogens and non-teratogens. Drug. Chem. Toxicol. 13:267-282.

- Bantle JA, JN Dumont, RA Finch and G Linder. 1998. Atlas of Abnormalities: a Guide the Perfomance of FETAX. Oklahoma State University.
- Bantle JA, RA Finch, DT Burton, DJ Fort, DA Dawson, G, Linder, JR Rayburn, M Hull, M Kumsher-King, AM Gaudet-Hull and SD Turley. 1996. FETAX interlaboratory validation study: phase III-part 1 testing, J. Appl. Toxicol. 16:517-530.
- Deuchar EM. 1972. *Xenopus laevis* and developmental biology. Biol. Rev. 47:37-112.
- Fort DJ, DA Dawson and JA Bantle. 1988. Development of ametabolic activation system for the frog embryo teratogenesis assay *Xenopus* (FETAX). Teratog. Carcinog. Mutagen 8:251-264.
- Gutleb AC, J Appelman, MC Bronkhorst, JHJ van den Berg, A Spenkelink, A Brouwer and AJ Murk. 1999. Delayed dffects of pre-and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). Environ. Toxicol. Pharmacol. 8:1-14.
- Hopfer SM, MC Plowman, KR Sweeney, JA Bantle and FW Sunderman Jr. 1991. Teratogenicity of  $\text{Ni}^{2+}$  in *Xenopus laevis*, Assayed by the FETAX Procedure. Biol. Trace Element Res. 29:203-216.
- Hwang YG, MJ Lee, YH Lee, SW Cheong and CS Yoon. 2010. Toxic effects of fungicide tebuconazole on the early development of African clawed frog, *Xenopus laevis*. J. Environ. Sci. 19:1001-1012.
- Johnson RE and EP Volpe. 1973. Patterns and Experiments in developmental biology. pp.7-9, 215-227. In Observation and experiments on the living frog embryo. WM. C. Brown Co.
- Kang HS, MC Gye, JS Lee, YD Yoon and MK Kim. 2004. Effects ofalachlor and endosulfa on the survival and malformation of *Bombina orientalis* embryos. Korean J. Environ. Biol. 22:300-307.
- Ko SK. 2004. A study of the evaluation of teratogenicity of chemical by Korean brown frog embryo, *Rana dybowskii*. Kor. J. Env. Eco. 18:333-339.
- Ko SK. 2006. Effect of  $\text{Cd}^{2+}$  on the oocyte maturation and developmental stages of brown frog embryo, *Rana dybowskii* *in vitro*. Kor. J. Env. Eco. 20:345-351.
- Ko SK, HM Kang, JW Kim and HB Kwon. 1997. Testicular cycles in the Korean frogs: Annual spermatogenic patterns, seasonal changes in the steroidogenic competence, and responsiveness to gonadotropins *in vitro*. Korean J. Biol. Sci. 1:99-105.
- Ko SK, HM Kang, WB Im and HB Kwon 1998. Testicular cycles in three species of korean frogs: *Rana nigromaculata*, *Rana rugosa*, *Rana dybowskii*. Gen. and Comp. Endocrinol. 111:347-358.
- Mann RM and JR Bidwell. 2000. Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. Aquat. Toxicol. 51:19-29.
- Mathew WW. 1986. Atlas of descriptive embryology. Forth Ed. Macmillan Pub. Co. New York. pp.54.
- Morgan MK, PR Scheuerman, CS Bishop and RA Pyles. 1996. Teratogenic potential of atrazine and 2,4-D using FETAX, J. Toxicol. Environ. Health. 48:151-168.
- Presutti C, C Vismara, M Camatini and G Bernardini. 1994. Ecotoxicological effects of a nonionic detergent (Triton DF-16) assayed by ModFETAX. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53:405-411.

Received: 25 July 2012

Revised: 5 September 2012

Revision accepted: 6 September 2012