

〈Original article〉

질산납이 한국산 무미양서류의 배아발달에 미치는 영향

이 해 범 · 고 선 근^{1,*}

전남대학교 대학원 생물과학·생명기술학과, ¹호남대학교 물리치료학과

The Effects of Lead(II) Nitrate on the Embryo Development in Native Amphibians

Hae-Bum Lee and Sun-Kun Ko^{1,*}

Graduate School of Biological Sciences and Biotechnology, Chonnam University,
Gwangju 61186, Republic of Korea

¹Department of Physical Therapy, Honam University, Gwangju 62099, Republic of Korea

Abstract - An investigation of the effects of Pb for domestic anuran embryos were evaluated with the Frog Embryo Teratogenesis Assay; *Xenopus* (FETAX). Depending on the species, the difference between the embryo size and the embryonic development time was determined. As a result, mortality and malformation rates were increased, malformation patterns were changed and larval body length were decreased in a dose dependent manner of the Pb. The half maximal lethal concentration (LC₅₀) of the *Bufo gargarizans*, *Hyla japonica*, *Rana nigromaculata* and *Bombina orientalis* were 0.58, 0.49, 0.52, 0.54 mg L⁻¹, respectively. The half maximal effective concentration (EC₅₀) of the *Bufo gargarizans*, *Hyla japonica*, *Rana nigromaculata* and *Bombina orientalis* were 0.35, 0.74, 0.30, 0.29 mg L⁻¹, respectively. The teratogenic index (TI) were 1.66 in the *Bufo gargarizans*, 1.81 in the *Hyla japonica*, 1.73 in the *Rana nigromaculata* and 1.86 in the *Bombina orientalis*, respectively. Therefore, the Pb seems likely to have a teratogenic effect in all four species' embryonic development. The *Bombina orientalis* was the most sensitive to the Pb. This means that the difference between the different species, even if they have all been exposed to the same concentration of pollutants depending on the species. The result above show that the Pb acts as a teratogenic agent in the development of the four domestic frog species.

Keywords : Pb, *Bufo gargarizans*, *Hyla japonica*, *Rana nigromaculata*, *Bombina orientalis*

서 론

유해화학물질 중 중금속의 경우 자동차의 운행이 많은 도로나 교량 등에 축적되어 있던 것들과 폐광산의 광산 폐석 등에 포함된 중금속이 강우 시 유출수에 포함되어 토양 및 수계, 농경지 등으로 유입되어 생태계를 오염시킨다

(Nobotny *et al.* 1994; Kim and Lee 2005; Kim *et al.* 2005; Lee *et al.* 2006). 다량의 납에 노출될 경우 인간에서 빈혈, 소화기 장애, 신장 장애, 정자형성 기능 저해 등이 유발되는 것으로 알려져 있으며 (Karmarker *et al.* 1986; Fonia *et al.* 1995), 양서류에서는 배아의 발생 이상 및 아기미 기형, 척추 기형, 꼬리기형, 신경관 이상 등이 유발되는 것으로 알려져 있다 (Perez-Coll *et al.* 1988; Perez-Coll and Herkovits 1990; Sobotka and Rahwan 1995).

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

FETAX (Frog embryo Teratogenesis Assay- *Xenopus*)는 기관형성이 활발하게 진행되는 단계의 양서류 배아를 이용해 특정 화학물질의 척추동물에 대한 최기형성을 평가하는 표준시험법이며(Dumont *et al.* 1983), 1991년 American Society for Testing and Materials (ASTM)에서 최기형성평가 표준시험법으로 승인되어(ASTM 1998) 이후 FETAX 방법을 활용한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Carr *et al.* 2003; Vrskova and Modra 2012).

본 연구에서는 국내에 서식 중인 개구리류 중 번식시기와 주요 서식지가 서로 다르나 산란 시 농경지를 이용하는 대표적인 국내산 무미양서류인 청개구리과(Hylidae) 청개구리(*Hyla japonica*), 개구리과(Ranidae) 참개구리(*Rana nigromaculata*), 무당개구리과(Bombinatoridae) 무당개구리(*Bombina orientalis*), 두꺼비과(Bufo) 두꺼비(*Bufo gargarizans*) 배아들을 배양하면서 FETAX 방법을 응용하여 Pb의 농도에 의한 사망률, 기형률, 기형 양상, 성장률 등에 미치는 영향을 조사하고 이에 따라 반수치사농도(half maximal lethal concentration; LC₅₀)와 반수영향농도(half maximal effective concentration; EC₅₀), 기형성 지수(tetagenic index; TI) 등을 산출하여 Pb가 국내에 서식 중인 개구리류의 배아발달에 미치는 영향을 파악하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 배아 준비

실험에 사용한 두꺼비(*B. gargarizans*), 청개구리(*H. japonica*), 참개구리(*R. nigromaculata*), 무당개구리(*B. orientalis*)는 광주광역시 일대에서 포획 중인 개체들을 직접 채집하여 사용했다. 실험에 사용된 배아는 실험실에서 자연 배란에 따른 수정된 배아들 중 세포질이 균일하게 나뉘어진 배아만을 선택하여 포셉으로 젤리층을 제거한 후 낭배기까지 배양하여 실험에 사용하였다.

배아를 세척하거나 배양할 때는 6.6 g L⁻¹ NaCl, 0.15 g L⁻¹ KCl, 0.15 g L⁻¹ CaCl₂, 0.2 g L⁻¹ NaHCO₃, 0.05 g L⁻¹ Streptomycin, 0.03 g L⁻¹ Penicillin G를 혼합하여 Amphibian Ringer (AR) 용액을 제조한 후 pH를 7.4로 맞추어 사용하였다(Johnson and Volpe 1973).

2. 시험물질 처리

Pb는 1,000 mg L⁻¹ Lead standard solution (Pb(NO₃)₂ in HNO₃ 0.5 mol L⁻¹) (MERCK, Germany)을 AR용액에 희석하여 사용하였다. Pb의 효과농도를 조사하기 위해 Pretest (농도 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10 mg L⁻¹, 데이터 표시하지 않음)

를 통해 얻어진 결과 중 기형 및 치사가 나타나지 않은 0.01 mg L⁻¹부터 모든 배아가 치사된 5 mg L⁻¹까지의 농도를 대상으로 보다 정확한 결과를 위해 더욱 세부적으로 분할하여 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5 mg L⁻¹의 농도 구간을 설정하였다. 시험물질이 첨가되지 않은 배양액에 대조군과 시험물질이 농도별로 포함된 실험군을 각각 종의 번식기 실외온도에 맞춰 배양하였으며, 외부의 영향을 최소화하기 위해 독립된 공간에서 노출배양하였다. 각각의 실험군은 10개의 배아를 배양하면서 24시간마다 새로운 배양액과 시험물질로 교환하여 96시간 동안 배양하였으며 모든 시험은 3회 반복하였다.

3. 결과 분석

1) 정상발생과정 조사

우리 배양접시에 세포질이 균일하게 나뉘어진 30개의 배아를 포셉으로 젤리층을 제거한 후 시험물질이 첨가되지 않은 배양액에 배양하면서 매 24시간마다 새로운 배양액으로 교환하여 배양하면서 Gosner (1960)의 방법에 따라 발생과정을 조사하였다.

2) 사망률

사망률은 대조군과 실험군을 24시간마다 확인하여 치사한 배아를 제거한 뒤 노출 96시간 후 생존한 것만을 관찰하였다. 죽은 개체는 운동성이 없거나 세포 붕괴가 일어난 배아와 기관이 형성된 뒤에는 심장이 멈춘 것을 죽은 것으로 판정하였으며 한 농도의 사망률은 96시간 동안 노출된 배아 중 죽은 배아 수를 노출한 배아의 수로 나누어 계산하였다(죽은 배아의 수/노출된 배아의 수×100). 시험 농도 구간은 5개 이상으로 설정하여 Probit 분석법을 통해 반수치사농도(half maximal lethal concentration; LC₅₀)를 구하였다(Goh and Neff 2003).

3) 기형률

대조군과 실험군의 배아 중 치사된 것을 제외하고 96시간 배양 후 생존한 배아를 대상으로 머리, 척추, 복부, 꼬리 등에 일어난 기형을 각각 부위별로 조사하였다(Bantle *et al.* 1998). 기형률은 96시간 동안 노출된 배아 중 살아서 영향을 받은 개체를 정상 개체로 나누어 계산하였으며(살아서 영향을 받은 배아/정상 생존 배아×100) 농도 구간을 5개 이상으로 설정하여 Probit 분석법을 통해 반수영향농도(half maximal effective concentration; EC₅₀)를 구하였다(Goh and Neff 2003).

4) 기형 양상

기형의 종류는 정상 발생된 개체를 기준으로 하여 꼬리가

물결치는 모양을 나타내거나, 휘어지는 양상 및 짧아지는 등의 양상을 관찰하여 꼬리기형(Tail Abnormality)으로 판정하였고 척추가 활처럼 휘어지거나 굽는 등의 경우는 척추기형(Spine Abnormality)으로 판정하였다. 또한 복부가 돌출되어 있거나 내부 장기의 팽만 및 소화기관의 형태 등이 정상개체와 차이를 보일 경우 복부기형(Abdominal Abnormality)으로 판정하였으며 머리의 형태 및 안구와 구강의 발달이 정상개체와 차이를 보이는 경우를 두부기형(Head Abnormality)으로 판정하였다. 또한 두 가지 이상의 다양한 기형이 나온 경우 복합기형(Propound Abnormality)으로 판정하였다(Bantle *et al.* 1991).

5) 성장률

배아의 발달과 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 시험물질에 96시간을 노출시킨 배아를 AM-423x Dino-Eye와 Dinocapture 2.0 program (ANMO)을 사용하여 배아의 직경 및 유생의 체장을 측정한 후 SPSS 20.0 program을 사용하여 Independent t-test로 대조군과 실험군의 유의성을 분석하였다.

6) 기형성 지수(Teratogenic Index; TI)

기형성 지수(TI)는 Probit 분석법을 통해 구한 LC_{50} 를 EC_{50} 으로 나누어(LC_{50}/EC_{50}) 그 값이 1.5 이상으로 나타나면 시험에 사용된 개구리의 배아 발달과정에 최기형성을 나타내는 것으로 판정하였다(ASTM 1998).

결 과

1. 정상발생과정 조사

두꺼비의 경우 시험에 사용했던 낭배기(Gastrula)의 배아는 수정 후 대략 33시간 이내에 나타나기 시작하였으며 기관형성(organogenesis) 단계에서는 그 크기가 다소 증가하여 2.0 ± 0.4 mm를 나타냈으며 꼬리지느러미 순환시기(Tailfin circulation)까지는 127시간이 소요됐다. 청개구리는 수정 후 18시간 정도가 지난 후 낭배기를 나타냈으며 꼬리지느러미 순환시기까지 발생이 진행되기까지 109시간 가량이 소요됐다. 참개구리와 무당개구리의 경우 낭배기의 배아가 출현하기까지 각각 35, 43시간 가량이 소요되었으며 꼬리지느러미 순환시기까지는 각각 126, 135시간 내에 출현하는 것으로 나타났다(Fig. 1, Table 1).

2. Pb의 농도에 따른 치사율 조사

96시간 배양 후 0.075 mg L^{-1} 의 농도에서 무당개구리의 배아가 치사되기 시작하였으며 청개구리와 참개구리의 배아는 0.25 mg L^{-1} 의 농도에서 각각 6.67%가 치사된 것으로 나타났다. 두꺼비의 경우 0.5 mg L^{-1} 의 농도부터 치사된 개체가 확인되었으며 청개구리, 참개구리, 무당개구리의 경우 각각 63.3%, 43.3%, 33.3%의 비율로 배아의 치사가 나타났다. 0.75 mg L^{-1} 의 농도에서는 청개구리, 참개구리, 무당개구리

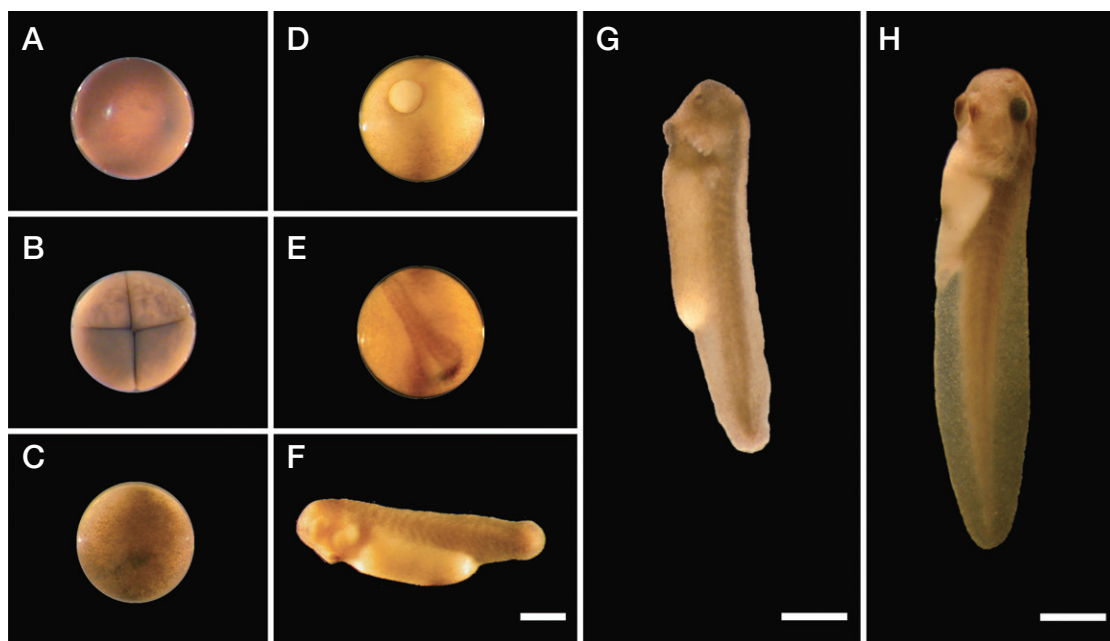


Fig. 1. Embryonic development of the *Rana nigromaculata*. A: fertilized, B: 4-cell, C: Blastula, D: Gastrula, E: Neural fold, F: Muscular response, G: Gill circulation, H: Tailfin circulation. Scale bars = 1 mm.

Table 1. The change of the embryonic development time and body length according to stage in native amphibians.

Gosner stage	Time (hr)				Length (mm, mean + SD)			
	Bu	Hy	Ra	Bo	Bu	Hy	Ra	Bo
1	0	0	0	0	2.1±0.1	1.2±0.1	1.8±0.1	2.3±0.1
4	4	2	5	7	2.1±0.1	1.2±0.1	1.9±0.1	2.3±0.1
9	21	14	20	22	2.1±0.1	1.2±0.1	1.9±0.1	2.5±0.2
12	33	18	35	43	2.1±0.1	1.2±0.1	2.1±0.1	2.5±0.2
14	54	24	50	57	2.4±0.1	1.2±0.1	2.3±0.1	2.9±0.4
18	81	44	71	80	4.8±0.1	2.4±0.1	6.1±1.0	5.1±1.1
20	103	68	82	90	7.5±0.2	5.2±0.3	7.0±0.4	6.8±0.3
22	127	109	126	135	8.3±0.4	6.2±0.2	7.8±0.4	10.7±1.3

1: fertilized, 4: 4-cell, 9: Blastula, 12: Gastrula, 14: Neural fold, 18: Muscular response, 20: Gill circulation, 22: Tailfin circulation, Bu: *B. gargazians*, Hy: *H. japonica*, Ra: *R. nigromaculata*, Bo: *B. orientalis*.

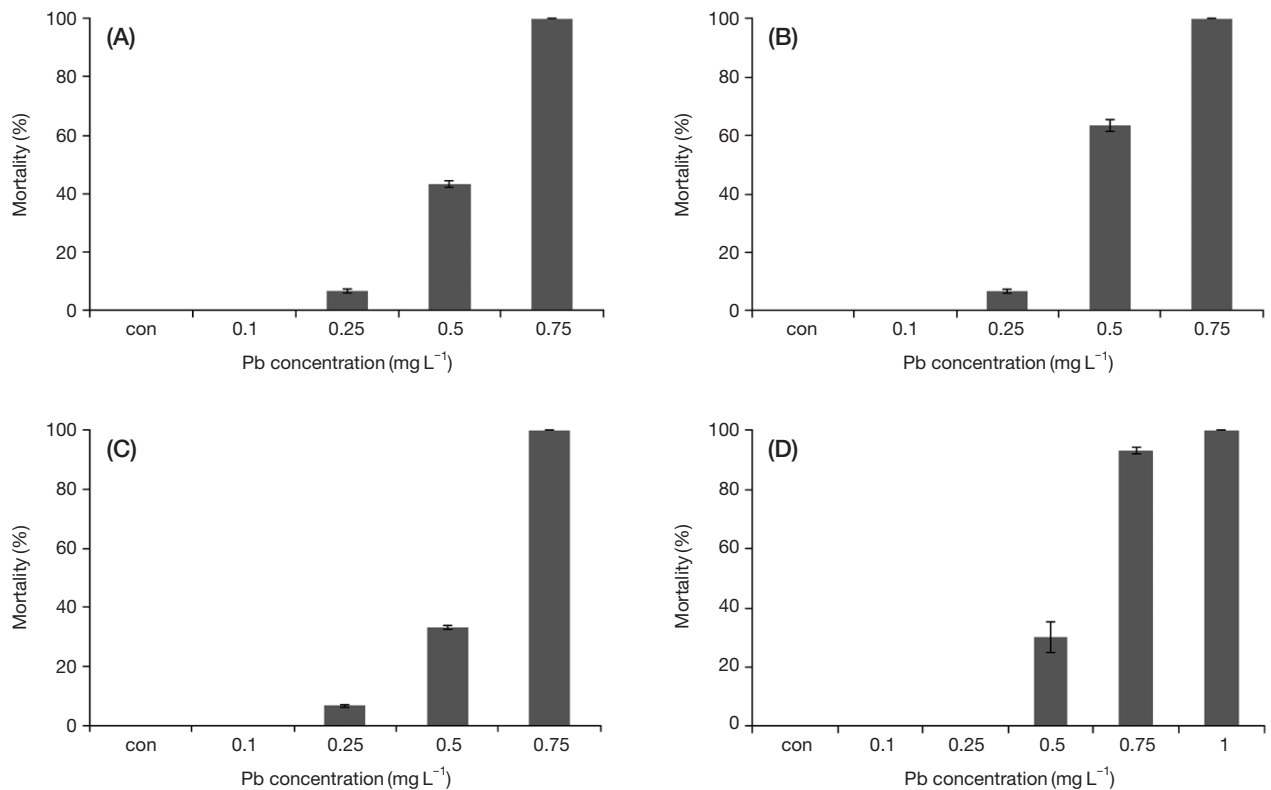


Fig. 2. Frequencies of mortality according to Pb treated concentrations. (A) *H. japonica*, (B) *R. nigromaculata*, (C) *B. orientalis*, (D) *B. gargazians*. Bar height represents mortality, and error bars indicate the standard deviation.

의 경우 100.0%, 두꺼비의 경우 93.3%의 비율로 배아가 치사하였으며, 1 mg L⁻¹의 농도에서는 모든 배아가 치사되었다 (Fig. 2).

3. Pb 농도에 따른 기형을 조사

기형율의 경우 두꺼비와 청개구리, 참개구리의 경우 0.05 mg L⁻¹, 무당개구리는 0.025 mg L⁻¹의 농도에서 기형이 관찰되기 시작하였으며, 0.25 mg L⁻¹의 농도에서는 각각 23.3,

35.7, 17.9, 21.4% 배아에서 기형이 관찰되었다. 청개구리, 참개구리, 무당개구리의 경우 0.5 mg L⁻¹의 농도에서 100.0%의 비율로 기형이 관찰되었으며, 두꺼비는 0.75 mg L⁻¹에서 모든 배아가 기형을 나타냈다(Fig. 3)

4. Pb 농도에 따른 기형 양상 조사

두꺼비에서 나타난 기형 양상은 0.25 mg L⁻¹에서는 척추 기형 (28.6%), 꼬리기형 (42.9%), 복부기형 (14.3%), 복합기형

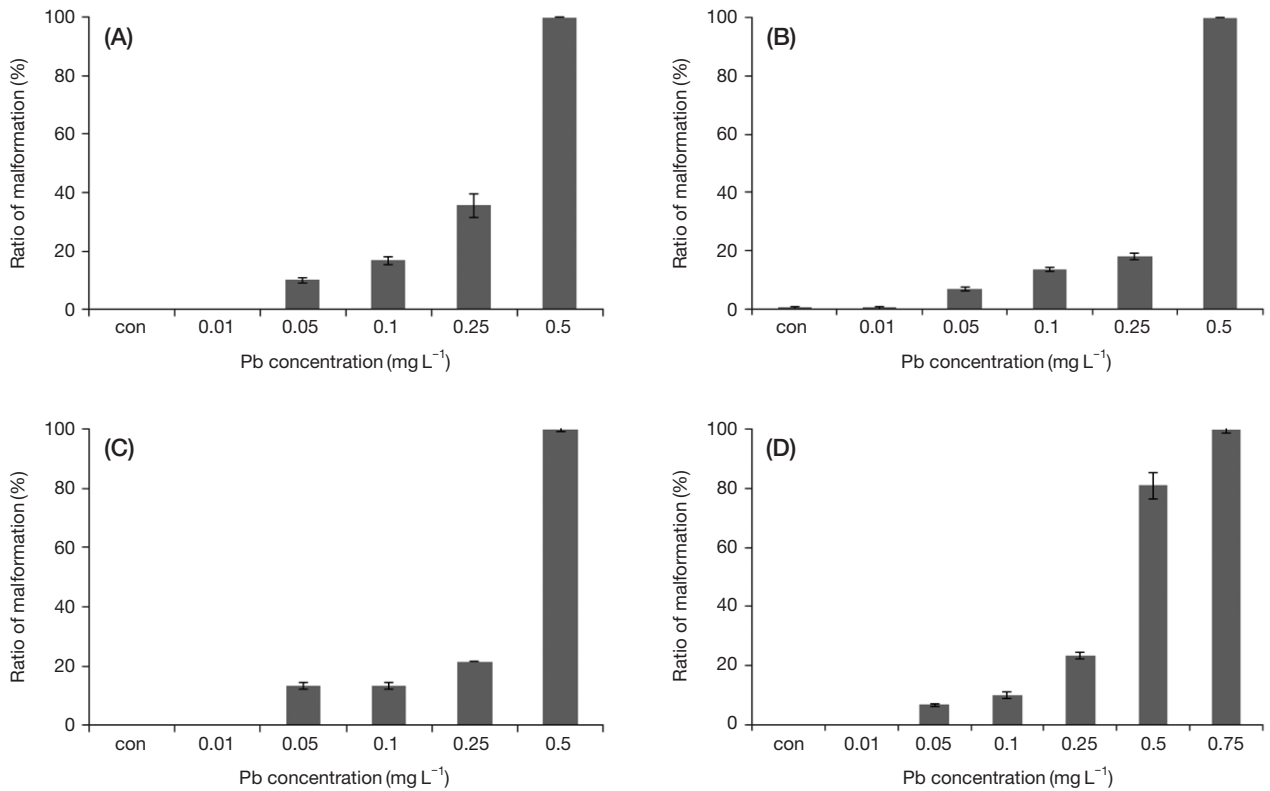


Fig. 3. Frequencies of malformation ratio according to the Pb treated concentration. (A) *H. japonica*, (B) *R. nigromaculata*, (C) *B. orientalis*, (D) *B. gargarizans*. Bar height represents a malformation ratio, and the error bars indicate the standard deviation.



Fig. 4. External morphology of *B. gargarizans* (A, middle: abdominal, lower: propound), *H. japonica* (B, middle: abdominal, lower: propound), *R. nigromaculata* (C, middle: spine, lower: propound), *B. orientalis* (D, middle: head, lower: propound) tadpoles exposure to Pb at the gastrula stage. Arrow indicate anomalies. Scale bars = 1 mm (upper: control, middle and lower: malformation).

(14.3%)이 나타났다. 청개구리의 경우 0.1 mg L^{-1} 에서는 복부기형 (20.0%), 머리기형 (80.0%)이 나타났으며, 참개구리는 0.05 mg L^{-1} 에서는 꼬리기형 (50.0%), 머리기형 (25.0%), 복합기형 (25.0%)이 나타났다. 무당개구리에서는 0.1 mg L^{-1} 에서는 복부기형 (50.0%), 머리기형 (50.0%)이 나타났으며, 모든 배아에서 기형이 관찰된 $0.5, 0.75 \text{ mg L}^{-1}$ 에서는 복합기형 (100.0%)이 나타났다 (Figs. 4, 5).

5. Pb 농도에 따른 성장률 조사

성장률 조사 측정에 사용된 대조군의 경우 30개체를 측정하였으며, 실험군의 경우 치사된 개체를 제외하고 측정을 실시하였다 (농도 (개체 수)). 두꺼비: 0.01 (30), 0.025 (30), 0.05 (30), 0.075 (30), 0.1 (30), 0.25 (30), 0.5 (21), 0.75 (2), 청개구리: 0.01 (30), 0.025 (30), 0.05 (30), 0.075 (30), 0.1 (30), 0.25

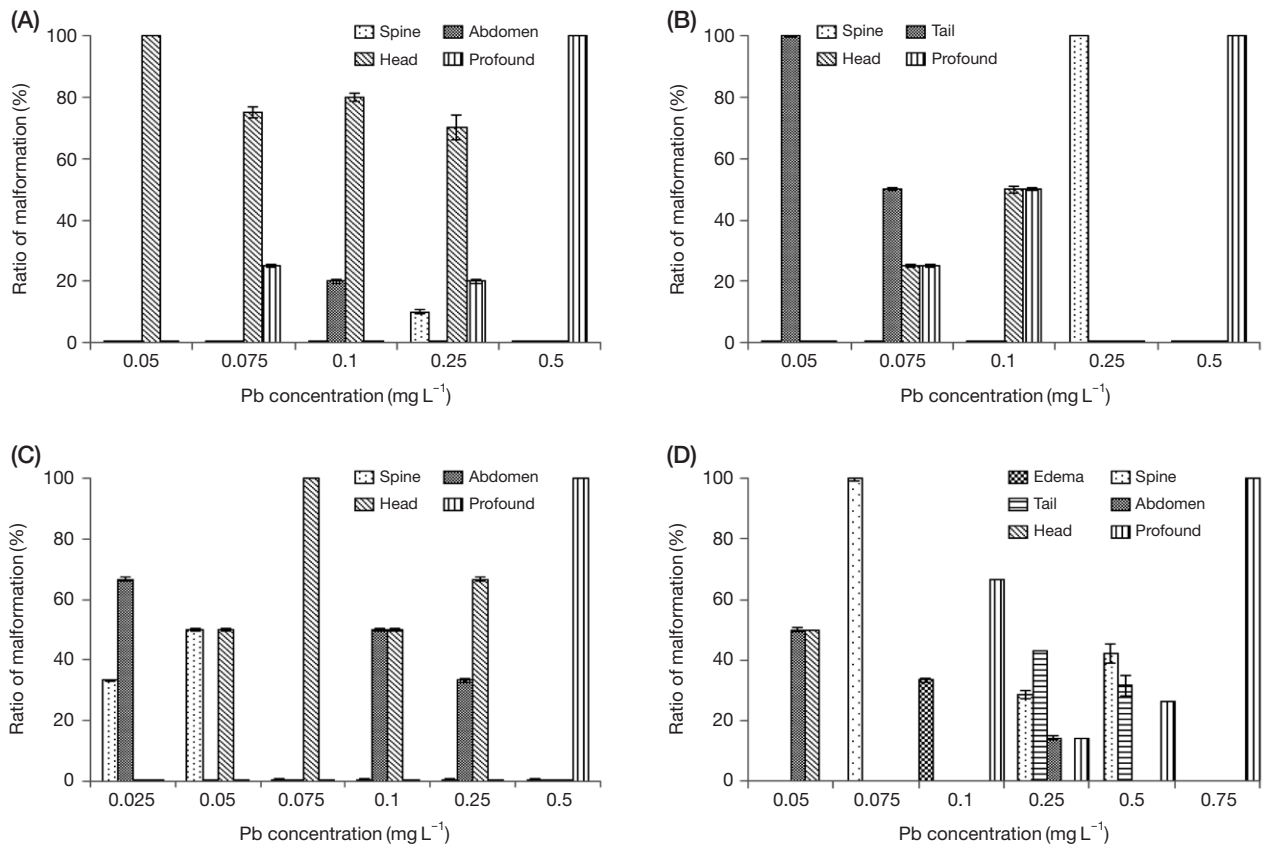


Fig. 5. Frequency of malformation patterns according to the Pb treated concentration. (A) *H. japonica*, (B) *R. nigromaculata*, (C) *B. orientalis*, (D) *B. gargarizans*. Bar height represents the malformation ratio, and the error bars indicate the standard deviation.

(28), 0.5 (11), 참개구리: 0.01 (30), 0.025 (30), 0.05 (30), 0.075 (30), 0.1 (30), 0.25 (28), 0.5 (17), 무당개구리: 0.01 (30), 0.025 (30), 0.05 (30), 0.075 (30), 0.1 (30), 0.25 (28), 0.5 (20)). 두꺼비 대조군의 경우 체장이 11.3 ± 0.7 mm, 청개구리 6.2 ± 0.5 mm, 참개구리 6.7 ± 0.3 mm, 무당개구리 11.5 ± 1.0 mm로 나타났으며, 0.25 mg L^{-1} 이하의 농도에서는 대조군과 거의 차이를 나타내지 않았으나 두꺼비의 경우 0.75 mg L^{-1} (5.3 ± 1.5 mm), 청개구리, 참개구리, 무당개구리의 경우 0.5 mg L^{-1} (4.2 ± 0.6 mm, 2.7 ± 1.0 mm, 7.5 ± 0.8 mm)의 농도에서 차이를 나타냈다. Independent t-test로 대조군과 실험군의 유의성을 분석한 결과 청개구리, 참개구리, 무당개구리 3종에서는 모두 0.5 mg L^{-1} 의 농도에서 $p < 0.01$ 의 결과를 나타내었으며, 두꺼비의 경우 0.75 mg L^{-1} 의 농도에서 차이를 나타냈다 (Fig. 6).

6. Pb에 의한 기형성 지수 조사

두꺼비, 청개구리, 참개구리, 무당개구리 LC_{50} 은 각각 0.58, 0.49, 0.52, 0.54 mg L^{-1} 로 나타났다. EC_{50} 은 각각 0.35, 0.27,

0.30 , 0.29 mg L^{-1} 로 나타났으며, 기형성 지수를 나타내는 TI는 각각 1.66, 1.81, 1.73, 1.86을 나타내었다 (Table 2).

고찰

본 연구를 통하여 두꺼비, 청개구리, 참개구리, 무당개구리 등 국내에 서식하는 무미양서류의 배아발달과정을 확인하고 배양방법을 확립할 수 있었으며 본 실험에 사용했던 개구리류의 배아 발달과정은 *R. pipiens* (Johnson and Volpe 1973; Mathews 1986) 및 *Xenopus laevis* (Deuchar, 1972)와 유사한 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

두꺼비, 청개구리, 참개구리, 무당개구리의 배아를 아가미순환 및 꼬리지느러미순환 단계까지 배양하면서 Pb의 효과를 조사한 결과 Pb의 농도가 증가함에 따라 배아의 치사율 및 기형율이 증가하는 양상을 나타냈다. 기형 양상은 0.025 mg L^{-1} 와 0.05 mg L^{-1} 의 농도에서는 주로 머리기형, 척추기형, 복부기형, 꼬리기형 등이 나타났으며 청개구리, 참개구

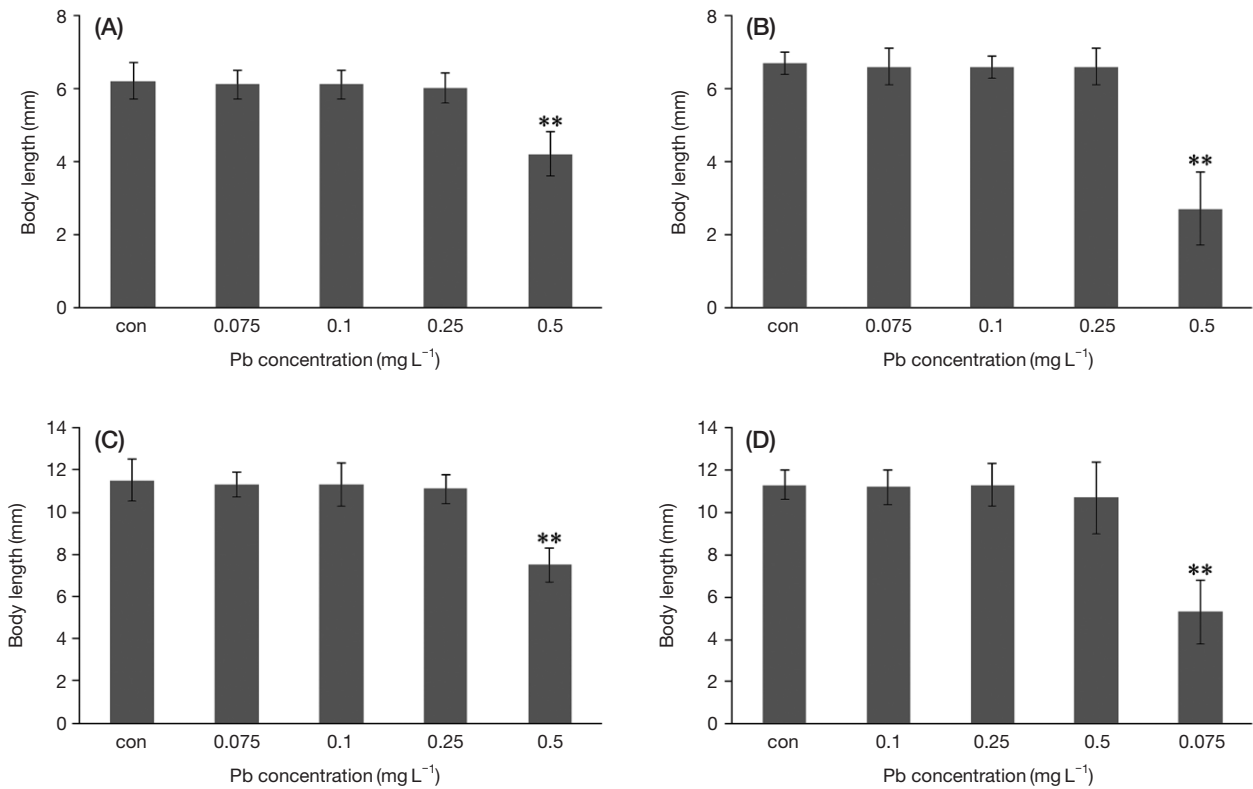


Fig. 6. Measured tadpole body length of exposure for each Pb level. *H. japonica* (A), *R. nigromaculata* (B), *B. orientalis* (C), *B. gargarizans* (D) embryos were cultured for 96 hours in a petri dish which contained 10 mL. Bar height represents the mean, and the error bars indicate the standard deviation. The asterisk indicates a significant difference (** $p < 0.01$, independent sample t-test).

Table 2. LC₅₀, EC₅₀ and TI value on each species (*H. japonica*, *R. nigromaculata*, *B. orientalis* and *B. gargarizans*) embryos exposed to Pb

Species	LC ₅₀ (mg L ⁻¹)			EC ₅₀ (mg L ⁻¹)			TI
	Exposure conc.	95% confidence limit		Exposure conc.	95% confidence limit		
		Lower	Upper		Lower	Upper	
<i>B. gargarizans</i>	0.58	0.52	0.65	0.35	0.30	0.43	1.66
<i>H. japonica</i>	0.49	0.43	0.55	0.27	0.22	0.34	1.81
<i>R. nigromaculata</i>	0.52	0.47	0.59	0.30	0.22	0.53	1.73
<i>B. orientalis</i>	0.54	0.48	0.61	0.29	0.25	0.36	1.86

리, 무당개구리는 0.5 mg L⁻¹의 농도에서 100%의 복합기형이 나타났으며 두꺼비는 0.75 mg L⁻¹의 농도에서 100.0%의 비율로 복합기형이 나타나 Pb의 농도가 증가함에 따라 복합적인 기형 양상이 나타남을 알 수 있었다.

한편, Pb의 농도에 따른 배아의 성장률을 조사한 결과 청개구리, 참개구리, 무당개구리의 경우 5 mg L⁻¹의 농도에서, 두꺼비의 경우 0.75 mg L⁻¹농도 대조군에 비해 현저하게 성장이 억제되어 나타났다. 이러한 현상들은 시험물질의 농도가 증가함에 따라 기형의 비율이 증가하면서 유생의 성장에 영향을 미친 것으로 판단되며, 북방산개구리 (*R. dybowskii*)의 배아를 납에 노출시켰을 때의 결과와 유사한 양상을 나

타냈다(Park 2007). 또한, Pb(NO₃)에 노출시킨 *B. arenarum*의 배아의 경우 1.0 mg L⁻¹ 이상의 농도에서 모든 배아가 치사하였으며 0.5 mg L⁻¹의 농도에서는 생존한 모든 배아가 기형을 나타내어 100.0%의 기형율을 나타냈다. 또한 꼬리기형, 수포형성기형, 척추기형, 체장 감소 등이 보고되었다(Pérez-Coll *et al.* 1988, 1990). 또한 Pb가 북방산개구리 (*R. dybowskii*)의 초기발생에 미치는 영향을 보면 1 mg L⁻¹ 이상의 농도에서는 난할의 정지현상이나 세포붕괴 현상이 나타났고 0.1 mg L⁻¹의 농도에서는 난할이 지연되었다(Ko and Lee 1999). *X. leavis*의 올챙이에 노출한 결과 100 mg L⁻¹의 농도에서는 24시간 후에 사망을 확인하였으며 50, 30, 10 mg

L⁻¹에 노출된 경우도 각각 48, 72, 96시간 만에 치사하기 시작했다. 1 mg L⁻¹에 노출된 *X. leavis*의 올챙이는 정상 대조군과 비교하였을 때 크기가 더 작아지고 유영 시 정상적이지 않았으며, 적혈구의 양이 현저히 낮아지는 강력한 빈혈의 징후를 보였다(Mouchet *et al.* 2007). 이러한 결과는 본 실험과 치사농도 및 기형율, 기형 양상, 체장 감소 등이 유사한 경향을 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한, 본 실험을 통해 산출된 기형성지수(TI)가 모두 1.5 이상을 나타내어 Pb에 노출된 4종의 양서류 배아에 강력한 기형성물질(Teratogen)으로 작용하며 기형성을 나타내는 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 한국산 4종의 무미양서류 배아들은 Pb의 농도가 증가함에 따라 치사률, 기형율, 기형 양상 및 성장률 등이 영향을 받아 비교적 낮은 농도에서 민감하게 반응하는 최기형성물질임을 알 수 있었으며, 광산의 폐석(287.4 µg g⁻¹, 266.0 µg g⁻¹, 1820.5 µg g⁻¹ 등, 평균 Shale의 납 함량: 20 µg g⁻¹) 및 도로 분진(강우 시 Total Pb 평균 42.7~56.1 µg L⁻¹) 등에 존재하는 중금속이 유출 및 강수 등을 통해 양서류의 번식지 및 산란지에 유입되어(Kim and Lee 2005; Kim *et al.* 2005; Lee *et al.* 2006) 무미양서류들에게 노출될 경우 배아의 발달과 성장의 저해 및 개체수 감소 현상 등이 야기될 것으로 판단된다. 이러한 Pb의 구체적인 작용양상을 규명하기 위해서는 더 많은 조사와 연구가 필요한 것으로 생각된다.

적 요

국내에 서식하는 대표적인 무미양서류 중 두꺼비(*Bufo gargarizans*), 청개구리(*Hyla japonica*), 참개구리(*Rana nigromaculata*) 및 무당개구리(*Bombina orientalis*)를 대상으로 각 종의 배아 발달에 미치는 Pb의 효과를 FETAX를 활용하여 분석한 결과 4종의 배아 모두 Pb의 농도가 증가함에 따라 사망률, 기형율이 증가하고 다양한 기형 양상이 나타났으며 성장률은 감소하였다. 두꺼비, 청개구리, 참개구리, 무당개구리의 반수치사농도(half maximal lethal concentration; LC₅₀)는 각각 0.58, 0.49, 0.52, 0.54 mg L⁻¹를 나타내었고 반수영향농도(half maximal effective concentration; EC₅₀)은 각각 0.35, 0.27, 0.30, 0.29 mg L⁻¹을 나타냈다. 기형성지수(teratogenic index; TI=LC₅₀/EC₅₀)는 두꺼비, 청개구리, 참개구리 및 무당개구리에서 각각 1.66, 1.81, 1.73, 1.86로 나타나 무당개구리가 가장 민감한 영향을 나타냈으며 다음으로 청개구리, 참개구리, 두꺼비 순으로 나타났다. 이는 서로 다른 종이 같은 농도의 오염물질에 노출되었다 하더라도 종에 따라 차이가 나타날 수 있음을 의미한다. 이상의 결과들

통해 Pb가 무미양서류 4종의 배아 발달에 기형성 물질로 작용함을 알 수 있었다.

REFERENCES

- ASTM. 1998. Standard guide for conduction the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX). ASTM standards on aquatic toxicology and hazard evaluation. American Society for Testing and Materials. pp. 457-467.
- Bantle JA, JN Dumont, RA Finch and G Linder. 1991. Atlas of abnormalities: A guide the performance of FETAX. Oklahoma State Publications Department. p. 71.
- Carr JA, A Gentles, EE Smith, WL Goleman, LJ Urquidi, K Thuett, RJ Kendall, JP Giesy, TS Gross, KR Solomon and GVD Kraak. 2003. Response of larval *Xenopus leavis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. Environ. Toxicol. Chem. 22:396-405.
- Dumont JN, TW Schultz, MV Buchanan and GL Kao. 1983. Frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX)-A short-term assay applicable to complex environmental mixtures. In Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures III. Springer US. pp. 393-405.
- Fonia O, R Weizman, E Zisman, R Ashkenazi and M Gavish. 1995. Down-regulation of hepatic peripheral-type benzodiazepine receptors caused by acute lead intoxication. Eur. J. Pharmacol. 293:335-339.
- Goh EH and AW Neff. 2003. Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. Food Chem. Toxicol. 41:1501-1508.
- Gosner KL. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica 16:183-190.
- Johnson RE and EP Volpe. 1973. Patterns and experiments in developmental biology. In: Observation and experiments on the living frog embryo. WCB/McGraw-Hill. pp. 215-227.
- Karmarkar N, R Saxena and S Anand. 1986. Histopathological changes induced in rat tissues by oral intake of lead acetate. Environ. Res. 41:23-28.
- Kim HJ, BK Park, SH Kong, JY Lee, YS Ok and SH Jun. 2005. Fraction and geoaccumulation assessment index of heavy metals in abandoned mines wastes. J. Soil Groundw. Environ. 10:75-80.
- Kim LH and SH Lee. 2005. Characteristics of metal pollutants and dynamic EMCs in a parking lot and a bridge during storms. J. Korean Soc. Water Qual. 21:385-392.
- Ko SK and DP Lee. 1999. The effect of Hg, Pb, Cd on the

- developmental stages of frog embryos. Honam Univ. J. 20:541–550.
- Lee EJ, SO Ko, HM Kang, JK Lee, KH Lim, BS Lee and LH Kim. 2006. Washoff characteristics of metal pollutants in highways. J. Korean Soc. Water Qual. 22:128–133.
- Mathews WW. 1986. Atlas of descriptive embryology. Fourth Ed. Macmilan Pub. Co., NY. p. 54.
- Mouchet F, S Cren, C Cunienq, E Deydier, R Guilet and L Gauthier. 2007. Assessment of lead ecotoxicity in water using the amphibian larvae (*Xenopus laevis*) and preliminary study of its immobilization in meat and bone meal combustion residues. Biometals 20:113–127.
- Park YR. 2007. Effect of heavy metal on developmental stage of *Rana dybowskii* embryo. Dep. Biol. Graduate School. Honam Univ. pp. 7–28.
- Pérez-Coll CS, J Herkovits and A Salibián. 1988. Embryotoxicity of lead on *Bufo arenarum*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 41:247–252.
- Pérez-Coll CS and J Herkovits. 1990. Stage dependent susceptibility to lead in *Bufo arenarum* embryos. Environ. Pollut. 63:239–245.
- Sobotka JM and RG Rahwan. 1995. Teratogenesis induced by short- and long-term exposure of *Xenopus laevis* progeny to lead. J. Toxicol. Env. Health Part A 44:469–484.
- Vrskova D and H Modra. 2012. Evaluation of the developmental toxicity of 2-phenoxyethanol and clove oil anaesthetics using the Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus* (FETAX). Vet Med. 57:245–250.

Received: 21 September 2017

Revised: 14 December 2017

Revision accepted: 14 December 2017