

청개구리 배아를 활용한 화학물질의 독성평가 연구<sup>1</sup>고선근<sup>2</sup>Toxicity Evaluation of Chemicals using Tree Frog Embryos, *Hyla japonica*<sup>1</sup>Sun-Kun Ko<sup>2</sup>

## 요약

국내에 서식하는 개구리의 배아를 이용하여 화학물질의 독성평가에 대한 가능성을 파악하기 위해 FETAX(Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*) 기법에 따라 청개구리(*Hyla japonica*)의 배아를 배양하면서  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole의 효과를 probit 분석법으로 조사하였다. 그 결과,  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole의 농도에 의존하여 유생의 체장 길이는 감소하고 치사율과 기형율은 증가하였으며  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole의 teratogenic concentration( $\text{EC}_{50}$ )은 각각 0.05, 5.0mg/L 을 나타내었고 embryo lethal concentrations( $\text{LC}_{50}$ )은 0.16, 39.1mg/L 을 나타내었다. Teratogenic index( $\text{TI}=\text{LC}_{50}/\text{EC}_{50}$ )는  $\text{Cu}^{2+}$ 의 경우 3.0, Tebuconazole의 경우 7.7을 나타내어 청개구리 배아 발달에 최기형성 물질로 작용함을 알 수 있었다. 이상의 결과들로 보아  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole 모두 낮은 농도에서 청개구리 배아의 발달에 민감하게 반응하였으며 다량의 배아 확보가 가능하였고 배양이 용이하였으며 치사율, 기형율, 성장률, 기형양상 등이 기존의 연구들과 비교하였을 때 유사한 결과를 나타내어 청개구리 배아를 활용한 시험기법은 화학물질 및 환경오염물질의 독성검정에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

주요어:  $\text{Cu}^{2+}$ , Tebuconazole, 기형성, *Hyla japonica*

## ABSTRACT

In this experiment, I investigated toxicity evaluation of chemicals using domestic frog embryos, along FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*) protocol. I investigated  $\text{Cu}^{2+}$  and Tebuconazole effect on the tree frog, *Hyla japonica*, embryos by probit analysis. Mortality and malformation rates increased and larval body length decreased depending on the concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  and Tebuconazole. The teratogenic concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) of  $\text{Cu}^{2+}$  and Tebuconazole were 0.05, 5.0mg/ℓ, respectively and the embryo lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ ) of  $\text{Cu}^{2+}$  and Tebuconazole were 0.16, 38.5, respectively. The teratogenic index (TI) appeared 3.0 in  $\text{Cu}^{2+}$  and 7.7 in Tebuconazole, which showed teratogenicity in embryonic development of *Hyla japonica*. These results reveal that  $\text{Cu}^{2+}$  and Tebuconazole in this experiment suppressed the development of embryos at relatively low concentration. Much of *Hyla japonica* embryos can be secured, and easy to incubate. In addition, mortality, malformation ratios, malformation patterns and growth rates are similar to the results from the other assay systems. Therefore, the *Hyla japonica* embryo teratogenesis assay system could be a useful tool to evaluate toxicity of pollutants in environment.

**KEY WORDS:**  $\text{Cu}^{2+}$ , **TEBUCONAZOLE**, **TERATOGENICITY**, *Hyla japonica*

1 접수 2012년 7월 25일, 수정(1차: 2012년 9월 12일), 게재확정 2012년 9월 13일

Received 25 July 2012; Revised(1st: 12 September 2012); Accepted 13 September 2012

2 호남대학교 생물학과 Department of Biology, Honam University, Gwangju(506-714), Korea(sunkun@honam.ac.kr)

\* 교신저자 Corresponding author(sunkun@honam.ac.kr)

## 서론

최근 새로운 화학물질들이 다양하게 개발되어 그 종류와 사용량이 급증하고 있다. 이러한 화학물질이나 이들로 인해 오염되어진 환경매체들이 인간을 비롯한 생물체에 미치는 환경 유해성을 평가 할 수 있는 시험법 개발은 필수적이라 하겠다. 이러한 화학물질류들의 환경 유해성 평가를 할 수 있는 시험법으로 현재 물벼룩 독성시험(Bernot *et al.*, 2005; Movahedian *et al.*, 2005), 어류치사율 시험(Doleželová *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2011), 포유동물의 급성 및 만성 시험법(Stout *et al.*, 2009; Korani *et al.*, 2011) 등이 활용되어지고 있으나 시험에 사용되어지는 실험 동물량을 최소화 하면서 보다 신속하고 간편하며 활용이 용이한 시험기법이 요구되어지고 있다. 국제적으로 공인된 시험법으로 개구리의 배아를 활용하여 화학물질에 대한 독성평가와 환경오염물질의 독성에 의한 기형유발 시험법으로 Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus(FETAX) 방법이 널리 사용되어지고 있다(Fort *et al.*, 1988; Bantle *et al.*, 1990; Presutti *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1996). FETAX 기법은 남아프리카산 개구리의 수정란에서 배아단계를 거쳐 올챙이로의 발달 단계를 활용하는 활용성이 매우 높은 시험기법으로 알려져 있다(Bantle *et al.*, 1996). 이러한 FETAX 기법에 따라 최근 다른 여러 나라에서는 그 나라에 서식하는 개구리들의 배아를 활용하여 토착생물을 모델로 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 하는 연구는 많지 않다(Kang *et al.*, 2004; Ko, 2006). 따라서 본 연구에서는 국내에 서식중인 개구리 중 전국적으로 분포지역이 가장 넓고 다른 종에 비해 채집이 용이한 청개구리(*Hyla japonica*)를 대상으로하여 배아의 정상발달체제를 확립하고 청개구리 배아의 발달 단계를 이용하여 FETAX 기법에 따라 기형유발물질로 알려진  $Cu^{2+}$ 와 농약류인 Tebuconazole에 의한 최기형성 등의 독성을 평가할 수 있는가의 여부를 판단하고 이를 토대로하여 화학 물질 및 환경오염물질의 효과를 평가할 수 있는 기법을 확보하여 화학물질 및 환경매체의 유해성을 평가하는 기법으로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험동물

시험에 사용했던 청개구리는 2012년 5월~6월까지 광주광역시 서봉동 일대 및 전라남도 담양군 수북면 일대에서 번식 시기에 포집 중인 청개구리 암·수 30쌍을 직접 채집하

여 사용하였다.

### 2. 배양액 제조

Amphibian Ringer 용액(AR; 6.6g/L NaCl, 0.15g/L KCl, 0.15g/L  $CaCl_2$ , 0.2g/L  $NaHCO_3$ , 0.05g/L Streptomycin, 0.03g/L Penicillin G)을 제조하여 pH 7.4로 맞추어 사용하였다.

### 3. 수정란 채취 및 배양

포집중인 청개구리 암·수를 채집하여 실험실에서 자연 배란 및 수정과정에 의해 2세포의 배아들이 출현하기 시작하면(Johnson and Volpe, 1973; Mathews, 1986) 2세포 배아들 중 세포질들이 정확히 나누어져 균일한 할구들을 가진 배아들을 선택하여 예리한 포셀로 젤리층을 제거하고  $24 \pm 1^\circ C$ 에서 포배기까지 배양하여 시험에 사용하였다.

### 4. 정상발생과정 조사

직경 100 mm의 유리 배양접시에 시험물질이 첨가되지 않는 배양액 60 ml에 30개의 배아를 배양하면서 2세포에서 올챙이의 꼬리지느러미 순환시기까지 진행되는 정상발생과정과 각 발생단계에 소요되는 시간 등을 조사하였다. 배양과정 중 24시간마다 새로운 배양액으로 교환하면서 배양하였다.

### 5. 시험물질 처리

배아의 발달에 미치는 영향을 보기 위해 사용했던  $Cu^{2+}$ 은 1,000 ppm Stock solution(KANTO Chem.)을 구입하여 사용하였으며 Tebuconazole(농업진흥청 제공)은 DMSO에 녹여 1,000ppm Stock solution으로 제조한 후 이를 AR용액으로 희석하여 사용하였다. 유리 배양접시에 시험물질이 농도별로 포함된 실험군과 시험물질이 포함되지 않는 대조군의 배양액 10 ml에 포배기까지 배양된 배아들을 각 농도별로 30개씩 넣고  $24 \pm 1^\circ C$ 의 온도에서 96시간 배양하였다. 24시간마다 새로운 용액으로 교환하였으며 시험물질의 농도는 5개 이상으로 정하여 실시하였고 모든 농도구간에 대해 각기 다른 개체에서 채취한 배아들을 사용하여 3회 이상 반복 시험하였다.

### 6. 결과처리 및 분석

각 농도별 사망률은 24시간마다 관찰하여 죽은 것을 제

거하고 96시간 후 생존된 것을 3% Formalin에 고정하고, 이들 고정된 개체들을 대상으로 기형 개체 수 및 양상을 조사하였다. 그 결과들을 (죽은개수/노출개수)×100으로 계산하여 한 농도의 사망률을 구하였다. 기형율은 96시간 배양후 생존한 올챙이를 개체당 머리, 복부 및 꼬리 등 각 부위별로 기형 여부를 조사하였다. 정상적인 Tadpole의 범위에서 벗어나면 기형으로 판정하였으며 96시간 후 생존한 개체 중 (영향을 받은 개수/영향을 받지 않은 개수)×100으로 계산하여 한 농도의 기형율을 구하였다. 사망률과 기형율 값을 대상으로 Probit analysis Program을 활용하여 LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>을 구하였으며 아울러 96h LC<sub>50</sub> 값을 96h EC<sub>50</sub> 값으로 나누어 Teratogenic Index(TI)를 구하여 TI 값이 1.5 이상이 되면 유해성이 있는 물질로 판정하였다(Bantle and Courchesne, 1985). 기형의 종류는 정상발생 올챙이를 기준으로 올챙이 꼬리가 과상을 나타내는 양상, 꼬리가 휘어지는 양상 등을 관찰하여 꼬리기형으로 판정하였고 복부의 돌출현상 등을 관찰하여 복부기형으로 판정하였다. 또한 몸 전체에 형성된 수포(물집)의 형성을 관찰하여 수포형성기형(Edema)으로 판정하였다(Bantle et al., 1998). 배아의 발달과정과 시험물질이 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 AM-423x와 Dinocapture 2.0 프로그램(ANMO)을 사용하여 배아의 직경 및 유생의 머리끝부터 꼬리 끝까지의 전 체장의 길이를 측정하였다.

## 결 과

### 1. 배아발달과정

포접중인 암컷 10개체에서 자연배란된 난자는 평균 600~700개 정도였으며 난자의 직경은 1.2±0.1mm 정도였다. 2세포기 배아는 수정 후 대략 1시간 30분 이내에 나타나기 시작하여 32세포기까지 25분 간격으로 유사분열이 진행되었으며 그 크기는 직경이 1.2±0.1mm 정도였다. 이후 배아는 비슷한 크기로 난황이 되면서 할구의 수가 많은 상실배까지는 6시간이 소요되었으며 포배기까지는 7시간 40분정도 소요되었다. 시험에 사용했던 포배기(blastula)의 배아는 수정 후 대략 13시간 30분 이내에 나타나기 시작하였으며 이들 배아의 직경은 1.2±0.1mm 정도의 크기를 나타내었다. 이들 배아의 크기는 초기 낭배시기부터 점차적으로 커가기 시작해 이후 신경관(neural plate), 신경습(neural fold), 신경관(neural tube) 등을 형성하는 기관형성(organogenesis)단계에서는 그 크기가 다소 증가하여 1.5±0.1mm 정도의 크기를 나타냈으며 수정이후 신경관이 완성되는 시기까지 대략 26시간 40분 정도를 필요로 했다. 올챙이의 기본 형태를 갖춘 미아시기에는 배아의 크기가 급격하게 증가하여 전장의 길이는 2.1±0.1mm 정도의 크기를 나타내었으며 수정 후 대략

36시간 정도가 소요되었다. 현미경 시야에서 올챙이의 운동성을 관찰해 볼 수 있는 근육반응 시기에는 배아의 전장이 2.3±0.1mm 정도였으며 수정 후 대략 43시간 30분 정도에서 나타나기 시작하였다. 이후 미아가 신장하기 시작하여 신경관, 척색, 체절성 중배엽을 가진 구조를 형성하는 심장박동시기를 거쳐 머리부분과 꼬리부분이 뚜렷하게 구분되어지고 올챙이의 곁아가미가 나타난 시기에서는 그 전장의 길이가 4.8±0.3mm 정도였으며 62시간 정도가 소요되었다. 올챙이가 헤엄치며 이동하는 꼬리지느러미 순환시기에는 그 전장이 5.4±0.4mm 정도이고 수정 후 대략 74시간이 소요되었으며 아가미구멍에 의해 열려있는 점막의 주름을 갖는 아가미 뚜껑주름시기의 전장길이는 6.2±0.2mm 정도이며 수정 후 대략 110시간 정도가 필요했다(Figure 1).

### 2. 청개구리 배아 발달에 미치는 Cu<sup>2+</sup>의 효과

청개구리의 배아 발생에 미치는 Cu<sup>2+</sup>의 효과를 알아보기 위해 청개구리의 포배기의 배아들을 Cu<sup>2+</sup>이 첨가되지 않는 대조군과 Cu<sup>2+</sup> 0.001, 0.01, 0.025, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5, 10mg/L를 각각 처리하여 96시간 배양 후 배아들에게 나타난 치사율, 기형율, 기형의 종류 등을 조사하였다. 0.075 mg/L에서 8%의 죽는 배아들이 나타났으며 0.1, 0.25 mg/L로 농도가 높아지면서 16%, 72%로 이들의 비율도

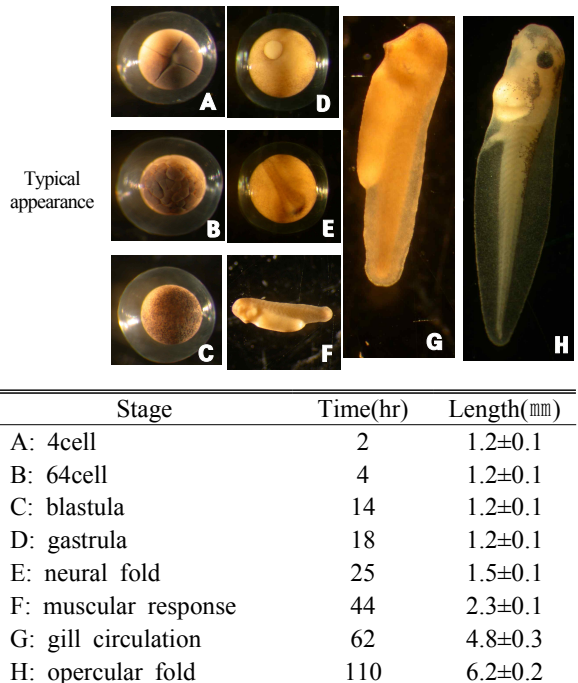


Figure 1. Embryonic development of the frog, *Hyla japonica*

증가하였다(Figure 2. A). 기형은 0.01 mg/L에서부터 28% 배아들에서 나타나기 시작하였으며 기형율도 0.075, 0.1, 0.25mg/L으로 농도가 높아지면서 41%, 57%, 92%로 그 비율이 증가하였다(Figure 2. B). 청개구리의 배아에 대한 Cu<sup>2+</sup>의 LC<sub>50</sub>은 0.16을 나타내었고 EC<sub>50</sub>은 0.05를 나타내었으며 TI는 3.0을 나타내었다(Table 1). Cu<sup>2+</sup>의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 꼬리기형, 복부기형, 머리기형, 복합기형 등을 나타내었으며 꼬리기형의 비율이 다른 기형 종류에 비해 높았다. 이들의 비율을 농도별로 살펴보면 LC<sub>50</sub>을 나타내는 농도보다 낮은 0.01, 0.025mg/L는 머리기형의 비율이 높았으나 LC<sub>50</sub>과 가까운 농도인 0.1, 0.25 으로 농도가 높아지면

서 복합기형의 비율이 높게 나타났다(Figure 2. C).

배아의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 대조군(6.9±0.3 mm)에 비해 Cu<sup>2+</sup>의 농도가 0.075, 0.1, 0.25mg/L로 증가함에 따라 유생의 체장은 6.2±0.8, 5.9±0.5, 5.3±0.9mm로 감소하여 나타났다(Figure 2. D).

3. 청개구리 배아 발달에 미치는 Tebuconazole의 효과

청개구리의 배아 발생에 미치는 Tebuconazole의 효과를 알아보기 위해 Tebuconazole이 첨가되지 않는 대조군과 Tebuconazole 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 mg/L를

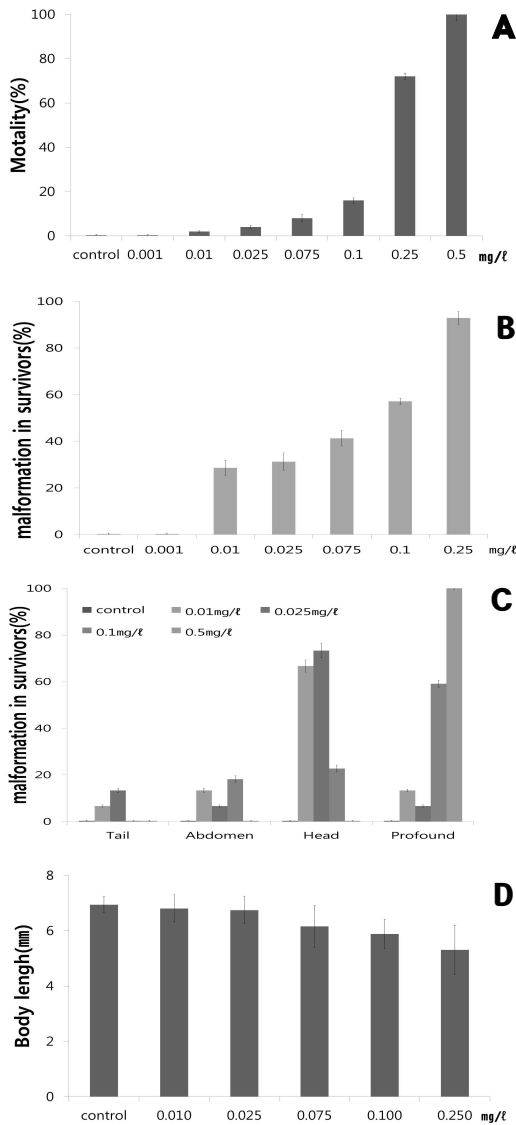


Figure 2. Percent of the mortality(A), malformation (B), pattern of malformation(C) and body length(D) in Cu<sup>2+</sup>-treated *Hyla japonica* embryo

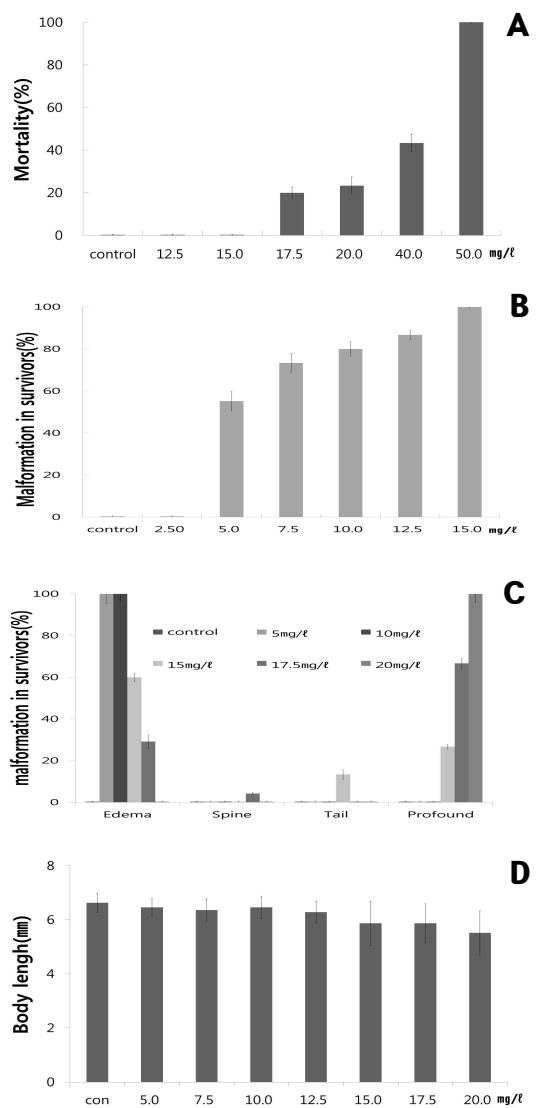


Figure 3. Percent of the Mortality(A), malformation (B), pattern of malformation(C) and body length(D) in Tebuconazole-treated *Hyla japonica* embryo

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

	Exposure time(hr)	LC <sub>50</sub> (mg/l)	EC <sub>50</sub> (mg/l)	TI (LC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )
Heavy Metal				
Cu <sup>2+</sup>	96	0.16	0.05	3.0
Pesticide				
Tebuconazole	96	38.5	5.0	7.7

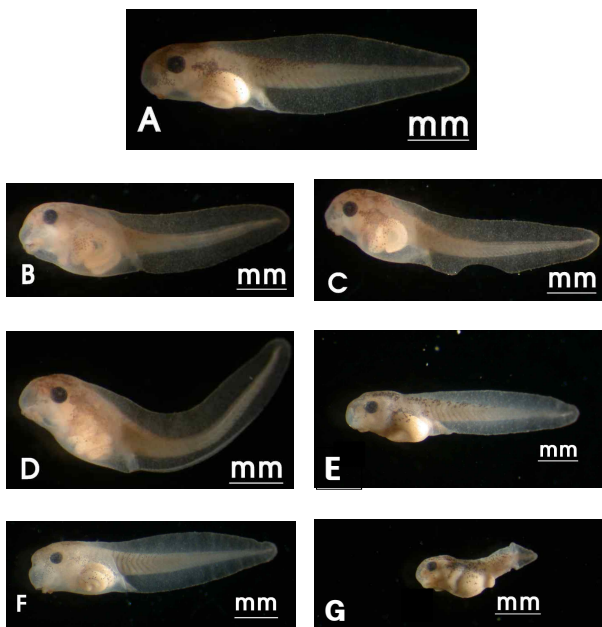


Figure 4. Tadpoles of *Hyla japonica* exposure to Cu<sup>2+</sup> or Tebuconazole at the gastrula stage  
 (A) *Hyla japonica* tadpole of control approximately 110h after fertilization  
 (B) *Hyla japonica* tadpole after 96h exposure to 10.0mg/L Tebuconazole displaying wave edema  
 (C) *Hyla japonica* tadpole after 96h exposure to 12.5mg/L Tebuconazole displaying flexure of the tail  
 (D) *Hyla japonica* tadpole after 96h exposure to 17.5mg/L Tebuconazole displaying spine  
 (E) *Hyla japonica* tadpole after 96h exposure to 0.1mg/L Cu<sup>2+</sup> displaying abdominal abnormality  
 (F) *Hyla japonica* tadpole after 96h exposure to 0.01mg/L Cu<sup>2+</sup> displaying head abnormality  
 (G) *Hyla japonica* tadpole after 96h exposure to 0.075mg/L Cu<sup>2+</sup> displaying severe profound

각각 처리하여 96시간 배양 후 배아들에게 나타난 치사율, 기형율, 기형의 종류, 체장 등을 조사하였다. 5 mg/L에서부터 죽는 배아들이 3%의 비율로 나타나기 시작하였으며 17.5, 20 mg/L으로 농도가 높아지면서 이들의 비율도 20, 23%로 증가하였다(Figure 3. A). 기형은 5 mg/L에서부터 55%의 배아들에서 나타나기 시작하였으며 기형율도 7.5, 10, 12.5, 15 mg/L으로 농도가 높아지면서 그 비율이 73, 80, 87, 100%로 증가하였다(Figure 3. B). 청개구리의 배아에 대한 Tebuconazole의 LC<sub>50</sub>은 38.5를 나타내었고 EC<sub>50</sub>은 5.0를 나타내었으며 TI는 7.7을 나타내었다(Table 1). Tebuconazole의 영향에 의해 나타난 기형의 종류는 대부분 수포형성기형, 복합기형 등을 나타내었으며 수포형성기형의 비율이 다른 기형 종류에 비해 높았다. 이들의 비율을 농도별로 살펴보면 LC<sub>50</sub>을 나타내는 농도보다 낮은 5 mg/L의 농도에서는 수포형성기형의 비율이 높았고 LC<sub>50</sub>과 가까운 농도인 20 mg/L으로 농도가 높아지면서 수포형성기형의 비율 보다 복합기형의 비율이 높게 나타났으며 꼬리기형과 척추기형은 그 비율이 매우 낮게 나타났다(Figure 3. C). 배아의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 대조군(6.6±0.4mm)에 비해 Tebuconazole의 농도가 12.5, 20mg/L로 증가함에 따라 유생의 체장은 6.3±0.3, 5.5±0.8mm로 감소하여 나타났다(Figure 3. D).

### 고찰

청개구리는 전국에 널리 분포하며 10~11월경 동면에 들어가고 3~4월부터 동면에서 깨어나 활동하기 시작해 곧바로 번식에 접어들어 물이 고인 농경지일대에 산란하며 6~7월 사이에 번식을 한다(Yang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2011). 본 연구에서 청개구리의 자연배란 및 수정란의 채취와 배아의 배양을 통하여 발생과정을 확인하고(Figure 1) 배양조건 등을 확립 할 수 있었다. 청개구리의 수정란에서 배아단계로 거쳐 올챙이 상태로의 발달단계는 *Rana pipiens*(Johnson and Volpe, 1973; Mathews, 1986) 및 *Xenopus laevis*(Deuchar, 1972)와 거의 유사한 경향을 나타내었다. 암컷 청개구리 1개체에서 배란되어진 난자는 약 600~700개 정도였으며 이들 대부분이 수정이후 난할과정이 진행되는 배아로 변화되어져 시험에 활용 할 수 있는 균일화된 다량의 배아확보가 가능하고 배양이 용이하여 화학물질의 독성을 평가할 수 있는 좋은 시험재료로 사용되어질 수 있음을 확인하였다.

Cu<sup>2+</sup>의 효과를 시험한 결과 0.075mg/L에서 치사된 배아들이 나타나기 시작하였으며 0.5mg/L 이상의 농도에서는 모든 배아가 치사하였고 0.1, 0.25mg/L으로 농도가 높아지면서 치사된 배아들의 비율도 16%, 72%로 증가하여 나타났다. 또한 Tebuconazole의 시험결과 5mg/L에서부터 죽

는 배아들이 3%의 비율로 나타나기 시작하여 17.5, 20mg/L으로 농도가 높아지면서 20%, 23%로 비율도 각각 증가하여  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole 모두 농도에 의존하여 치사율이 증가하는 경향을 나타냈다. 체장의 경우  $\text{Cu}^{2+}$ 의 시험 결과 대조군( $6.9 \pm 0.3\text{mm}$ )에 비해 농도가 0.75, 0.1, 0.25mg/L로 증가함에 따라 유생의 체장은  $6.2 \pm 0.8$ ,  $5.9 \pm 0.5$ ,  $5.3 \pm 0.9\text{mm}$ 로 감소하였으며 Tebuconazole의 시험결과도 대조군( $6.6 \pm 0.4\text{mm}$ )에 비해 농도가 12.5, 20mg/L로 증가함에 따라 유생의 체장은  $6.3 \pm 0.3$ ,  $5.5 \pm 0.8\text{mm}$ 로 감소하여 나타났다. 시험물질의 농도 증가에 따라 치사율이 증가하고 체장의 길이가 짧아지는 이러한 현상들은 시험에 사용했던  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole 모두 청개구리 배아 성장에 유해하게 작용한 결과로 해석되어지며  $\text{Cu}^{2+}$ 가 *Xenopus laevis*의 배아발달에 미치는 효과는  $\text{LC}_{50}$ ,  $\text{EC}_{50}$ , TI가 각각 22, 2.5, 8.8  $\mu\text{mol/L}$ 로 본 실험과 유사한 경향을 나타내었으며(Luo *et al.*, 1993) 또한 Tebuconazole이 *Xenopus laevis*의 배아발달에 미치는 효과는  $\text{LC}_{50}$ 이 82.35 $\mu\text{mol/L}$ 로 나타났으며 농도 증가에 따른 체장의 길이가 감소하는 등 본 실험과 유사한 경향을 나타내었다(Hwang *et al.*, 2010).

화학물질의 독성 판정을 위한 주요 생물학적 판정지표인 기형율을 조사한 결과  $\text{Cu}^{2+}$ 의 경우 기형 개체는 0.01mg/L에서 나타나기 시작하여 농도가 증가할수록 기형율도 증가하였으며 Tebuconazole의 처리 결과 기형은 5mg/L에서부터 55%의 비율로 나타나기 시작하였고 기형율도 7.5, 10, 12.5, 15mg/L으로 농도가 높아지면서 그 비율도 73%, 80%, 87%, 100%로 각각 증가하였다. 기형율도 성장률과 유사하게  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole 모두 농도에 의존하여 증가하는 경향을 나타내어 참개구리 배아 발달과정에 기형을 유발하는 것으로 해석되어지며 이러한 현상은 선행되어진 *Litoria adelaidensis*, *Crinia insignifera*의 결과들은 Australian frog를 활용하여 nonylphenol ethoxylate에 노출된 *Litoria adelaidensis*와 *Crinia insignifera*의  $\text{LC}_{50}$ ,  $\text{EC}_{50}$ , MCIG는 각각 9.2, 8.8, 5.1-6.0mg/L, 6.4, 4.5, 4.0mg/L을 나타내었으며 TI는 1.0, 1.6을 나타내었고 농도에 따라 올챙이의 체장의 감소를 나타내어 본 실험의 결과들과 유사한 경향을 나타내었다(Mann and Bidwell, 2000). FETAX 기법을 적용한  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole에 의한 기형성지수(Teratogenic Index, TI)가 3.0, 7.7로 계산되었다. 이러한 기형성 지수는 1.5보다 값이 클 때 시험물질이 최기형성을 갖는 것으로 판단하게 된다(Bantle and Courchesne, 1985). 따라서  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole은 모두 청개구리 배아 발달에 최기형성 물질로 작용하는 것으로 나타났으며 TI값이  $\text{Cu}^{2+}$ 에 비해 Tebuconazole이 약 2배 높은 값을 나타내어 이는 Tebuconazole이 보다 강력한 최기형성 물질임을 시사하고 있다. 한편,  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole의 영향에 의해 나타

난 기형의 종류는  $\text{Cu}^{2+}$ 의 경우 꼬리기형, 복부기형, 머리기형, 복합기형 등이 나타났고 Tebuconazole의 경우 수포형성기형, 척추기형, 꼬리기형, 복합기형 등이 나타났으며 이들은  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole의 농도에 의존하여 그 비율도 증가하였다. 이러한 결과들은 국내산 개구리인 무당개구리(*Bombina orientalis*) 배아, 북방산개구리(*Rana dybowskii*)의 배아 발달에 화학물질을 처리하여 나타난 기형의 종류와 유사한 경향을 나타내었다(Kang *et al.*, 2004; Ko, 2004).

이상의 결과들로 보아  $\text{Cu}^{2+}$ 과 Tebuconazole 모두 낮은 농도에서 치사율, 기형율, 기형양상, 성장률 등이 농도증가에 의존하여 배아의 발달 과정에 민감하게 반응하였으며 각각의 문헌상 자료와 비교하였을 때 거의 유사한 결과를 나타내어 청개구리 배아를 활용한 화학물질의 독성시험기법은 신뢰성을 확보한 것으로 사료되어지며 화학물질 및 환경오염물질의 독성검정에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

## 인용문헌

- Bantle, J.A., J.N. Dumont, R.A. Finch and G. Linder(1998) Atlas of Abnormalities: a Guide for the Performance of FETAX. Oklahoma State University, 72pp.
- Bantle, J.A., R.A. Finch, D.T. Burton, D.J. Fort, D.A. Dawson, G. Linder, J.R. Rayburn, M. Hull, M. Kumsher-King, A.M. Gaudet-Hull and S.D. Turley(1996) FETAX interlaboratory validation study: phase III--part I testing. J. Appl. Toxicol. 16: 517-530.
- Bantle, J.A., D.J. Fort, J.R. Rayburn, D.J. Deyoung and S.J. 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, J.A. and C.L. 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.
- Bernot, R.J., M.A. Brueseke, M.A. Evans-White and G.A. Lamberti(2005) Acute and Chronic Toxicity of Imidazolium-Based Ionic Liquids on *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 24(1): 87-92.
- Deuchar, E.M.(1972) *Xenopus laevis* and Developmental Biology. Biological Reviews 47: 37-112.
- Doleželová, P., S. Mácová, V. Pištěková, Z. Svobodová, I. Bedáňová and E. Voslášková(2008) Comparison of the sensitivity of *Danio rerio* and *Poecilia reticulata* to silver nitrate in short-term tests. interdisc Toxicol. 1(2): 200-202.
- Fort, D.J., D.A. Dawson and J.A. Bantle(1988) Development of amebiotic activation system for the frog embryo teratogenesis

- assay *Xenopus*(FETAX). Teratog. Carcinog. Mutagen 8: 251-264.
- Gutleb, A.C., J. Appelman, M.C. Bronkhorst, J.H.J. van den Berg, A. Spenkeliink, A. Brouwer and A.J. Murk(1999) Delayed effects of pre-and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species(*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). Environmental Toxicology and Pharmacology 8: 1-14.
- Hwang, Y.G., M.J. Lee, Y.H. Lee, S.W. Cheong and C.S. Yoon(2010) Toxic Effects of Fungicide Tebuconazole on the Early Development of African Clawed Frog, *Xenopus laevis*. Journal of the Environmental Sciences 19(8): 1,001-1,012. (in Korean with English abstract)
- Johnson, R.E. and E.P. Volpe(1973) Patterns and Experiments in developmental biology. In: Observation and experiments on the living frog embryo. WM. C. Brown Co. 7-9, pp. 215-227.
- Kang, H.S., M.C. Gye, J.S. Lee, Y.D. Yoon and M.K. Kim(2004) Effects of Alachlor and Endosulfa on the Survival and Malformation of *Bombina orientalis* Embros. Korean J. Environ. Biol. 22(2): 300-307. (in Korean with English abstract)
- Ko, S.K.(2006) Effect of Cd<sup>2+</sup> on the Oocyte Maturation and Developmental Stages of Brown Frog Embryo, *Rana dybowskii* in vitro. Kor. J. Env. Eco. 20(3): 345-351. (in Korean with English abstract)
- Korani, M., S.M. Rezayat, K. Gilani, S. Arbabi Bidgoli and S. Adeli(2011) Acute and subchronic dermal toxicity of nano-silver in guinea pig. International Journal of Nanomedicine 6: 855-862.
- Luo, S.Q., M.C. Plowman, S.M. Hopfer and F.W. Sunderman Jr.(1993) Embryotoxicity and teratogenicity of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> for *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure. Ann Clin Lab Sci. 23(2): 111-120.
- Mann, R.M. and J.R. Bidwell(2000) Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. Aquatic Toxicology. 51: 19-29.
- Mathew, W.W.(1986) Atlas of descriptive embryology. Forth Ed. Macmillan Pub. Co., New York, 54pp.
- Morvahedian, H., B. Bina and G.H. Asghari(2005) Toxicity Evaluation of Wastewater Treatment Plant Effluents Using *Daphnia magna*. Iranian J Env Health Sci Eng. 2(2): 1-4.
- Morgan, M.K., P.R. Scheuerman, C.S. Bishop and R.A. 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.
- Richter, C.A., N. Garcia-Reyero, C. Martyniuk, I. Knoebl, M. Pope, M.K. Wright-Osment, N.D. Denslow and D.E. Tillitt(2011) Gene Expression Changes in Female Zebrafish(*Danio rerio*) Brain in Response to Acute Exposure to Methylmercury. Environ Toxicol Chem. 30(2): 301-308.
- Stout, M.D., A. Nyska, B.J. Collins, K.L. Witt, G.E. Kissling, D.E. Malarkey and M.J. Hooth(2009) Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies of Chromium Picolinate Monohydrate Administered in Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice for 2 Years. Food Chem Toxicol. 47(4): 729-733.