

기온변화가 망월지 두꺼비유생 집단폐사에 미치는 영향

김구환* · 안승주¹ · 김수정¹ · 박희천²

대구보건대학교 방사선과, ¹대구보건대학교 임상병리과,
²경북대학교 조류생태환경연구소

Effect of Temperature on Mass Mortality of the Larval Toad (*Bufo bufo gargarizans*) in Mangwel Pond

Kgu Hwan Kim*, Seung Ju Ahn¹, Su Jung Kim¹ and Hee Cheon Park²

Department of Radiologic Technology, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

¹Department of Clinical Pathology, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

²Institute of Ornithology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract - We have confirmed the first case of mass mortality which occurred in the wild populations of larval toad, *Bufo bufo gargarizans* during 2007~2009 at Mangwel pond, which is a long time breeding site, and is located at the south eastern area in Daegu. We have investigated through microbiological tests the cause of mass decease of the larval toad, and detected numerous bacteria from the intestine by histological examines and cultures. The pathogen isolated from the infected larval toads has been identified as *Aeromonas hydrophila*, which is widely distributed in aquatic environment. However, this phenomenon of mass lethal pattern of the larval toad disappeared at the breeding pond after maintaining better water levels and low temperature in spring during breeding season in 2010. We propose that the high temperatures during the 2007~2009 breeding season resulted in lower water levels and drier conditions leading to explosive propagation of *A. hydrophila* in the pond which impacted the larval toad's immune function.

Key words: Larval toad, *Bufo bufo gargarizans*, mass mortality, *Aeromanas hydrophila*

서 론

도심인근의 두꺼비 집단서식처인 대구시 옥수동에 위치한 19,600 m² 크기의 망월지는 매년 2월 말부터 300여 쌍의 두꺼비가 번식을 하는 국내 최대의 서식지로 알려져 있다. 좁은 저수지에 펼쳐진 두꺼비의 난괴에서는 수백만의 올챙이가 부화되어 번태를 거치고 5월 중순에서

6월 초순 우기를 이용하여 인근야산으로 집단이동을 한다. 망월지는 경작지에 물을 제공하는 수리지였으나 도심이 팽창되면서 농경지가 줄어들고 양서류의 생태환경이 바뀌면서 주변의 두꺼비들이 이 연못에 몰려든 것으로 추정된다.

망월지 인근에 옥수천과 옥수지가 있지만 두꺼비들은 특이하게 망월지에서만 번식을 한다. 암수의 포접은 3~11일간 진행되며 수컷 앞다리의 강한 압박을 받은 암컷은 긴 난괴피를 햇빛이 잘드는 곳에 다발로 엮으며 집단적으로 산란을 한다. 이러한 life cycle은 해마다 꾸준히 이어져 왔으나 2007년부터 번태를 마친 일부 두꺼

* Corresponding author: Kgu Hwan Kim, Tel. 053-320-1320,
Fax. 053-320-1449, E-mail. kimgh@dhc.ac.kr

비 유생들이 죽기 시작하여 2008년과 2009년에는 거의 대부분이 집단 폐사되었다(NAP 2009).

양서류의 집단폐사는 질병과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있으나 구체적인 병인에 관해서는 잘 알려져 있지 않는 가운데 세계적으로 그 개체와 종의 감소가 일어나고 있는 실정이다(Cunningham *et al.* 1993).

집단폐사된 양서류의 사체에서 피부패혈증, 궤양, 기관 패혈 등이 발생되었음을 보고되었으며(Cunningham *et al.* 1993), 양서류의 집단폐사의 원인분석을 하는 중에 세균과 바이러스가 관련되어 있음이 밝혀졌다(Cunningham *et al.* 1996). 그러나 이들 연구는 대부분 성체에 관한 보고이며 두꺼비유생의 집단폐사에 관해서는 보고된 바 없다.

본 연구는 도심인근의 두꺼비 집단서식처인 망월지에서 2007~2009년 발생한 어린두꺼비의 국내 첫 집단폐사에 관하여 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

1. 조사지역 및 개체확보

본 연구대상 지역은 대구시 수성구 옥수골에 위치한 수리용 저수지로 1만 8천m², 저수량은 21만 3천톤에 달한다. 망월지 주변은 과거 임야, 농경지 과수원으로 구성되어 있었으나, 현재는 동쪽으로 학교, 남쪽으로 상가와 인가, 북쪽으로는 고속도로가 접해 있다. 망월지내 집단폐사가 발생한 지점은 모두 남쪽 지점으로 조사개체도 동 지점에서 확보하였다.

두꺼비집단폐사의 원인을 분석하기 위하여 망월지에서 2008~2009년 폐사된 개체와 건강한 개체의 조직검사와 미생물검사를 시행하였으며 대조군으로 집단폐사가 일어나지 않은 대구시 인근의 또다른 두꺼비 집단서

식지인 대구시 달서구에 위치한 대곡지의 두꺼비 유생을 포획하여 조직검사와 미생물검사를 병행하였다.

2. 조직검사방법

두꺼비 유생의 몸통이 4~5 mm 내외이므로 조직을 분리하지 않고 개체전체를 생체 고정방법에 따라 10% Neutral buffered formalin (Muto, Japan) 50 mL를 각각 비이커에 넣고 통상적인 실온에서 24시간 침수 고정하였다. 알코올과 10% 중화완충포르말린에 고정된 조직은 통상적인 표본방법 (conventional method)에 따라 탈수, 투명, 파라핀침투(paraffin wax impregnation)의 일반적인 과정을 거쳐 포매하고 조직블록을 회전형 박절기(Leica, Germany)에서 4μm로 박절하여 슬라이드에 부착하였다. 핵과 세포질, 세포간질 및 장관조직의 일반구조 관찰을 위해 Hematoxylin (Muto, Japan)과 Eosin (Muto, Japan)염색을 하였다. 검경은 NIKON ECLIPS E-200 (Japan)으로 하였다.

3. 미생물검사방법

호기적·혐기적배양이 모두 가능한 배지인 Thioglycolate broth (Becton, Dickinson and Company, USA)에 넣어 37°C에서 24~48시간 배양을 하였다. 배양된 2그룹의 배양액을 희석하여 100 μL를 취하여 그람양성균과 그람음성균 배양을 위해 Brain Heart Infusion (BHI) agar (Becton, Dickinson and Company, USA)와 그람음성균만을 위한 MacConkey agar (Becton, Dickinson and Company, USA)에 도말접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였고 각각의 균수를 측정하였다. 그람양성균으로 확인된 균들은 catalase, coagulase test를 실시하였고, 두 검사에 양성인 균들을 다시 mannitol salt agar (Becton, Dickinson and Com-

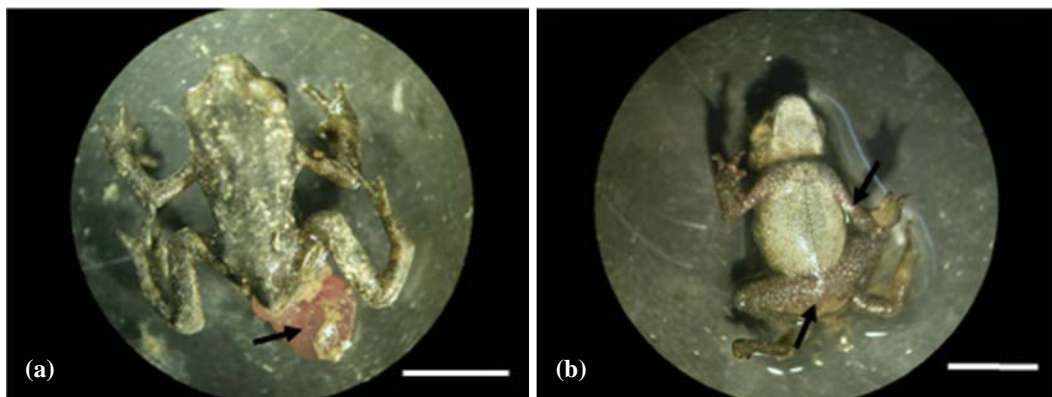


Fig. 1. (a) Main lesion of frog with hernia (arrow). (b) Ventral view of a frog with red-leg (arrows). Scale bars=5 mm.

pany, USA)에 접종하였다. MSA에서 mannitol을 분해한 균들은 API Staph Kit (API system: bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, USA)로 동정한 후, API web site (<http://localhost/jsp/ident/index.jsp>)에 연결해 동정결과를 확인하였다. 그람음성균 분리배지인 MacConkey agar (Becton, Dickinson and Company, USA)를 이용하여 그람음성세균을 분리·동정하고자 하였다. API kit를 통해 동정된 미생물을 재확인 하기 위해 VITEK system (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하였다. 표준균주로는 *Staphylo-*

ccus aureus ATCC 29213, *Eschichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853를 사용하였다.

결 과

1. 조직검사

망월지에서 어린두꺼비들의 집단으로 폐사가 진행되는 동안 대부분의 개체들은 외부의 물리적 자극에 대한

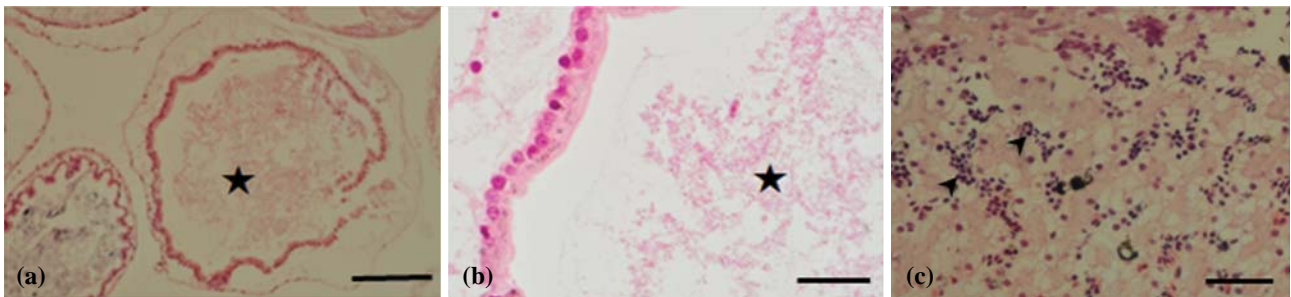


Fig. 2. Tissue sections of mass mortality individual of larval toad in Mangwel pond. (a) with mass material in lumen of intestine (b) magnification of lumen visible various size of nodule formation (star), (c) inflamed cell appear in connective tissue (arrowheads). Scale bars=200 μ m (a), 100 μ m (b, c).

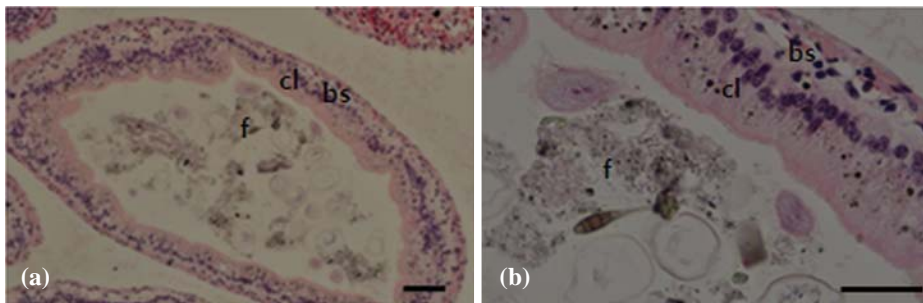


Fig. 3. Tissue sections of healthy individual of larval toad in Mangwel pond. (a), (b) lumen of intestine visible normal food. bs, basal cell; cl, columnar cell; f, feeding matter. Scale bars=200 μ m (a), 50 μ m (b).

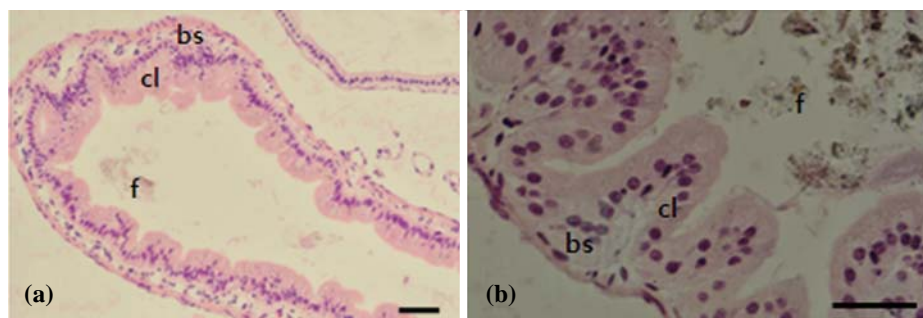


Fig. 4. Tissue sections of larval toad in Daegok pond. (a), (b) lumen of intestine visible normal food. bs, basal cell; cl, columnar cell; f, feeding matter. Scale bars=200 μ m (a), 50 μ m (b).

Table 1. A comparison larval toads Monangwel pond with Deagok pond

Individual \ Conditions	Bacteria mass	Inflamed cell	Saccharide in villus
Unusual mortality in Monangwel	+	+	+
Healthful in Monangwel	-	-	+
Healthful in Daegok	-	-	+

Table 2. Pathogenic bacteria isolated from the Larval Toad of two ponds

Source	Gram stain	Oxidase test	Identification	Marine disease
Mangweul	Cocobacilli	+	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Shellfish septicemia, Gastroenteritis, Hemorrhagic septicaemia
	Bacilli	-	<i>Enterobacter sakazakii</i>	Opportunistic pathogens
	Bacilli	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	Opportunistic pathogens
	Bacilli	-	<i>Serratia odorifera</i>	Opportunistic pathogens
Daegok	Bacilli	-	<i>Enterobacter sakazakii</i>	Opportunistic pathogens
	Bacilli	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	Opportunistic pathogens

Table 3. Distribution of pathogenic bacteria isolated from fresh water of two ponds

Source	Identification (No.)
Mangweul	<i>Aeromonas hydrophila</i> (293)
	<i>Moraxella lacunata</i> (72)
	<i>Serratia plymuthica</i> (13)
Daegok	<i>Aeromonas hydrophila</i> (58)
	<i>Chryseobacterium</i> spp. (36)
	<i>Serratia marcescens</i> (18)

반응이 느렸으며 탈장 (Fig. 1a)과 red-leg (Fig. 1b) 현상이 관찰되었다.

폐사한 개체의 조직표본에서 장내에서 식이물과는 구분되는 물질이 관찰되어 (Fig. 2a) 그 부위를 확대한 결과 미생물과 유사한 물질이 발견되었다 (Fig. 2b). 주위 근육과 피부조직은 특별한 염증이 없으며 장상피의 기저부에 일부 염증반응이 나타났다 (Fig. 2c).

망월지에서 포획한 우렁개체의 유생뚜꺼비의 조직표본의 장내에서는 섭식한 음식물 이외의 물질은 나타나지 않았다 (Fig. 3a). 주요 섭이물질은 조류, 동물성 플랑크톤, 갑각류 등인 것으로 나타났으며 (Fig. 3b), 장상피의 원주세포 (columnar cell)와 기저세포 (basal cell)에는 염증을 포함한 특이한 형태는 관찰되지 않았다 (Fig. 3).

대조군으로 조사한 대곡지의 뚜꺼비 유생의 장내 조직에서도 섭식물이 관찰되었으며 이외의 다른 구분되는 물질은 나타나지 않았다 (Fig. 4a). 나란히 배열된 장상피의 흡수세포들에서는 염증의 흔적은 발견되지 않았다 (Fig. 4b). 망월지와 대곡지의 어린뚜꺼비의 조직학적 관찰결과를 Table 1에서 비교하였다.

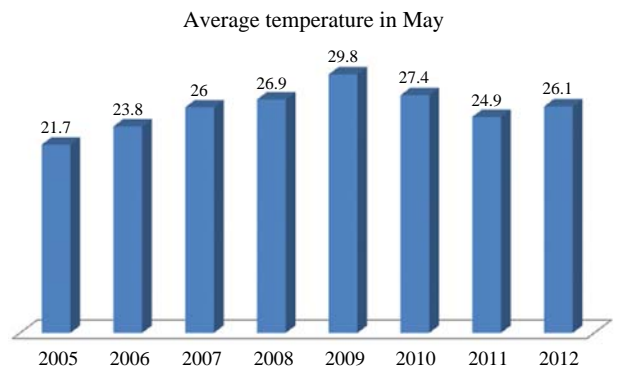


Fig. 5. Highest average temperature in May at 2005 ~ 2012.

2. 미생물학적 검사

망월지의 집단폐사된 개체군의 장내에서 관찰된 미생물 추정물질은 gram염색에서 양성 단간균 (Cocobacillus)으로 구분되었다. 이들 세균을 분리 동정한 결과 *Aeromonas hydrophilla*, *Enterobacter sakazakii*, *Serratia liquefaciens* 순으로 검출되었다. 한편 대곡지의 뚜꺼비 유생도 동일한 방법으로 검사하였으나 *A. hydrophila*가 검출되지 않았다 (Table 2).

망월지와 대곡지 물을 취수한 후 배양하여 미생물을 분리 검출한 결과 망월지에서나 대곡지에서 모두 *A. hydrophila*가 우점으로 나타났으나 망월지가 대곡지에 비하여 5배 이상 높게 검출되었다 (Table 3).

망월지 뚜꺼비 유생의 집단폐사가 일어나는 시기의 온도변화를 대구기상청 자료를 참고로 하여 2005 ~ 2012년까지의 5월 최고기온을 분석하였다 (Tables 4 ~ 6).

Table 4. Highest degree of first ten days of May at 2005 ~ 2012

Year/Date	5/1	5/2	5/3	5/4	5/5	5/6	5/7	5/8	5/9	5/10
2005	25.6	24.7	26.5	27.7	26.7	13.3	19.7	15.6	17.6	19.3
2006	23.8	23.7	21.2	24.7	23.6	18.8	26.5	26.7	27.6	20.2
2007	18.3	25.2	25.2	28.1	28.5	20.8	29.8	32.7	27.2	24.1
2008	28.2	31.8	32.3	26.2	24.3	29.5	30.5	26.5	21.8	18.4
2009	26.8	25.4	25.0	28.9	30.1	30.5	31.0	32.3	34.4	33.2
2010	22.2	27.4	29.8	30.6	27.1	28.4	27.4	28.3	28.8	24.5
2011	22.1	24.4	25.4	23.3	22.7	20.0	27.5	29.1	27.4	27.0
2012	24.3	20.1	25.0	29.9	29.0	27.2	28.9	30.0	28.8	18.2

Table 5. Highest degree of in the middle of May at 2005 ~ 2012

Year/Date	5/11	5/12	5/13	5/14	5/15	5/16	5/17	5/18	5/19	5/20
2005	16.1	19.6	23.3	20.7	25.7	25.3	23.6	19.6	23	24.5
2006	24.2	18.8	19	21.5	25.0	24.7	24.6	24.8	20.2	24.7
2007	27.3	18.3	26.3	28.6	28.1	21.1	26.2	26.2	23.6	24.8
2008	20.1	19.3	18.8	20.9	24.2	24.6	26.4	24.3	23.2	24.7
2009	30.3	22.9	27.6	29.7	23.6	18.8	23.7	28.1	31.4	30.3
2010	23.8	24.1	23.5	24.3	24.3	29.6	29.6	21.0	27.6	31.6
2011	15.5	20.2	25.3	26.7	28.4	25.1	26.0	29.1	28.0	28.6
2012	15.9	22.9	22.6	17.0	25.4	26.4	25.4	27.1	26.1	29.0

Table 6. Highest degree of third of May at 2005 ~ 2012

Year/Date	5/21	5/22	5/23	5/24	5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31
2005	22.8	18.5	20.1	23.5	24	25.0	27.7	28.2	23.7	26.7	26.6
2006	28.3	22.5	20.1	23.8	21.3	27.0	21.2	22.2	22.7	25.5	26.7
2007	24.2	29.7	27.8	27.5	29.5	32.4	30.2	22.5	29.2	26.5	25.1
2008	29.7	28.9	28.1	21.0	30.9	31.2	33.6	24.1	24.0	22.3	27.3
2009	21.9	26.9	24.3	25.4	29.5	29.2	27.2	28.9	26.3	26.2	28.6
2010	32.9	22.3	17.6	22.4	19.2	24.0	23.0	20.4	23.9	23.0	21.7
2011	32.9	22.3	17.6	22.4	19.2	24.0	23.0	20.4	23.9	23.0	21.7
2012	27.6	29.1	30.7	29.9	28.9	29.5	31.8	28.5	28.8	20.7	26.1

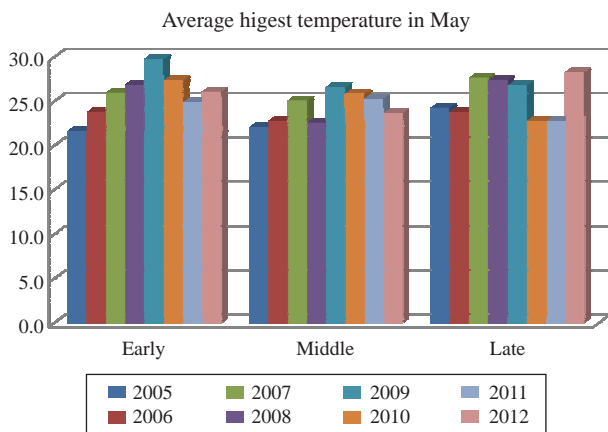


Fig. 6. Average highest temperature distribution in May at 2005 ~ 2012.

5월 최고기온 평균은 2009년이 29.5°C로 가장 높았고, 2011년을 제외하고 2007년부터 25°C 이상으로 지속되

었다 (Fig. 5).

5월 중 최고기온 평균이 25°C 이상 분포를 보이는 것은 5월 초순에는 2007년, 2008년, 2009년, 2010년, 2012년, 5월 중순에는 2009년, 2010년, 5월 하순에는 2007년, 2008년, 2009년, 2012년으로 나타났다 (Fig. 6).

고 찰

망월지에서 두꺼비 유생의 집단폐사의 원인을 밝히기 위하여 사체의 조직검사 비교 (Table 1)와 미생물검사 (Table 2)를 실시한 결과, 조직검사에서는 장내에 간균이 나타났으며 미생물검사에서는 우점적으로 *Aromonas hydrophila* 나타났다. 대곡지의 물에서도 *A. hydrophila*가 나타났으나 개체조사에서는 나타나지 않았다. *A. hydrophila*는 양서류, 파충류, 어류 등의 동물들에게 유행하는 기회감염균으로 알려져 있다 (Pasquale *et al.* 1994; Rahman

et al. 2001). 1992년 영국에서 발생한 *Rana temporaria* (북방산개구리)의 집단폐사에서 개체의 피부와 장에서 나타난 *A. hydrophila*가 주된 병원균임을 보고하였다(Cunningham et al. 1996). *A. hydrophila*는 식용개구리에서 병원균으로 검출되었으며(Michael et al. 2002)와 살충제에 노출된 두꺼비(Sharon et al. 1999)에서도 증가함을 보고하였다. *A. hydrophila*는 양서류뿐만 아니라 인간에게도 기회감염균으로 수계환경에 광범위하게 분포해 있다(Schiavano et al. 1998). 수계환경에 넓게 분포하는 *A. hydrophila*가 증식되는 것은 수온과 밀접한 관계를 갖는 것으로 알려져 있다(Hubbard 1981; Sami et al. 2004). *A. hydrophila*는 온도변화에 민감하여 수온이 높아짐에 따라 개체수의 증식속도가 빨라져 극심하게 더운 여름에는 개체의 증식이 최고에 이르게 된다(Kersters et al. 1996).

망월지로 들어오는 유입수는 옥수천과 인근야산으로부터나 유량이 매우 작다. 망월지의 유량은 2007년의 경우 일정량 이상을 확보하고 있었으나 2008년과 2009년도에는 산란 후 부화변태기에 연못의 바닥이 들어날 정도로 줄어들었다. 유량이 작아지고 계절은 여름으로 바뀌면서 기온은 매우 높아져 수온을 상승시켰다.

두꺼비 유생의 생존은 수질변화 및 유량변화, 기온, 자외선, 오폐수를 비롯한 다양한 주변환경에 영향을 받을 것이다. NAP(2009)의 보고에 의하면 2008년과 2009년 망월지 수중의 수소이온농도(pH), 용존산소량(Do), 화학적산소요구량(COD), 부유물질량(SS), 총질소(T-N), 총인(T-P) 등의 이화학적 수질조건과 카드뮴(Cd), 비소(As), 시안(CN), 수은(Hg) 등의 토양조사에서도 특이점 발견되지 않았다.

집단폐사가 일어난 2008년 5월 하순과 2009년 5월 초순의 최고기온 평균이 25°C 이상 상승하여 있었다(Fig. 5). 변태를 마친 어린 두꺼비들은 이동을 위하여 수변으로 몰려나와 있는 시기인 5월 하순이 취약한 시기이나 2009년의 경우 5월 초순에 6일간 30°C 이상 지속된 기록적인 기온분포가 있었다. 육지로의 이동을 준비하는 어린 두꺼비들이 밀집해 있는 수변은 얇은 물가로 기온의 영향을 직접받는 곳으로 대기온도와 수온의 차이가 크게 나지않는 위치이다. 5월 높은 기온은 수온상승을 동반하여 *A. hydrophila*의 급격한 증식을 유발될 수 있었던 것이다. 2010년 이후부터는 옥수천으로부터의 유입수를 이용하여 환류시키 흘러내리게 함으로 수온 하강시켜 *A. hydrophila* 증식에 의한 집단폐사를 예방할 수 있었던 것으로 추정할 수 있다.

*A. hydrophila*에 의한 감염은 파충류의 거북(*Pseudemys scripta*)에서 치사율이 95%에 이르며(Pasquale et al.

1994), Cryfish에서는 감염 후 일정조건하에서 치사율이 100%로 나타나는(Jiravanichpaisal et al. 2009) 병원균이다. *A. hydrophila*의 급속한 증식이 일어나는 동안 숙주의 장내에서 독성물질을 생성하므로 감염된 이후에 숙주는 빠르게 사망에 이르게 된다. 망월지 두꺼비 사체의 장내에서 발견된 *A. hydrophila*는 주변에 흔히 있는 미생물이나 수온이 상승하면서 기하급수적으로 증식되어 기회감염균(opportunistic pathogen)으로 역할을 한 것이다.

적 요

대구의 동남부지역에 위치한 망월지에서 2007년부터 2009년 사이에 일어난 두꺼비 유생의 집단폐사에 관한 연구이다. 망월지두꺼비를 대상으로 미생물학적 조직학적 검사를 시행하여 *Aeromonas hydrophila*를 분리해낼 수 있었다. *A. hydrophila*는 수계환경에 광범위하게 분포하는 기회감염균이다. 2007년~2009년 상승된 기온변화가 망월지내의 수온을 상승시킴으로서 어패류 및 양서류의 병원성 세균인 *A. hydrophila*의 급속한 증식이 유발되어 두꺼비유생을 감염시켜 집단폐사로 이어진 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Cunningham AA, TES Langton, PM Bennett, JF Lewin, SEN Drury, RE Gough and SK Macgregor. 1996. Pathological and Microbiological finding from incident of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 351:1539-1557.
- Cunningham AA, TES Langton, PM Bennett, SEN Drury, RE Gough and JK Kirkwood. 1993. Unusual mortality associated with poxvirus like particles in frogs (*Rana temporaria*). Vet. Rec. 133:141-142.
- Hubbard GB. 1981. *Aeromonas hydrophila* infection in *Xenopus laevis*. Lab. Anim. Sci. 31:297-300.
- Jiravanichpaisal PS, RL Edsman, H Liu and K Söderhäll. 2009. A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Inverte. Path. 101:56-66.
- Kersters L, G Huys, H Van Duffel, M Vancanneyt, K Kersters and W Verstraete. 1996. Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwater and nutrient-poor water in comparison with other bacteria. J. Appl. Bacteriol. 80:266-276.
- Mauel MJ, DL Miller, KS Frazier and ME Hines II. 2002. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana cas-*

- tesbeiana*). J. Vet. Diagn Invest 14:431-433.
- Nature and People (NAP). 2009. Larve Toad Monitorin in Mangwel pond. p. 19.
- Pasquale V, SB Baloda, S Dumontet and K Krovacek. 1994. An outbreak of *Aeromonas hydrophila* infection in turtles (*Pseudemys Scripta*). Appl. Environ. Microbiol. 60:1678-1680.
- Rahman MH, S Suzuki and K Kawai. 2001. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. J. Appl. Ichthyol. 17:282-285.
- Sami M, D Michel and D Sam. 2004. Temperature and growth-phase effects on *Aeromonas hydrophila* survival in natural seawater microcosms: role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response. Microbiology 150:181-187.
- Sharon KT, SW Elizabeth and WN Ken. 1999. Effects of malathion on disease susceptibility in woodhouse's toads. J. Wild. Dise. 35:536-541.
- Taylor KS, ES Williams and KW Mills. 1999. Effects of malathion on disease susceptibility in woodhouse's toads. J. Wild. Dise. 35:536-541.

Received: 16 September 2013

Revised: 12 November 2013

Revision accepted: 13 November 2013