

한국산 큰산개구리(*Rana ueno*)의 생물농축에 관한 연구

강진욱* · 이대균** · 이상철*** · 심민석**** · 배양섭*****

*(주)애일

**인천대학교 생명·나노바이오공학과

***생물자원환경연구소

****인천대학교 생명·나노바이오공학과

*****인천대학교 생명과학부

Study on the Bioaccumulation of Korean *Rana ueno*

Jin Wook Kang* · Dae Gyun Lee** · Sang Cheol Lee*** · Min Suk Shim**** · Yang Seop Bae*****

*Aeil Inc. 14676, Korea

**Department of Bioengineering and Nano-Bioengineering, Incheon National University, Incheon, Republic of Korea

***Bio-Resource and Environmental Center, Incheon National University, Incheon Republic of Korea

****Department of Bioengineering and Nano-Bioengineering, Incheon National University, Incheon, Republic of Korea

*****Division of Life Sciences, Incheon National University, Incheon, Republic of Korea

(Received : 14 February 2025, Revised : 24 February 2025, Accepted : 24 February 2025)

요약

본 연구는 큰산개구리(*Rana ueno*)의 중금속의 생물농축을 분석하고, 서식지 환경요인과의 관계를 평가하여, 보전방안을 제시하는 것을 목표로 하였다. 연구는 농경지, 탄광 인근 농경지, 석산 인근 농경지, 습지 등 4개 지역에서 수행되었다. 각 지역에서 큰산개구리 5마리씩 포획하고, 토양과 수질을 채취하여 구리(Cu), 납(Pb), 니켈(Ni), 비소(As), 아연(Zn), 카드뮴(Cd) 등 6종의 중금속 농도를 분석하였다. 토양에서는 아연이 가장 높은 농도로 검출되었으며, 수질에서는 아연을 제외한 중금속이 검출되지 않았다. 간과 신장을 분석한 결과, 간에서는 구리, 신장에서는 아연이 가장 높게 검출되었다. 또한, 상대적 중요도 분석을 통해 지역이 중금속 축적에 가장 큰 영향을 미치는 변수로 확인되었으며, 그다음으로 주둥이로부터 항문까지의 신장인 SVL(Snout-Vent Length)과 체중이 영향을 미쳤고, 성별의 영향은 미미한 것으로 나타났다. 생물농축계수(Biological Accumulation Factor, BAF) 분석 결과 지역별로 중금속 축적 수준이 다르게 나타났으며, 이는 환경 오염 차이가 중금속 축적에 영향을 미친다는 것을 시사한다. 본 연구 결과는 양서류의 생태환경 평가 및 보전 전략 수립을 위한 기초자료로 활용될 수 있으며, 건강한 서식지 조성을 위한 환경 관리 방안 마련에 기여할 것으로 기대된다.

핵심용어 : 큰산개구리, 중금속 농축, 생물농축계수, 상대적 중요도

Abstract

This study aims to analyze the bioaccumulation of heavy metals in *Rana ueno* and evaluate its relationship with habitat environmental factors to propose conservation strategies. The research was conducted in four different habitat types: agricultural fields, agricultural fields near coal mines, agricultural fields near stone quarries, and wetlands. Five individuals of *Rana ueno* were collected from each site, and soil and water samples were obtained to analyze the concentrations of six heavy metals: copper (Cu), lead (Pb), nickel (Ni), arsenic (As), zinc (Zn), and cadmium (Cd). The results showed that zinc was the most abundant heavy metal in soil, while

*To whom correspondence should be addressed.

Department of Bioengineering and Nano-Bioengineering, Incheon National University

Division of Life Sciences, Incheon National University

E-mail : msshim@inu.ac.kr, baey@s@inu.ac.kr

• Jin Wook Kang Aeil Inc./Team Manager(nggr3@naver.com)

• Dae Gyun Lee Incheon University, Korea/Master's degree candidate(lsq1623@inu.ac.kr)

• Sang Cheol Lee Bioresource and Environmental Center, Incheon, Korea/Ph.D.(3881103@hanmail.net)

• Min Suk Shim Incheon University, Korea/Professor(msshim@inu.ac.kr)

• Yang Seop Bae Incheon University, Korea/Professor(baey@s@inu.ac.kr)

 This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

no heavy metals were detected in water except for zinc. The analysis of liver and kidney tissues revealed that copper had the highest concentration in the liver, whereas zinc was the most abundant in the kidney. Additionally, a relative importance analysis identified region as the most significant variable influencing heavy metal accumulation, followed by snout-vent length (SVL), which represents the body length from the snout to the vent, and body weight. The effect of sex was minimal. The Biological Accumulation Factor (BAF) analysis demonstrated significant differences in heavy metal accumulation across regions, suggesting that variations in environmental pollution levels influence metal bioaccumulation. These findings provide essential data for amphibian ecological assessments and conservation strategy development, contributing to the establishment of effective habitat management plans.

Key words : *Rana uenoi*, heavy metal accumulation, bioaccumulation factor, relative importance

1. 서론

최근에는 양서류 군집 감소가 전 세계적으로 큰 문제가 되고 있다(Williams, 2007). 지난 반세기 동안 전 세계에서 진행되고 있는 서식지 감소와 환경 오염은 양서류의 다양성 감소를 가져왔으며, 이는 먹이연쇄의 기능과 구조를 변화시켜 생태계의 교란 요인으로 작용하고 있다(Cogger and Zweifel, 1998).

양서류 군집 감소의 원인으로는 기생충, 서식지 단절화, 자연 변동(natural fluctuations), 기후변화, 산성비, 자외선, 화학물질 오염, 중금속 오염 등이 주요 요인으로 주목받고 있다(Lefcort et al., 1998; Mendelson et al., 2004). 이 중 중금속 오염은 생물체에 낮은 농도에서도 매우 해롭다는 사실이 알려져 있다(DeForest et al., 2007). 일반적으로 중금속은 산업공정에 사용되는 잠재적 독성금속을 말하며, 카드뮴, 구리, 니켈, 아연, 비소, 납 등이 포함된다(United Nations, 1997).

다양한 생물체 중에서도 양서류는 척추동물 가운데 환경 오염물질에 영향을 받기 쉬운 동물에 속한다(Read and Tyler, 1994). 양서류는 피부호흡을 하고 유생에서 성체로 변태하는 시기에 가장 취약하고, 산란된 알이 외부 환경에 직접 노출되어 환경변화에 민감하게 반응하며, 이에 따라 양서류는 환경변화를 감지하고(Lips et al., 2001), 습지생태계 건강성을 평가할 수 있는 효과적인 생물 지표로 알려져 있다(Wyman, 1990). 이러한 이유로 양서류는 중금속 오염(Browne and Dumont, 1979; Nebeker et al., 1995; Henle, 1981), 방사능 누출(Nishimura, 1967; Emery and McShane, 1980; Tyler, 1989; Read and Tyler, 1994), 농약오염의 지표종(Harri et al., 1979; Anguiano, 1994)으로 활용되고 있다.

생태계에서 양서류는 먹이사슬의 중간 단계에 위치하며, 건강한 생태계를 유지하는 데 중요한 역할을 하는 분류군이다. 또한, 육상 및 수서 곤충을 포식하고 생활하며, 포유류, 조류, 파충류 등의 주요 먹이원이 된다(Song et al., 2009). 양서류 유생은 수중생태계에서 1차 소비자이자, 상위 포식자의 먹이 원이고, 성체의 경우 수중생태계의 먹이사슬을 연결하는 역할을 한다. 이처럼 양서류는 생태계 내에서 중요한 위치를 차지하고 있다.

최근에는 양서류의 생리적 특성과 보전 연구가 더욱 활발해지고 있다. 예를 들어, 양서류 정자 동결보존 기술에 대한 연구(Lee et al., 2023)는 개체군 유지와 유전적 다양성 확보를 위

한 연구뿐만 아니라 맹꽁이의 체장 길이 및 몸무게 차이 비교 연구도 수행되었다(An et al., 2020). 또한 맹꽁이의 성별에 따른 신체 상태, 크기 및 기후 환경 차이에 관한 연구(Kim et al., 2024) 등 활발히 진행되고 있다. 그러나 기존 연구는 주로 양서류의 생리적 특성과 보전에 초점을 맞추고 있으며, 중금속 축적에 대한 연구는 상대적으로 미흡한 상황이다.

외국의 경우 미국 아카디아 국립공원의 녹색개구리(*Rana clamitans*)와 황소개구리(*Lithobates catesbeianus*)의 유생에 대한 수은 생물축적(Bank et al., 2007), 미국 미주리 지역의 7개 하천에서 채집된 오자크 헬벤더(*Cryptobranchus alleganiensis bishopi*), 동부 헬벤더(*C. a. alleganiensis*)의 혈중 중금속 농도 분석(Huang et al., 2010), Bermuda의 수수두꺼비(*Bufo marinus*)와 휘파람개구리(*Eleutherodactylus johnstonei*)에 대한 중금속 분석(Linzey et al., 2003), 미국 캘리포니아주 남부 시에라 네바다 산맥의 시에라 코리스 개구리(*Pseudacris sierra*)의 유생에서 중금속 수은 분석(Bradford et al., 2012) 등 다양한 연구가 수행되었다.

국내의 경우 아프리카 양서류인 아프리카발톱개구리(*Xenopus laevis*)를 통한 카드뮴 축적에 관한 연구(Kim and Chung, 1995), 철서 지역에서 채집한 양서류의 중금속 오염에 관한 연구(Lee et al., 1991), 영산강 수계에서 채집한 황소개구리의 중금속 축적에 관한 연구(Lee and Ko, 2001), 서울 근교에 서식하는 어류 및 양서류의 체내 중금속 축적에 관한 연구(Lee, 1993) 등이 보고되었으나, 중금속 관련 연구는 아직 충분하지 않다.

이에 본 연구는 제주도를 포함한 전국에 서식하고 있는 야생의 큰산개구리를 대상으로, 토양과 수질 등에 존재하는 중금속이 생물농축을 통하여 간과 신장에 축적된 중금속 농도와 생물농축계수(Biological Accumulation Factor, BAF)를 확인하기 위해 수행되었다. 또한 연구지역의 경우 각 지역의 특성에 인위적 교란이 발생하는 일반 농경지, 탄광 주변 농경지, 석산 주변 농경지 및 인위적 교란이 없는 습지를 선택하였고, 중금속의 경우 토양환경보전법 중 환경부가 지정한 토양오염물질의 구리, 납, 니켈, 비소, 아연, 카드뮴 등 6개를 분석하였다.

본 연구는 양서류의 건강한 서식지 조성과 환경의 질 평가 및 양서류를 보전하고 관리하기 위한 효과적인 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

2. 재료 및 방법

2.1 연구범위 및 재료

본 연구는 강원도 강릉시 난곡동 농경지, 강원도 영월군 김삿갓면 와석리 농경지, 강원도 원주시 귀래면 귀래리 농경지, 제주도 제주시 구좌읍 덕천리 북오름 인근 습지 등 총 4개 지역에서 번식하고 있는 큰산개구리(*Rana uenoi*)를 선택하였다 (Table 1). 큰산개구리의 경우 포획금지 야생동물로 지정되어 있어 포획 전 각 지역의 관할 시청과 군청으로 야생동물포획허가 신청서를 제출한 다음 승인을 받아 연구를 진행하였다. 개체 포획은 2023년 5월 4일부터 2024년 3월 31일까지 각 지역에서 번식기와 활동 시기에 포획하였다.

토양과 수질은 각각 농경지와 습지에 인접한 토양과 내부의 물을 채집하였다. 토양의 경우 지표면 3~5cm 정도 제거 후 토양을 지퍼백에 담아 보관하였다. 수질의 경우 멸균된 채수병에 담아 냉장 보관한 뒤 연구실로 운반 후 분석하였다.

큰산개구리는 각 지역에 크기, 무게, 성별에 상관없이 무작위로 5마리씩 포획하였다. 이후 에탄올(Ethanol absolute(Merck) 95~100%)을 사용하여 안락사시킨 후, 디지털 캘리퍼스(H500-20 DIGIMATIC CALIPER (200mm), Mitutoyo)와 휴대용 전자저울(W-500, WellDot, China)을 이용하여 SVL과 체중(Weight)을 측정된 다음 냉동보관 하였다. 성별(Sex)은 생식혹(Nuptial pad) 또는 해부 후 난소(Ovary)와 정소(Testis) 존재를 확인한 다음 기록하였다(Table 2).

2.2 중금속 분석

1) 토양 분석

각 연구지역의 토양은 농경지 인근 및 습지와 인접한 토양을 채집한 후, 지퍼백에 보관 후 실험실로 운반한 뒤 우리환경연구소에 의뢰하여 토양오염공정시험기준에 따라 분석하였다. 토양 시료 3g을 250ml 반응용기에 넣고, 약 0.5~1mL의 정제수로 시료를 적신 후 염산 21mL를 첨가하면서 잘 섞은 다음

질산 7mL를 가하여 잘 저어주었다. 흡수 용기에 0.5M 질산 15mL를 붓고 흡수 용기와 환류 냉각관을 반응용기에 연결시킨 후 상온에서 2시간 이상 정치시켜 토양 내의 유기물이 천천히 산화되도록 한다. 이후 반응혼합물의 온도를 서서히 올려 환류 조건에 도달하도록 하고 2시간 동안 그 상태를 유지시킨 후 분해시킨다. 분해가 끝나면 반응용기를 냉각시킨 후, 0.5M 질산 10mL로 씻어 반응용기에 넣는 다음 Whatman No. 40 또는 이와 동등한 여과지로 100mL 부피 플라스크에 여과하고, 0.5M 질산으로 표선을 채워 시료 용액으로 사용했다.

이러한 전처리 과정 후 얻은 시험 용액을 구리는 324.754nm, 납은 220.353nm, 니켈은 231.604nm, 비소는 89.042nm, 아연은 213.857nm, 카드뮴은 228.802nm에서 유도결합플라즈마 원자발광분광계(iCAP-7400 Duo, ASX-560, Thermo Fisher)로 분석하였다.

2) 수질 분석

각 연구지역의 수질은 농경지 및 습지 내부에 있는 물을 멸균된 채수병에 담아 냉장 보관 후 실험실에 옮겨와 산업공해 연구소에 의뢰하여 분석을 진행하였다. 시험법은 수질오염공정시험기준 ES 04400.3c 금속류-유도결합플라즈마-원자발광분광법(Metals-Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry)으로 시행하였다. 각 지역의 물을 100mL 이상 취하여 질산 5mL와 풀림죽 2~5개를 넣고 서서히 가열하여 액량이 10~20mL 될 때까지 증발 농축하고 방지하여 냉각한다. 이후 시료 색이 맑아질 때까지 질산을 추가하여 증발 농축하는 과정을 반복한 다음, 거름종이를 정제수로 2~3회 씻어주고 여과액과 씻은 액을 100mL 부피의 플라스크에 넣어 정확히 100mL로 맞추었다. 이러한 전처리 과정 후 ICP-OES(Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy, ICP-OES, PerkinElmer Inc, USA) 장비를 안정시킨 후 시료를 플라즈마에 주입하여 분석하였다.

3) 큰산개구리 분석

각 연구지역에서 5마리씩 포획한 큰산개구리는 실험실에서

Table 1. Study sites and locations of *Rana uenoi*

Site	Location	Latitude	Longitude
Gangneung	Nangok-dong, Gangneung-si, Gangwon-do	37° 47'	128° 53'
Yeongwol	Waseok-ri, Gimsatgat-myeon, Yeongwol-gun, Gangwon-do	37° 07'	128° 35'
Wonju	Gwirae-ri, Gwirae-myeon, Wonju-si, Gangwon-do	37° 13'	127° 51'
Jeju	Deokcheon-ri, Gujwa-eup, Jeju-si, Jeju-do	33° 29'	126° 44'

Table 2. Morphological data summary of *Rana uenoi* by region

Site	Number of frogs	SVL (mm)	Weight	Sex
Gangneung	n=5	60.96±9.84	18.79±10.37	Female = 2 Male = 3
Yeongwol	n=5	68.75±8.04	9.55±2.23	Female = 1 Male = 4
Wonju	n=5	59.52±2.25	17.35±2.86	Male = 5
Jeju	n=5	48.27±3.60	28.14±10.7	Male = 5

해부한 다음 간과 신장을 적출 후 막자와 사발을 이용하여 초순수에 균질화시켰다. 균질화시킨 간과 신장을 왕수[HNO₃ (70%) : HCl(35%)=1:3]와 1:1 비율로 섞은 후, 1시간 동안 상온에서 예비 반응을 시킨 후, 80°C에서 1시간 동안 가열하여 장기를 완전히 용해시키고 초순수 4.9mL와 장기 샘플 용액 0.1mL을 섞어 최종 산 농도 0.35%(v/v)로 유도결합 플라즈마 질량분석기(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS, iCAP Q, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 측정하였다.

4) 생물농축계수(Biological Accumulation Factor, BAF)

BAF는 환경에 존재하는 영양염(Nutrient Pollutants), 유기오염물질(Organic Pollutants), 방사성 물질(Radiological Contaminants), 중금속(Heavy Metals) 등의 오염물질들이 생물체에 농축 정도를 나타내는 지표로 특정 물질이 생물체 내에 외부 오염물질이 어느 정도 농축되는지를 측정하는 데 사용된다. BAF의 공식은 다음과 같다.

$$BAF = \frac{\text{생물체 내 물질 함량}(ug/g)}{\text{환경 내 물질 함량}(ug/g)}$$

BAF>1보다 크면 환경에서 검출된 오염물질보다 높은 농도로 농축되었다고 할 수 있으며, BAF=1이면 농축된 오염물질이 환경과 같은 농도, BAF<1의 경우는 농축된 오염물질이 환경보다 낮은 농도로 농축되었음을 나타낸다.

각 지역에서 검출된 중금속의 값을 BAF 공식에 대입하여 BAF 값을 도출한 다음 그래프로 출력하였고, 각 지역의 중금속에 대한 평균 및 표준편차 등의 값을 이용하여 분석하였다.

5) 자료 분석

본 연구에서 도출된 데이터는 통계 프로그램 R(ver. 4.4.2)을 사용하여 상관분석(Correlation analysis), Levene's의 등분산 검정(Homogeneity of variances)과 분산분석(One-way

ANOVA) 및 사후검정(Tukey's HSD), 결정 트리 분석(Decision tree analysis), 랜덤 포레스트(Random forest) 등을 이용하여 데이터를 해석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 토양 분석 결과

토양 분석 결과 아연이 전 지역에서 가장 높게 검출되었으며, 카드뮴은 전 지역에서 가장 낮게 검출된 것으로 확인되었다. 아연의 경우 250.3mg/kg인 영월이 80.2mg/kg 강릉보다 약 3배, 니켈의 경우 57.9mg/kg인 제주가 3.7mg/kg 강릉보다 약 15.6배, 구리는 42.4mg/kg 제주가 5.0mg/kg 강릉보다 약 8.5배, 납은 14.1mg/kg 제주가 5.6mg/kg인 강릉보다 약 2.5배, 비소는 10.4mg/kg 영월이 3.2mg/kg인 강릉보다 약 3.3배, 카드뮴은 0.6mg/kg인 제주가 0.2mg/kg인 강릉보다 약 3배 정도로 높게 측정된 것으로 확인되었다(Table 3).

토양환경보전법(Soil Environment Conservation Act, 1995) 중 토양오염우려기준으로 23개의 오염물질 기준을 지정하였고 지목에 따라 3가지 등급으로 구분된다. 본 연구지역은 전담으로 구성되어 있어 오염 기준 1 지역에 포함되며, 연구지역에서 검출된 중금속 평균을 토양오염기준과 비교한 결과, 니켈의 경우 1/4, 구리 1/8, 아연 1/2, 비소 1/4, 카드뮴 1/8, 납 1/17 수준으로 검출되어 토양오염우려기준 이하로 안전한 수준인 것으로 확인되었다.

3.2 수질 분석 결과

수질 분석 결과 전 지역에서 아연을 제외한 모든 중금속이 불검출(Not Detected, N.D)되었다. 강릉은 모든 중금속이 불검출되었으며, 원주의 경우 0.005mg/L로 가장 높게 검출되었고, 제주 0.004mg/L, 영월 0.003mg/L의 아연이 검출되었다(Table 4). 이는 수질이 중금속 농축에 직접적인 영향보다는

Table 3. Heavy metal concentrations in soil and contamination thresholds(mg/kg)

Site \ heavy metal	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Gangneung	3.70	4.90	80.20	3.17	0.23	5.60
Yeongwol	19.60	19.10	250.30	10.40	0.53	10.70
Wonju	4.00	5.70	102.30	4.27	0.47	14.40
Jeju	57.90	42.40	130.20	5.47	0.60	14.10
Average	21.30±25.50	18.02±17.51	140.75±75.84	5.83±3.19	0.46±0.16	11.20±4.09
Worrisome Levels of Soil Contamination(1 area)	100	150	300	25	4	200

Table 4. Heavy metal content in the water quality(mg/L)

Site \ heavy metal	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Gangneung	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Yeongwol	N.D	N.D	0.003	N.D	N.D	N.D
Wonju	N.D	N.D	0.005	N.D	N.D	N.D
Jeju	N.D	N.D	0.004	N.D	N.D	N.D

수생 식물과 동물 등의 먹이원을 통하여 간접적인 영향으로 중금속 축적되었을 가능성을 시사한다.

3.3 큰산개구리 중금속 분석 결과

큰산개구리의 중금속 분석 결과는 각 지역에서 채집한 5마리씩 간과 신장으로 구분하여 중금속 함량을 검출하였다(Fig. 1, Table 5). 평균적으로 총 4개 지역에서 간에서는 구리가 가장 높고 그다음으로 아연이 높은 경향을 보였으며, 비소는 가장 낮은 경향을 나타냈다. 신장의 경우 아연이 가장 높고 그다음으로 구리가 높은 것으로 나타났으며, 비소는 간과 마찬가지로 가장 낮은 경향을 나타냈다. 이 결과는 구리와 아연이 간과 신장에서 서로 다른 방식으로 축적되는 것을 의미할 수 있으며, 비소의 경우 간과 신장에서 낮은 함량을 나타내는 것은 큰산개구리가 효율적인 해독 기작이 있을 가능성을 나타낸다.

또한 인위적 교란이 많이 발생하는 영월(탄광)과 원주(석산)의 경우, 간에서 구리 > 아연 > 납 > 니켈 > 카드뮴 > 비소, 신장의 경우 아연 > 구리 > 납 > 니켈 > 카드뮴 > 비소 등으로 각각 함량 순위가 동일한 패턴을 보였다. 반면, 일반 농경

지인 강릉과 인위적 교란이 없는 제주(습지)의 경우 간에서는 구리와 아연, 및 납, 비소만 같은 순위를 나타내고, 신장의 경우 아연, 구리, 비소만이 같은 순위를 보였다. 전체적으로 간에서는 구리, 신장에서는 아연이 가장 높고, 비소의 경우 간과 신장에서 모두 가장 낮은 축적을 보였다. 이는 영월과 원주의 생산활동에서 발생하는 인위적 교란이 간과 신장에서 중금속 축적에 영향을 미치는 것으로 분석된다.

각 변수들의 상관관계를 분석한 결과 SVL과 체중은 간과 신장에서 상관계수가 0.96으로 매우 강하게 양의 상관관계를 나타냈다. 반면, SVL 및 체중의 금속 함량에 대한 간과 신장의 상관계수는 전반적으로 낮게 나왔으며, 대부분 유의미하지 않았다(Table 6). 그러나 중금속 간 상관관계에서 간의 경우 니켈과 납($r=0.61, p=0.004$), 비소와 납($r=0.80, p<0.001$)이 중금속 간 상관관계가 강하게 나타났으며, 신장의 경우 니켈과 구리($r=0.89, p<0.001$), 니켈과 아연($r=0.85, p<0.001$)이 강한 상관관계를 보였다(Fig. 2). 이중 SVL 및 체중의 상관관계가 강하게 나타나는 것은 SVL과 체중이 증가할수록 중금속 축적에 영향을 미치는 것으로 해석할 수 있다. 즉 개체가 커질수록

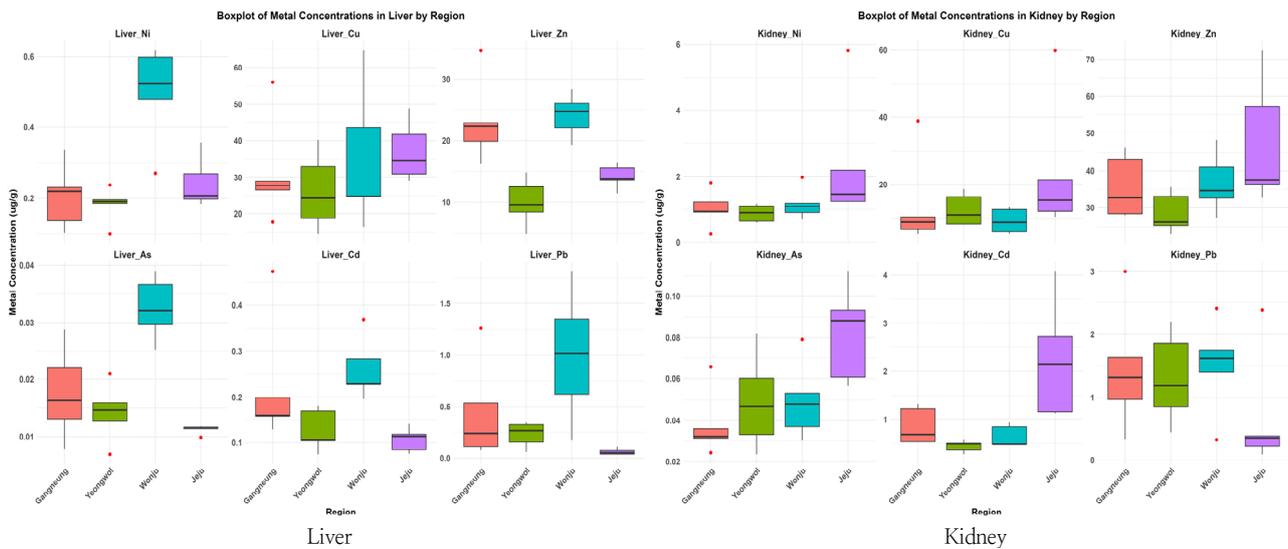


Fig. 1. Comparison of heavy metal content distribution in liver and kidney

Table 5. Heavy metal accumulation (mean \pm S.D, min, max, $\mu\text{g}/\text{wet.g}$) in the tissues of *Rana uenoi*

	Gangneung (n=5)		Yeongwol (n=5)		Wonju (n=5)		Jeju (n=5)	
	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney
Ni	0.21 \pm 0.09 (0.10, 0.34)	1.03 \pm 0.56 (0.27, 1.81)	0.18 \pm 0.05 (0.10, 0.24)	0.89 \pm 0.25 (0.61, 1.17)	0.50 \pm 0.14 (0.27, 0.62)	1.17 \pm 0.49 (0.70, 1.98)	0.24 \pm 0.07 (0.18, 0.36)	2.39 \pm 1.96 (1.24, 5.82)
Cu	31.39 \pm 14.47 (17.84, 56.09)	14.14 \pm 13.98 (5.48, 38.93)	26.15 \pm 10.39 (14.59, 40.16)	12.58 \pm 4.76 (8.26, 18.7)	34.86 \pm 19.4 (16.56, 64.70)	9.28 \pm 3.54 (5.54, 13.21)	37.01 \pm 8.15 (29.06, 48.78)	23.85 \pm 20.56 (10.47, 59.84)
Zn	23.21 \pm 6.90 (16.30, 34.64)	35.71 \pm 8.46 (28.04, 46.22)	10.05 \pm 3.82 (4.91, 14.86)	28.68 \pm 5.36 (23.09, 35.55)	24.1 \pm 3.54 (19.25, 28.39)	36.75 \pm 8.08 (27.25, 48.25)	14.18 \pm 1.93 (11.46, 16.46)	47.24 \pm 16.98 (32.78, 72.34)
As	0.02 \pm 0.01 (0.01, 0.03)	0.04 \pm 0.02 (0.02, 0.07)	0.01 \pm 0.01 (0.01, 0.02)	0.05 \pm 0.02 (0.02, 0.08)	0.03 \pm 0.01 (0.03, 0.04)	0.05 \pm 0.02 (0.03, 0.08)	0.01 \pm 0.00 (0.01, 0.01)	0.08 \pm 0.02 (0.06, 0.11)
Cd	0.22 \pm 0.14 (0.13, 0.47)	0.86 \pm 0.38 (0.54, 1.32)	0.13 \pm 0.05 (0.07, 0.18)	0.44 \pm 0.12 (0.27, 0.57)	0.26 \pm 0.07 (0.19, 0.37)	0.65 \pm 0.23 (0.48, 0.94)	0.11 \pm 0.03 (0.08, 0.14)	2.25 \pm 1.23 (1.13, 4.08)
Pb	0.45 \pm 0.49 (0.07, 1.26)	1.45 \pm 0.99 (0.33, 3.00)	0.23 \pm 0.12 (0.06, 0.35)	1.31 \pm 0.72 (0.44, 2.21)	1.00 \pm 0.63 (0.18, 1.81)	1.50 \pm 0.76 (0.33, 2.41)	0.06 \pm 0.03 (0.04, 0.11)	0.69 \pm 0.96 (0.09, 2.39)

중금속 축적도 증가할 가능성이 높다.

각 지역에서 농축된 중금속 원소들을 분산분석(One-way ANOVA)과 사후검정(Tukey's HSD test)을 수행하였다. 분석 결과 구리의 경우 간(F(3, 16)=0.591, p=0.630)과 신장(F(3, 16)=1.200, p=0.341) 모두에서 지역 간 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 니켈의 경우 간(F(3, 16)=12.160, p<0.001)에서 원주와 강릉, 원주와 제주, 영월과 원주 간에 유의미한 차이를

나타냈고, 신장(F(3, 16)=2.154, p=0.133)은 지역 간의 유의미한 차이는 나타나지 않았다. 아연의 경우 간(F(3, 16)=12.070, p<0.001)에서 제주와 강릉, 영월과 강릉, 원주와 제주, 영월과 원주 간의 유의미한 차이를 나타내고, 신장(F(3, 16)=2.581, p=0.089)은 지역 간의 유의미한 차이는 나타나지 않았다. 비소의 경우 간(F(3, 16)=14.510, p<0.001)에서 원주와 강릉, 원주와 제주, 영월과 제주 간의 유의미한 차이를 보였고, 신장

Table 6. Liver and kidney correlation analysis results

Variable Pair	Organ	Correlation	p-value	Variable Pair	Organ	Correlation	p-value
SVL - Weight	Liver	0.9607	1.83e-11	SVL - Weight	Liver	0.9607	1.83e-11
	Kidney	0.9607	1.83e-11		Kidney	0.9607	1.83e-11
SVL - Ni	Liver	-0.2239	0.3427	Weight - Ni	Liver	-0.3259	0.1609
	Kidney	-0.4289	0.0592		Kidney	-0.3698	0.1085
SVL - Cu	Liver	-0.0598	0.8023	Weight - Cu	Liver	-0.0232	0.9228
	Kidney	-0.1325	0.5778		Kidney	-0.0780	0.7439
SVL - Zn	Liver	-0.2814	0.2294	Weight - Zn	Liver	-0.3799	0.0985
	Kidney	-0.4311	0.0577		Kidney	-0.3818	0.0967
SVL - As	Liver	0.2466	0.2945	Weight - As	Liver	0.1937	0.4133
	Kidney	-0.4038	0.0775		Kidney	-0.2984	0.2013
SVL - Cd	Liver	0.4194	0.0656	Weight - Cd	Liver	0.3614	0.1175
	Kidney	-0.5404	0.0139		Kidney	-0.4112	0.0716
SVL - Pb	Liver	0.1530	0.5195	Weight - Pb	Liver	0.0487	0.8385
	Kidney	0.4374	0.0538		Kidney	0.4192	0.0658

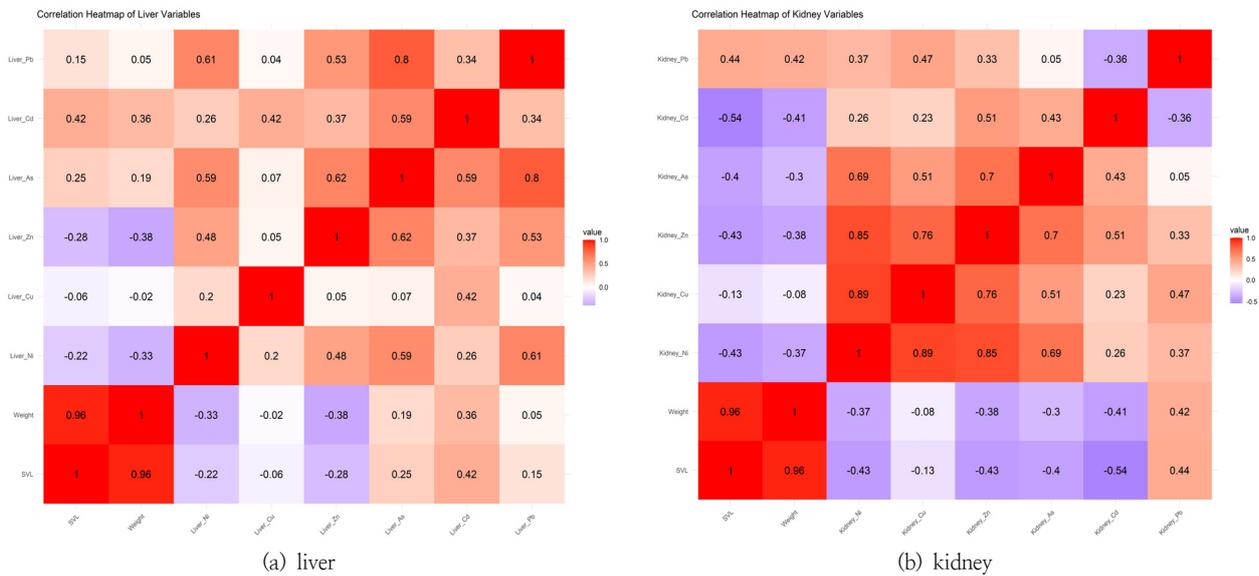


Fig. 2. Correlation analysis between metal concentrations and morphological variables (liver and kidney)

Table 7. Relative importance of factors influencing metal concentrations in liver and kidney

	Liver				Kidney			
	Regions	SVL	Weight	Sex	Regions	SVL	Weight	Sex
Ni	40%	24%	22%	12%	35%	24%	22%	12%
Cu	50%	20%	25%	15%	30%	20%	25%	15%
Zn	30%	26%	23%	13%	28%	26%	23%	13%
As	20%	22%	18%	20%	40%	22%	18%	20%
Cd	45%	25%	26%	16%	33%	25%	26%	16%
Pb	35%	22%	19%	17%	37%	22%	19%	17%

(F(3, 16)=4.341, p=0.020)에서는 제주와 강릉 간에서 유의미한 차이를 나타냈다. 구리는 간(F(3, 16)=4.031, p=0.026)의 경우 원주와 제주, 영월과 원주 간의 유의미한 차이를 나타내고, 신장(F(3, 16)=7.752, p=0.002)의 경우 제주와 강릉, 원주와 제주, 영월과 제주 간의 유의미한 차이를 나타냈다. 납의 경우 간(F(3, 16)=5.012, p=0.012)은 원주와 제주, 영월과 원주 간의 유의미한 차이를 나타냈고, 신장(F(3, 16)=0.938,

p=0.445)은 지역 간의 유의미한 차이는 나타나지 않았다.

분산분석과 사후검정을 통하여 납, 아연, 비소, 카드뮴의 경우 각 지역 간의 유의미한 차이를 나타냈다. 반면, 구리와 납의 경우 지역 간의 차이가 적은 것으로 나타났으며, 이는 각 지역의 환경적 요인들이 개구리 조직 내 중금속 축적에 중요한 영향을 미친다고 할 수 있다.

또한, 각 중금속 원소와 지역, SVL, 체중, 성별 등의 변수를

Table 8. BAF analysis of heavy metals (mean ± S.D, min, max) in liver, kidney, and soil

	Gangneung (n=5)		Yeongwol (n=5)		Wonju (n=5)		Jeju (n=5)	
	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney
Ni	0.055 ± 0.025 (0.028, 0.091)	0.279 ± 0.151 (0.073, 0.489)	0.009 ± 0.003 (0.005, 0.012)	0.045 ± 0.013 (0.031, 0.06)	0.124 ± 0.035 (0.068, 0.154)	0.293 ± 0.122 (0.176, 0.496)	0.004 ± 0.001 (0.003, 0.006)	0.041 ± 0.034 (0.021, 0.101)
Cu	6.407 ± 2.954 (3.639, 11.446)	2.886 ± 2.854 (1.119, 7.944)	1.369 ± 0.544 (0.764, 2.103)	0.658 ± 0.249 (0.433, 0.979)	6.116 ± 3.404 (2.906, 11.351)	1.628 ± 0.622 (0.972, 2.317)	0.873 ± 0.192 (0.685, 1.151)	0.562 ± 0.485 (0.247, 1.411)
Zn	0.289 ± 0.086 (0.203, 0.432)	0.445 ± 0.105 (0.354, 0.576)	0.040 ± 0.015 (0.033, 0.059)	0.115 ± 0.021 (0.092, 0.142)	0.236 ± 0.035 (0.188, 0.278)	0.359 ± 0.079 (0.266, 0.472)	0.109 ± 0.015 (0.088, 0.126)	0.363 ± 0.130 (0.252, 0.556)
As	0.006 ± 0.003 (0.002, 0.009)	0.012 ± 0.005 (0.008, 0.021)	0.001 ± 0.000 (0.001, 0.002)	0.005 ± 0.002 (0.002, 0.008)	0.008 ± 0.001 (0.006, 0.009)	0.012 ± 0.004 (0.007, 0.019)	0.002 ± 0.000 (0.002, 0.002)	0.015 ± 0.004 (0.011, 0.021)
Cd	0.975 ± 0.619 (0.557, 2.065)	3.736 ± 1.656 (2.336, 5.753)	0.240 ± 0.087 (0.139, 0.342)	0.829 ± 0.233 (0.508, 1.085)	0.556 ± 0.145 (0.418, 0.786)	1.380 ± 0.486 (1.025, 2.008)	0.177 ± 0.045 (0.125, 0.236)	3.743 ± 2.046 (1.875, 6.795)
Pb	0.080 ± 0.088 (0.013, 0.226)	0.259 ± 0.177 (0.060, 0.536)	0.022 ± 0.011 (0.005, 0.033)	0.122 ± 0.068 (0.041, 0.206)	0.069 ± 0.044 (0.012, 0.126)	0.104 ± 0.053 (0.023, 0.167)	0.004 ± 0.002 (0.003, 0.008)	0.049 ± 0.068 (0.006, 0.169)

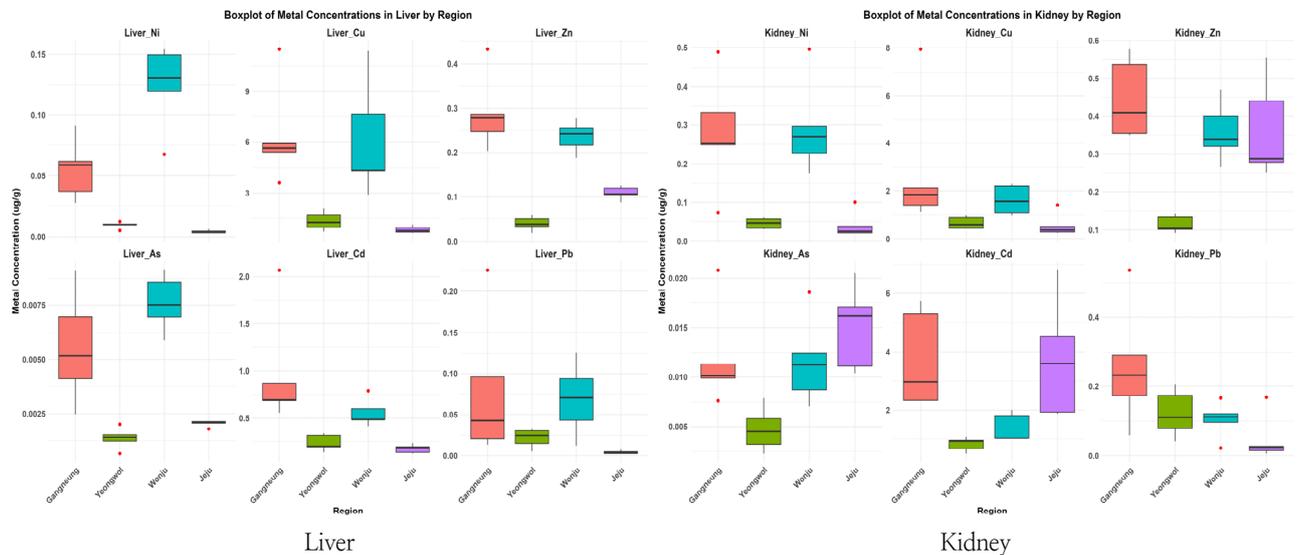


Fig. 3. Biological Accumulation Factor (BAF) of Metals in Liver and Kidney by Region

Table 9. BAF analysis of heavy metals in liver, kidney, and soil: ANOVA results

Metal	Liver BAF		Kidney BAF	
	F-value	p-value	F-value	p-value
Ni	F(3, 16)=34.24	p<0.001	F(3, 16)=10.08	p<0.001
Cu	F(3, 16)=8.59	p=0.001	F(3, 16)=2.64	p=0.084
Zn	F(3, 16)=28.84	p<0.001	F(3, 16)=11.72	p<0.001
As	F(3, 16)=20.61	p<0.001	F(3, 16)=5.52	p=0.009
Cd	F(3, 16)=6.44	p=0.004	F(3, 16)=6.55	p=0.004
Pb	F(3, 16)=2.70	p=0.080	F(3, 16)=3.67	p=0.035

적용하여 회귀분석(Regression analysis), 결정 트리 분석(Decision tree analysis), 랜덤 포레스트(Random forest)로 분석한 다음, 상대적 중요성을 확인한 결과 지역이 가장 중요한 영향으로 작용했으며, 그다음으로 SVL, 체중, 성별 등이 영향을 미쳤다. 중금속 6종류의 경우 모두 간과 신장에서 지역이 가장 중요한 변수로 작용했으며, SVL과 체중도 상당한 영향을 미친 것으로 나타났다(Table 7).

지금까지 상관관계와 랜덤 포레스트로 분석을 한 결과 각각 상반된 결과를 도출하였는데, 이는 두 모델의 분석 방식 차이에 기인한 것으로 판단된다. 상관관계의 경우 두 변수 간의 단순한 직선적인 관계만을 측정하지만, 랜덤 포레스트의 경우 복잡적이고 비선형적 관계와 상호작용을 고려하여 결과를 도출한다. 이 두 분석 결과가 다르다는 것은 데이터에 비선형 관계 또는 상호작용이 존재하며, 다중 변수 간의 복합적인 영향이 크다는 것을 의미한다.

3.4 생물농축계수(Biological Accumulation Factor, BAF)

각 지역에서 검출된 중금속의 값을 BAF 공식에 대입하여 BAF 값을 그래프(Fig. 3)로 시각화하였으며, 그다음 각 지역의 중금속에 대한 평균 및 표준편차 등의 값을 이용하여 분석하였다(Table 8). 그 결과, 총 6개의 중금속 원소 중에서 강릉의 간에 구리가 약 6.4배로 농축 정도가 가장 높게 나왔으며, 영월의 간의 비소가 가장 낮은 약 0.001배로 농축된 것으로 나왔다.

또한, BAF 결과로 지역을 변수로 일원 분산분석(One-way ANOVA)을 실행하였으며, 니켈, 아연, 비소, 카드뮴의 경우 간과 신장에서 모두 유의미한 차이를 나타냈고, 구리의 경우 간에서만 유의미한 차이가 있으며, 신장에서는 유의미하지 않았다. 반면, 납의 경우 신장에서만 유의미한 차이를 나타냈다(Table 9).

BAF 분석 결과 각 중금속이 지역별로 큰산개구리 내에서 농축 정도가 달라졌으며, 이는 인위적 요인 및 환경 오염에 따라 생물농축 정도가 크게 달라짐을 보여준다. 니켈, 아연, 비소, 카드뮴의 경우 간과 신장에서 유의미한 차이를 나타냈으며, 이는 각 지역의 환경 오염 차이가 중금속 축적에 중요한 요인으로 작용했다는 것을 의미한다. 반면, 구리와 납의 경우 특정 기관에 유의미한 차이를 보였으며, 이는 해당 금속들이 특정 장기에 축적되거나 혹은 특정 기관의 축적이 환경요인에 의해 영향을 받는다는 것을 나타낸다. 이러한 연구 결과는 각 지역의 중금속 오염 상태를 보여주며, 환경의 질 평가 등 효과적인 자료로 이용할 수 있을 것이다.

4. 결론

현재 사회의 무분별한 산업활동은 생태계에 광범위한 영향을 미치며, 이에 따라 수많은 생물종이 멸종하거나 멸종 위기에 처해 있다. 양서류는 생태계에 중요한 중간자 역할을 수행하는 생물군임에도 불구하고, 이들의 보존 노력은 미미한 실정이다. 본 연구는 양서류의 서식에 영향을 미치는 다양한 요인

중 중금속에 초점을 맞추어, 양서류의 중금속 생물농축 특성을 분석하고 이를 바탕으로 보전방안을 모색하였다.

연구 대상으로는 큰산개구리를 선정하였으며, 간과 신장을 중심으로 중금속 농축 특성을 분석하였다. 그 결과 간에서는 구리와 아연 순으로 가장 높게 나왔고, 신장에서는 아연과 구리 등이 가장 높은 함량을 나타냈다. 이러한 패턴은 장기의 생리적 기능과 관련이 있을 가능성이 크다. 간은 중금속의 대사와 해독을 담당하는 주요 장기로, 구리가 주로 저장되거나 처리되는 경향이 있다. 반면, 신장은 체내 전해질 균형과 배설을 담당하는 장기로, 아연이 재흡수 또는 배설 과정에서 높은 농도로 검출된 것으로 판단된다.

선행 연구인 황소개구리(*Lithobates catesbeianus*)의 중금속 연구에서는(Lee and Ko, 2001) 신장에서 동일한 결과가 나타났으나, 간에서는 아연이 높고 구리가 그 다음으로 높은 상반된 결과를 보였다. 또한, 농축 함량을 비교한 결과 본 연구의 간에서 구리는 총 4개 지역에서 평균 32.35 $\mu\text{g/g}$ 으로 황소개구리 중 정상 개체(8.48 $\mu\text{g/g}$)와 기형 개체(10.3 $\mu\text{g/g}$)보다 높게 검출되었다. 아연의 경우 본 연구에서는 평균 17.89 $\mu\text{g/g}$ 의 농축 함량을 보였으며, 황소개구리의 경우 정상 개체(27.1 $\mu\text{g/g}$), 기형 개체(20.7 $\mu\text{g/g}$)보다 다소 낮게 검출되었다. 신장의 경우 아연의 경우 본 연구에서는 평균 37.1 $\mu\text{g/g}$ 의 농축 함량을 보였으며, 황소개구리의 경우 정상 개체(16.7 $\mu\text{g/g}$)와 기형 개체(25.4 $\mu\text{g/g}$)보다 높게 검출되었고 구리의 경우 본 연구에서는 평균 14.96 $\mu\text{g/g}$ 의 농축 함량을 보였으며, 황소개구리의 경우 정상 개체(2.23 $\mu\text{g/g}$) 기형 개체(15.9 $\mu\text{g/g}$)로 정상 개체보다는 높고 기형 개체와는 다소 비슷하게 검출되었다. 이는 종간의 차이와 서식 환경 및 개체 크기 등에 따른 차이로 볼 수 있다.

인위적 교란이 많이 발생하는 영월(탄광)과 원주(석산)의 경우 간에서 구리 > 아연 > 납 > 니켈 > 카드뮴 > 비소, 신장의 경우 아연 > 구리 > 납 > 니켈 > 카드뮴 > 비소 등으로 각각 함량 순위가 동일하게 나타났으며, 이는 영월과 원주의 생산활동에서 발생하는 인위적 교란이 간과 신장에서 중금속 축적에 영향을 미치는 것으로 분석된다. 또한, 본 연구에서는 지역, SVL, 체중, 성별 등의 변수를 적용하여 상대적 중요도를 분석한 결과 중금속 농축에 가장 큰 변수는 지역인 것으로 나타났으며, 그 다음으로는 SVL, 체중 등이 영향을 미쳤고 성별의 중요도는 낮은 것으로 분석되었다.

수질의 경우 전 지역에서 아연을 제외한 다른 중금속은 검출되지 않았으며, 본 연구지역에서는 수질이 중금속 농축에 직접적인 영향을 미치는 것보다 수생 식물 및 수생 동물 등의 먹이원 등을 통한 간접적인 영향으로 중금속이 축적되었을 것으로 판단된다.

본 연구 결과는 양서류를 환경 오염의 생물학적 지표로 활용할 수 있는 가능성을 시사하며, 특히 중금속 축적이 심한 지역에서는 서식지 보호구역을 설정하고, 환경 정화 조치를 강화하는 정책적 대응이 필요하다. 또한, 개구리의 중금속 축적 패턴을 지속적으로 모니터링함으로써 생태계 변화에 따른 영향을 평가하고, 이를 환경 정책 수립의 근거로 삼아야 한다.

장기적인 개체군 연구를 통해 환경변화에 따른 생물농축 패

턴을 분석함으로써, 양서류 서식지의 안정성을 확보하고 보전 대책을 마련하는 것이 중요하다. 이를 통해 양서류의 서식 환경을 보호하고, 생태계 건강성을 유지하기 위한 효과적인 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구에 야생동물 포획허가서를 허락해준 강릉시, 영월군, 원주시, 제주시의 관계자와 많은 지원과 관심을 주신 (주) 애일의 이상기 소장님, 한승필 이사님, 김강일 박사님에게 감사드리며, 인천대학교 동물분류학실험실의 김정호 선생님과 김한울 선생님, 그리고 Bayarsaikhan Ulzijargal 선생님의 연구 조언에 감사드립니다.

References

- Anguiano, O. L., Montagna, C. M., Chifflet de Llamas, M., Gauna, L. and Pechende D' Angelo, A. M. (1994). "Comparative toxicity of parathion in early embryos and larvae of the toad, *Bufo arenarum* Hensel." *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 52, pp. 649-655.
- An, C. K., Hong, S. G., Na, S. M., Do, J. S., Oh, K. C. and Yi, H. B. (2020). "Comparison Study of the Snout-vent Length (SVL) and the Biomass for the Climate Change Sensitive Species, Narrow-mouthed Toads (*Kaloula borealis*, Endangered Species II), at the three different areas (Seoul, Nonsan, Busan) of South Korea." *J. Wetlands Res.*, Vol. 22(1), pp. 8-14.
- Bank, M. S., Crocker, J., Connery, B. and Amirbahman, A. (2007). "Mercury bioaccumulation in green frog (*Rana clamitans*) and bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles from Acadia National Park, Maine, USA." *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 26, pp. 118-125.
- Bradford, D. F., Kramer J. L., Gerstenberger S. L., Tallent-Halsell N. G. and Nash M. S. (2012). "Mercury in Tadpoles Collected from Remote Alpine Sites in the Southern Sierra Nevada Mountains, California, U.S.A." *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 62, pp. 135-140.
- Browne, C. L. and Dumont J. N. (1979). "Toxicity of selenium to developing *Xenopus laevis* embryos." *J. Toxicol Environ. Health*, Vol. 5, pp. 699-709.
- Cogger, H. G., Zweifel, R. G. and Kirshner, D. (1998). *Encyclopedia of reptiles & amphibians*. Weldon Owen.
- DeForest, D. K., Brix, K. V. and Adams, W. J. (2007). "Assessing Metal Bioaccumulation in Aquatic Environments: The Inverse Relationship Between Bioaccumulation Factors, Trophic Transfer Factors, and Exposure Concentration." *Aquat. Toxicol.*, Vol. 84, pp. 236-246.
- Emergy, R. M. and McShane, M. C. (1980). "Nuclear Waste Ponds and Streams on the Hanford Site: An Ecological Search for Radiation Effects." *Health Phys.*, Vol. 38, pp. 787-809.
- Harri, M. M., Laitinen, C. J. and Valkama, E. L. (1979). "Toxicity and Retention of DDT in Adult Frogs (*Rana temporaria* L.)." *Environ. Pollut.*, Vol. 2, pp. 45-53.
- Henle, K. (1981). "A Unique Case of Malformations in a Natural Population of the Green Toad (*Bufo viridis*) and Its Meaning for Environmental Politics." *Brit. Herpet. Soc. Bull.*, Vol. 4, pp. 48-49.
- Huang, C. C., Xu Y., Briggler, J. T., McKee, M., Nam, P. and Huang Y. W. (2010). "Heavy Metals, Hematology, Plasma Chemistry, and Parasites in Adult Hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis*)." *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 29, pp. 1132-1137.
- Kim, I. N., Do, M. S., Lee, S. C. and Bae, Y. S. (2024). "A Study on the Differences in Body Condition, Size, and Climate Environment According to Sex of *Kaloula borealis*." *J. Wetlands Res.*, Vol. 26(2), pp. 160-167.
- Kim, Y. K. and Chung, H. M. (1995). "Toxic Effect of Cadmium on the Amphibian Axis Formation." *Environ. Korean J. Toxicol.*, Vol. 11, No. 1, pp. 37-42.
- Lee, D. (1993). "Residues of heavy metals in fish and frog sampled in Seoul and its vicinity" *Bulletin of the KACN ser.*, Vol. 12, pp. 151-156.
- Lee, D. P. and Ko, S. K. (2001). "The Incidence of Abnormalities in Bullfrog, *Rana catesbeiana*, and Their Heavy Metal Accumulations in the Yeongsan River System." *Korean. J. Environ. Ecol.*, Vol. 15(2), pp. 153-158.
- Lee, H. W., Son, S. W., Lee, D. P., and Min, B. Y. (1991). "Concentration of Heavy Metals in Amphibia Collected from Chilseo Area." *Inst. Environ. Res., Kyungnam Univ.*, Vol. 13, pp. 37-43.
- Lee, J. E., Park, J. K. and Do, Y. (2023). "Importance and Application of Amphibian Sperm Cryopreservation." *J. Wetlands Res.*, Vol. 25(4), pp. 257-266.
- Lefcort, H., Meguire, R. A., Wilson, L. H. and Ettinger W. F. (1998). "Heavy Metals Alter the Survival, Growth, Metamorphosis, and Antipredatory Behavior of Columbia Spotted Frog (*Rana luteiventris*) Tadpoles." *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 35, pp. 447-456.
- Linzey, D., J. Burroughs, L. Hudson, M. Marini, J. Robertson, J. Bacon, Nagarkatti, M. and Nagarkatti, P. (2003). "Role of Environmental Pollutants on Immune Functions, Parasitic Infections, and Limb Malformations in Marine Toads and Whistling Frogs from Bermuda."

- Int. J. Environ. Health Res*, Vol. 13, pp. 125-148.
- Lips, K. R., Reaser, J. K., Young, B. E. and Ibanez, R. (2001). *Amphibian monitoring in Latin America: A proto-col manual*. The Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
- Mendelson, J. R. 3rd, Brodie, E. D. Jr, Malone, J. H., Acevedo, M. E., M. A. Baker, M. A., Smatresk, N. J. and Campbell, J. A. (2004). "Factors Associated with the Catastrophic Decline of a Cloudforest Frog Fauna in Guatemala." *Rev. Biol. Trop*, Vol. 52, pp. 991-1000.
- Nebeker, A. V., Schuytema, G. S. and Ott, S. L. (1995). "Effects of Cadmium on Growth and Bioaccumulation in the Northwestern Salamander *Ambystoma gracile*." *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, Vol. 29, pp. 492-499.
- Nishimura, K. (1967). "Abnormal Formation of Visual Organs of Amphibian Larvae Induced by Radioactive Rainwater." *Mie Med. J*, Vol. 16, pp. 263-267.
- Read, J. L. and Tyler, M. J. (1994). "Natural Levels of Abnormalities in the Trilling Frog (*Neobatrachus centralis*) at the Olympic Dam Mine." *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, Vol. 53, pp. 25-31.
- Soil Environment Conservation Act, Act No. 4906, promulgated on January 5, 1995
- Song, J. E., Kim, M. S., Kim, I. S., Kim, H. T., Roh, I., Seo, S. W., Seo, E. K., Seo, J. K., Yang, J. Y., Woo, K. D., Won, H. J., Lee, Y. G., Lim, Y. H., Han, S. H. and Moon, M. G. 2009. "Roadkill of amphibians in the Korea National Park." *Korean J. Environ. Ecol.*, Vol. 23, No. 2, pp. 187-193.
- Tyler, M. (1989) *Australian frogs*. Viking O'Neil. Press. Victoria, Australia
- United Nations. (1997). *Glossary of Environment Statistics, Studies in Methods, Series F*, No. 67., United Nations, New York.
- Williams, N. (2007). "Protection fails to stem amphibian decline." *Curr. Biol.*, Vol. 17, pp. 339-340.
- Wyman, R. L. (1990). "What's happening to the amphibians?" *Conserv. Biol.*, Vol. 4, pp. 350-352.