

## 자동영상추적장치를 이용한 카드뮴 처리 *Oryzias latipes*의 행위독성연구

류지성, 이철우, 최필선, 최성수,  
류홍일, 이길철, 정규혁<sup>1</sup>, 박광식

국립환경연구원, <sup>1</sup>성균관대학교 약학대학

### Behavioral Toxicity of Cd-Treated *Oryzias Latipes* Using Computer-Automated Video Tracking System

Ji-Sung Ryu, Chul-Woo Lee, Pil-Son Choi, Sung-Su Choi, Hong-Il Rhu,  
Kyu-Hyuck Chung<sup>1</sup>, Kil-Chul Lee and Kwang-Sik Park

National Instituted of Environmental Research  
<sup>1</sup>College of Pharmacy, Sungkyunkwan University

#### ABSTRACT

Changes in certain fish behaviors are known to be very sensitive indicators of sublethal exposure to environmental contaminants. Therefore, behavioral toxicity tests, if properly designed, can be very useful to assess the influence of hazardous chemicals on fish. However, quantitative analysis of xenobiotic-mediated changes in locomotor behavior in fishes are rare, due mainly to the methodological difficulties. In general, fish movement has been known to be hypertrophic or hypotrophic according to the chemicals.

As a study of fish behavioral toxicities, we quantified the swimming movement of *Oryzias latipes* using computer-automated video tracking system. *Oryzias latipes* was exposed to cadmium of 128 mg/L for 1 hour in a limited aquaria, then the total swimming distance, the average swimming velocity, the histogram of turning angles, and the turning frequency were analyzed.

Fish treated with cadmium showed decreased swimming activities, decreased velocity, and decreased turning frequency, which means hypotrophic activity. From these results, the computer-automated video tracking system of this study seems to be a good tool for the evaluation of the potential ecotoxicological studies.

#### 서 론

‘행동’ 혹은 ‘행위 (behavior)’는 동물들이 가지고 있는 하나의 기본적인 특성으로서 환경변화에 따라 그 정도나 형태가 달라질 수 있다.<sup>1,2)</sup> 어류의 행위변화는 일조량, 기온 및 지리적 환경 변화에 따라 현저히 달라질 수 있는데 최근 들어서는 수

서 생물의 행위변화에 따른 하천 수질오염을 감시할 수 있는 장치가 개발되는 등 어류의 행위변화와 환경오염과의 상관관계를 규명하려는 보고들이 발표되고 있다.<sup>3,4)</sup> 화학물질에 의한 행위변화는 단시간에 고농도로 노출되는 경우에 주로 관찰될 수 있지만 저농도로 장기간 노출되는 경우에도 신경계 등 체내 호르몬변화에 따라 특이적으로 나타날 수 있다.<sup>5,6,7)</sup> 따라서, 이들 물질에 대

한 행위변화를 적절하게 평가할 수 있다면 독성 평가에 있어서 하나의 가치있는 지표가 될 수 있을 것으로 본다. 그러나 이러한 관점에서 어류를 대상으로 한 행위독성연구는 방법상의 어려움으로 인해 정량적인 평가가 곤란한 점이 있어 왔으며 이러한 관점에서 본 연구에서는 어류의 가장 기본적인 행동형태인 '유영'의 몇가지 요소들을 곤충류 등의 행위독성실험<sup>8,9)</sup>에 사용되어진 바 있는 자동영상추적시스템 (computer-automated video tracking system)을 이용하여 수치화함으로써 정성적인 행동의 요소를 정량화하고자 시도하였다.

어류의 행위변화를 유도하기 위한 시험물질로는 카드뮴을 사용하였으며 카드뮴의 영향을 조사하기에 앞서 먼저 카드뮴의 96시간 반수치사농도 (LC50)를 설정하고 반수치사농도보다 높은 농도로 노출시켜 이에 따른 개량송사리 (*Oryzias latipes*)의 급성적 유영변화를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험어

시험어로는 국립환경연구원에서 계대배양하고 1년 이상 사육한 개량송사리 (*Oryzias latipes*)를 사용하였다. 시험어 (체장: 2~4 cm, 체중: 0.2~0.3 g)는 하루 이상 폭기시켜 탈염소한 수돗물에서 사육하였으며 사육수의 온도는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH는  $7 \pm 0.5$ 를 유지하였다. 시험어는 모두 외관상 기형이 없으며, 건강한 것을 사용하였다.

### 2. 시험방법

#### 1) 급성어독성시험

국립환경연구원고시 제1997-9호 「화학물질유해성시험방법」<sup>10)</sup> 및 OECD Test Guidelines<sup>11)</sup>에 준하여 유수식시험계 (flow-through test system)를 이용하여 시험하였다. 시험물질처리는 20, 40, 60, 80 및 100 mg/L의 카드뮴 ( $\text{CdCl}_2$ , Sigma Chemical Co., Germany)용액을 탈염소수인 희석수와 일정비율로 희석하여 최종적으로 시험수조에 유입되는 카드뮴농도가 각각 2, 4, 6, 8 및 10 mg/L가 되도록 하였다. 각 수조에는 10 L의 시험용액이 일정하게 유지되도록 하였으며, 송사리는 각 처리농도군당 10마리로 하였다. 수조내의 pH, 수온, 용존산소 및

치사율은 24시간마다 측정 또는 관측하였으며, 치사어는 사망 후 즉시 제거하였다. 시험기간동안 조명시간은 하루에 12시간으로 하였다. 96시간 반수치사농도 (LC50)는 Probit 통계처리방법을 사용하여 산출하였다.

#### 2) 행위변화 측정

자동영상추적시스템 (computer-automated video tracking system)을 이용하여 카드뮴에 노출시킨 개량송사리의 행위변화를 대조군과 비교 관찰하였다. 자동영상추적시스템 (VIDEOTRACK 512, France)은 일정한 구역 내에서 시험동물의 행동을 카메라를 이용한 영상추적을 통해 실시간으로 관찰하고 시험자가 정해놓은 프로그램상의 입력조건에 따라 각 측정항목을 수치화하여 시험동물의 행위변화값을 정량화할 수 있도록 고안된 것이다. 24시간동안 절식시킨 개량송사리 1마리를 탈염소수가 담긴 관찰수조 ( $(W \times L \times H)$ :  $10 \times 12 \times 3$  cm)에 넣고 1시간동안 적응시킨 후 카드뮴용액을 처리하여 1시간동안 영상추적을 하였다. 카드뮴은 개량송사리에 대한 LC50의 20배인 128 mg/L의 농도로 처리하였으며, 측정항목으로는 이동거리, 이동속도, 운동빈도, 진행방향 각도에 따른 진행빈도 및 회전수를 측정하였다 (Fig. 1). 운동빈도의 경우 시험어가 초당 0.62 cm 이상의 속도로 움직일 때 하나의 움직임으로 인식하도록 설정하였고, 개량송사리가 유영하다가 진행방향을 바꿔 이동하는 빈도를 측정하기 위해 진행방향각도에 따라  $0 \sim 90^\circ$ ,  $90 \sim 180^\circ$ ,  $0 \sim -90^\circ$  및  $-90 \sim -180^\circ$ 의 네 경우로 설정하였다. 회전은 시계방향과 시계반대방향으로 나누어 측정하였다. 측정은 대조군 및 시험군 모두 각각 송사리 10마리씩을 사용하여 10회 반복하였으며 Student's t-test를 이용하여 통계처리하였다. 또한 측정된 모든 항목에 대해 변이계수 (coefficient of variation, C.V.)를 구하여 카드뮴 노출에 대해 민감도를 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 개량송사리에 대한 카드뮴의 반수치사농도

96시간 동안의 급성어독성시험으로부터 얻어진 용량-반응 곡선 (dose-response curve)은 전형적인

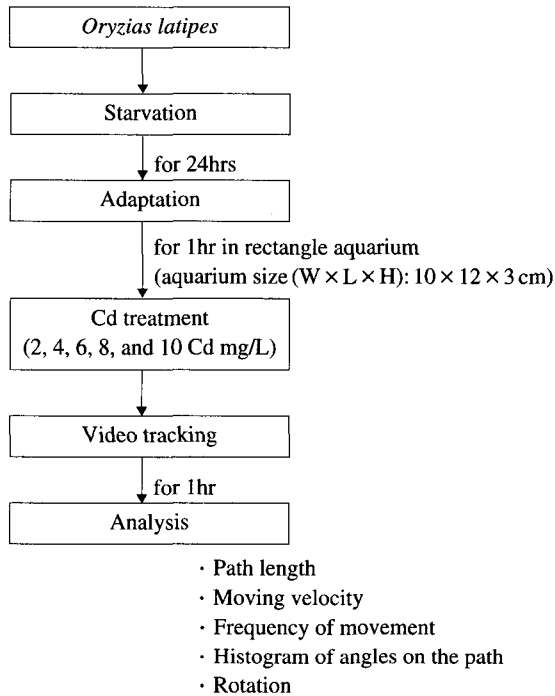


Fig. 1. Schematic flow diagram of quantitative analysis of fish swimming.

sigmoid 곡선을 나타내었으며 96시간 LC50는 6.38 mg/L로 계산되었다 (Fig. 2).

2. 카드뮴에 의한 개량송사리의 행동량 변화

개량송사리에 96시간 LC50의 20배인 카드뮴 128 mg/L를 1시간동안 처리하고 자동영상추적시스템을 이용하여 행위변화를 분석한 결과 실험기간동안 개량송사리의 이동거리, 이동속도, 운동빈도, 진행방향 각도에 따른 진행빈도 및 회전수가 대조군과 비교하였을 때 대부분 유의성을 가지고 감소하는 것으로 나타났다.

대조군과 비교하였을 때 평균이동거리는 11,938 cm에서 7,931 cm로 (Fig. 3), 평균이동속도는 3.64 cm/s에서 2.69 cm/s로 (Fig. 4), 평균운동빈도는 2,570회에서 941 회로 (Fig. 5) 감소하였다. 앞으로 유행하다가 0~90° 사이의 각도로 진행방향을 바꾼 회수는 4,533회에서 2,853회로, 90~180° 사이의 각도로는 826회에서 600회로, 0~-90° 사이의 각도로는 6,356회에서 3,405회로, -90~-180° 사

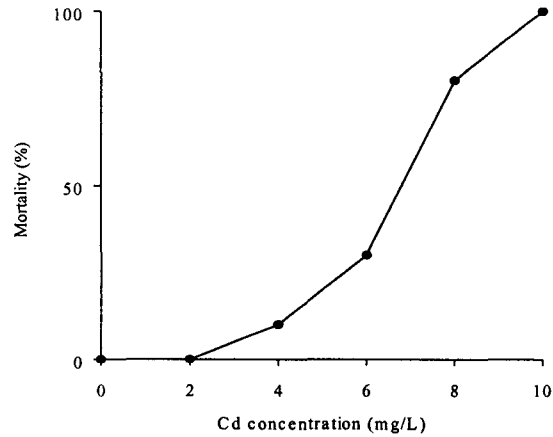


Fig. 2. The dose-response curve after 96-h exposures of *Oryzias latipes* to cadmium. n=10 fish per treatment.

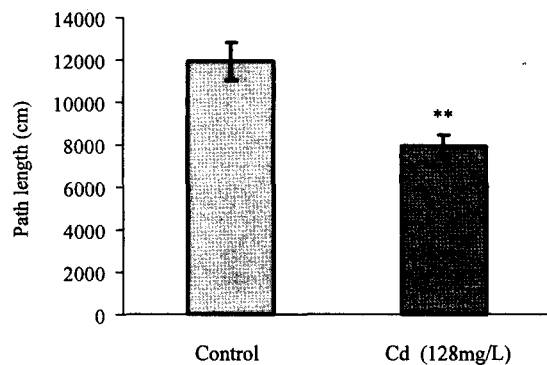


Fig. 3. Effect of cadmium on swimming distance of *Oryzias latipes* during a 60-minute exposure to 128 mg/L. Standard error bars are shown. \*\*Significantly different from the control group at p<0.01 (n=10).

이의 각도로는 969회에서 590회로 감소하였다 (Fig. 6). 회전수에 있어서 시계방향회전수는 283회에서 226회로, 시계반대방향회전수는 455회에서 242회로 감소하였다 (Fig. 7). 측정된 모든 항목에 대해 변이계수 (coefficient of variation, C.V.)를 구하여 카드뮴 노출에 대한 각 항목의 민감도를 비교하였으며 그 결과 대조군에서의 C.V. 값은 22.8%에서 38.4%의 범위를 나타내었고, 시험군에서는 20.6%에서 47.1%의 범위를 나타내었다 (Table 1).

고찰

어류의 행위 중 수영형태는 유해화학물질 등 외부의 자극에 대한 영향을 평가하는데 가장 손쉽게 관찰할 수 있는 행동의 정성적 관찰항목이라 할 수 있는데 이를 정량적으로 평가한다면 단순한 정성적 관찰에서 간과될 수 있는 구체적 행위변화형태를 얻을 수 있으며 더 나아가 이러한 결과는 생화학 혹은 생리적 측면에서의 독성 영향과 연관시켜 해석할 수 있는 수단이 될 수 있

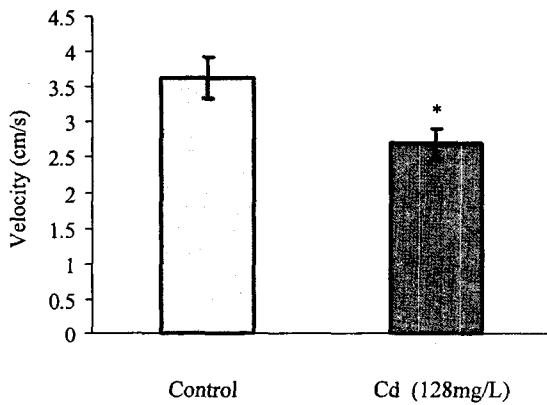


Fig. 4. Effect of cadmium on average swimming velocity of *Oryzias latipes* during a 60-minute exposure to 128 mg/L. Standard error bars are shown. \*Significantly different from the control group at  $p < 0.05$  ( $n = 10$ ).

다.

카드뮴의 장기간노출에 의한 어류의 행위변화는 균형잡히지 않은 불규칙한 운동 및 경련과 그 이후에 평형상실, 활동정지 및 마비가 뒤따라 나타난다는 보고<sup>5)</sup>가 있다. 이러한 보고는 카드뮴을 급성적으로 노출시킨 본 실험에서 나타난 행위둔화의 결과와도 유사한 것으로 행위의 둔감정도는 노출시간이 지남에 따라 증가되어짐을 알 수 있었다. 카드뮴은 칼슘과 같은 필수금속이온에 대한

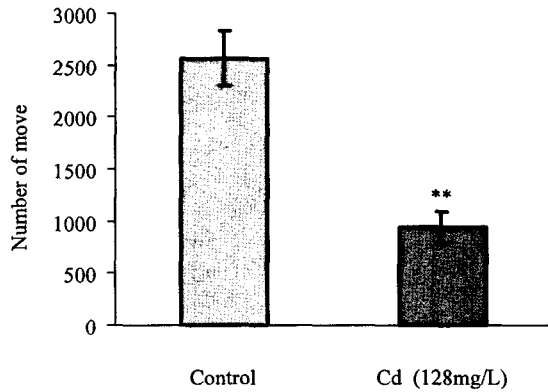


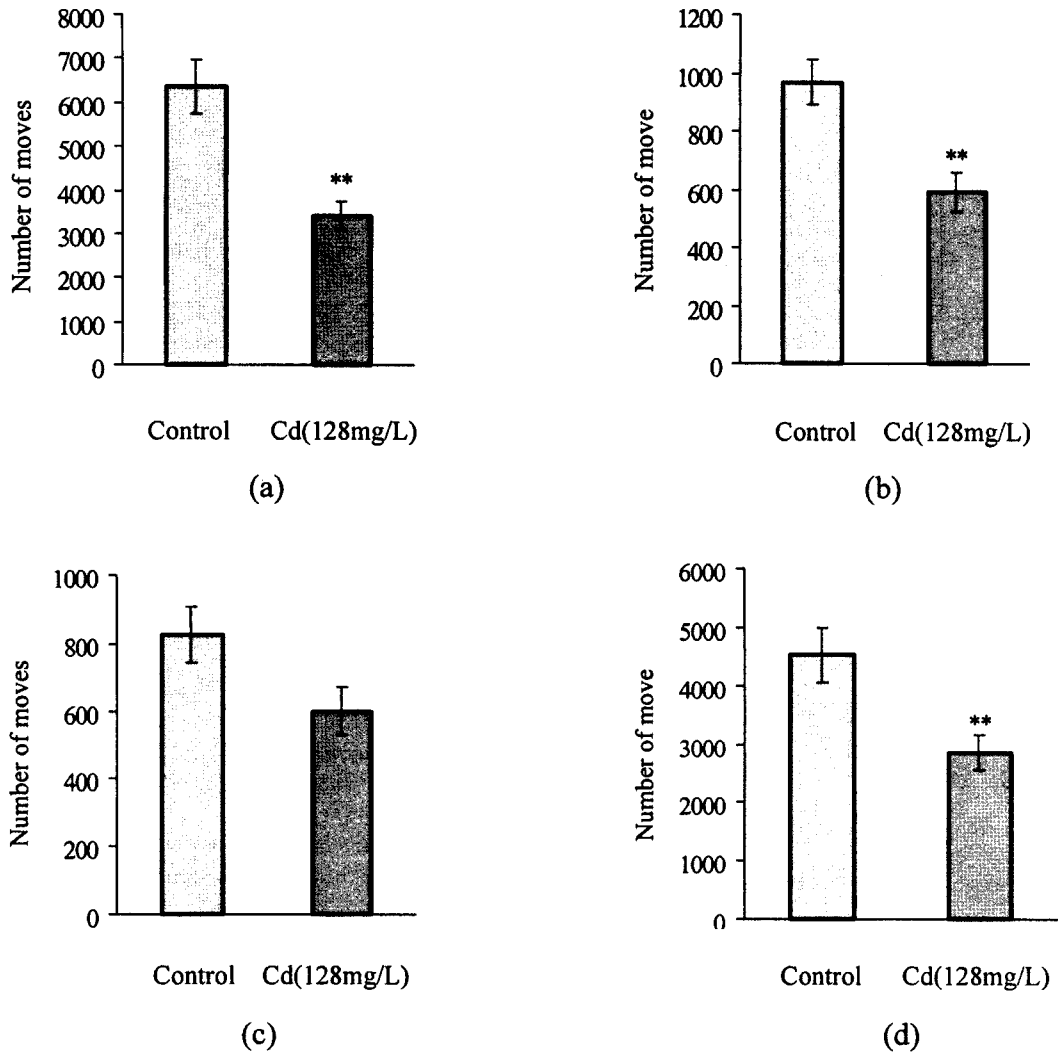
Fig. 5. Effect of cadmium on frequency of movement of *Oryzias latipes* during a 60-minute exposure to 128 mg/L. Standard error bars are shown. \*\*Significantly different from the control group at  $p < 0.01$  ( $n = 10$ ).

A move was counted on swimming with velocity above 0.62 cm/sec.

Table 1. Average Activity of Control and Cd-Treated Group During the Experimental Period (60min.)

	Control group			Test group			
	Mean	SD	C.V.(%)	Mean	SD	C.V.(%)	
Path length (cm)	11938.4	2716.3	22.8	7930.7	1634.1	20.6	
Moving velocity (cm/s)	3.64	0.88	24.2	2.69	0.65	24.2	
Frequency of movement (A number of times)	2569.7	799.7	31.1	940.6	442.8	47.1	
Histogram of angles on the path (A number of times)	0 ~ -90°	6355.8	1838.5	28.9	3404.7	1013.6	29.8
	-90 ~ -180°	969.1	226.7	23.4	590.4	199.1	33.7
	0 ~ 90°	4533.1	1421.0	31.3	2852.7	887.6	31.1
	90 ~ 180°	826.1	250.9	30.4	599.7	213.8	35.7
Rotation (A number of times)	Clockwise	282.9	108.5	38.4	226.4	76.2	33.7
	Counter-clockwise	455.4	133.8	29.4	241.7	73.6	30.5

n = 10, C.V. = (SD · 100 · mean<sup>-1</sup>)



**Fig. 6.** Effect of cadmium on the histogram of angles on the path of *Oryzias latipes* during a 60-minute exposure to 128 mg/L. a: 0 ~ -90°, b: -90 ~ -180°, c: 90 ~ 180°, and d: 0 ~ 90°. Standard error bars are shown. \*\*Significantly different from the control group at  $p < 0.01$  ( $n = 10$ ).

A move was counted on swimming with velocity above 0.62 cm/sec.

경쟁작용과 생체내 효소와 구조 단백질의 정상적 기능에 중요한 sulfhydryl 작용기에 대한 강한 친화력이 있어서 필수금속이온의 흡수 억제 및 효소와 단백질의 작용에 방해할 나타내는 것으로 알려져 있으며 동물의 행위와 관계가 있는 acetylcholinesterase를 억제시키는 것으로 여겨지고 있고<sup>12, 13)</sup> acetylcholin-esterase의 억제는 호흡과 관련된 근육의 마비로 카드뮴에 의한 어류사망을

일으킬 수도 있다.<sup>4, 5)</sup> 이와는 달리 본 실험실의 미발표된 한 연구에서 잉어 치어에 자극성이 강한 1% 염산을 처리했을 때 (pH 3.5) 잉어는 곧바로 회피반응을 보이고 격렬한 움직임이 증가되는 것이 관찰된 바 있다.

동물을 이용한 행위변화는 편차가 상대적으로 크기 때문에 반복수를 많이 하고 적절한 해석을 할 수 있는 통계적 처리가 필요하다. 본 실험에서

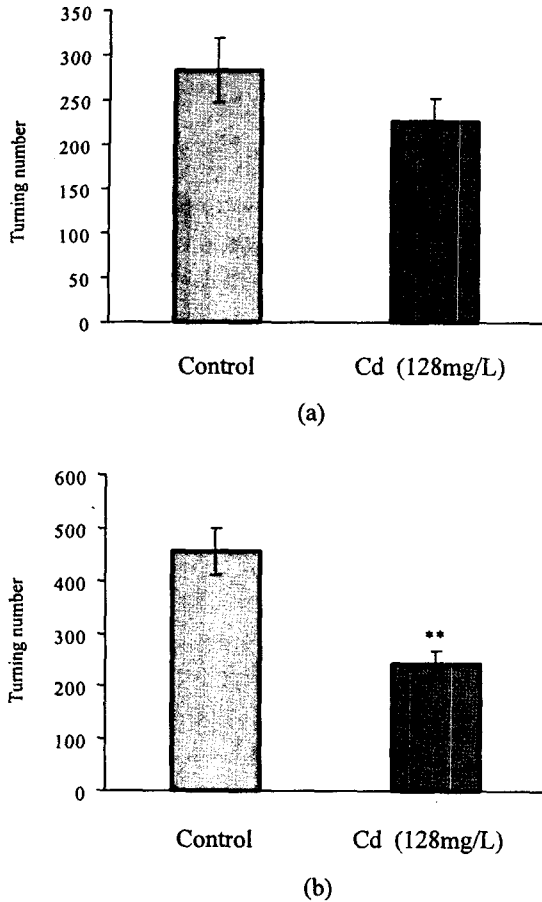


Fig. 7. Effect of cadmium on rotation of *Oryzias latipes* during a 60-minute exposure to 128 mg/L. a: clockwise rotation, and b: counterclockwise rotation. Standard error bars are shown. \*\*Significantly different from the control group at  $p < 0.01$  ( $n = 10$ )

측정된 모든 항목에 대해 변이계수 (coefficient of variation, C.V.)를 구하여 카드뮴 노출에 대해 민감도를 비교하였다. 대조군에서의 C.V. 값은 22.8%에서 38.4%의 범위를 나타내었고, 실험군에서는 20.6%에서 47.1%의 범위를 나타내었다 (Table 1). 이동거리는 대조군에서 22.8%, 실험군에서 20.6%의 C.V.값을 나타내었고 이동속도는 대조군에서 24.2%, 실험군에서 24.2%의 C.V.값을 나타내어 모든 측정항목중 가장 낮은 C.V.값을 나타내었다. 따라서 본 실험에서 측정된 실험항목 중에서 이동거리 및 이동속도가 카드뮴에 대해 가장 민감한 항목임을 알 수 있었다. 이와 같은 독성물질에

대한 어류의 행위변화에 대해서 보다 유용한 정보를 얻기 위해서는 최소의 행위변화를 나타낼 수 있는 역치점의 농도를 구하며 아울러 노출시간에 따른 평가도 수행되어야 할 것이다.

### 참고 문헌

1. Carlson N.R., Physiology and behavior. Fifth Ed. Allyn and Bacon, Boston (1994).
2. Kimball, J.W., The elements of behavior. In *Biology*. Fifth Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, 648-678 (1983).
3. Saglio P., Trijasse S. and Azam D., Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31(2), 232-238 (1996).
4. Devi M., Thomas D.A., Barber J.T. and Fingerman M., Accumulation and physiological and biochemical effects of cadmium in a simple aquatic chain. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 38-43 (1996).
5. Sorensen E.M.B., Metal poisoning in fish. CRC Press, Florida (1991).
6. Weber D.N. and Spieler R.E., Behavioral mechanisms of metal toxicity in fishes. In *Aquatic toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives*, Malins D.C and Ostrander G.K. (Ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, 421-467 (1994).
7. Hontela A., Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(1), 44-48 (1998).
8. Baatrup E. and Bayley M., Quantitative analysis of spider locomotion employing computer-automated video tracking. *Physiol. Behav.* 54, 83-90 (1993).
9. Sorensen F.F., Bayley M. and Baatrup E., The effects of sublethal dimethoate exposure on the locomotor behavior of the collembolan *Folsomia candida* (isotomidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 14(9), 1587-1590 (1995).
10. 국립환경연구원, 국립환경연구원고시 제 1997-9호, 화학물질유해성시험연구기관지정 등에 관한규정 별표 2 화학물질유해성시험방법 (1997).
11. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), Guidelines for testing of chemicals. Part 203 (1993).
12. WHO (World Health Organization), Cadmium-environmental aspects (Environmental Health Criteria 135) (1992).
13. Jonnalagadda S.B. and Rao P.V.V.P., Toxicity, bioavailability and metal speciation. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C(3), 585-595 (1993).