

해양생태독성평가를 위한 표준시험생물로서의 송사리 (*Oryzias latipes*)에 관한 연구

박경수* · 윤성진 · 이승민 · 김애향 · 박승윤 · 강덕영

국립수산과학원 서해수산연구소

Japanese Medaka, *Oryzias latipes* as a Test Animal for Marine Ecotoxicological Evaluation

Gyung Soo Park*, Seong Jin Yoon, Seung Min Lee, Ae Hyang Kim,
Soung Yun Park and Duk Young Kang

West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and
Development Institute, Incheon 400-420, Korea

Abstract - Japanese medaka, *Oryzias latipes* is widely distributed in the North East Asia including Korea, Japan and east China, and commonly used for freshwater toxicity tests and cytotoxicological studies worldwide. In this study, a series of experiments were conducted to identify the potential of the fish as a standard test species for saltwater toxicity evaluation such as marine receiving waters, ocean-dumped materials and sediment pore waters etc. Hatching, growth and mortality rates of the fish were estimated with the wide ranges of salinity from freshwater to seawater (35 psu). Direct exposure of the fertilized eggs in freshwater to the wide ranges of salinity (from 0 to 35 psu) without pre-acclimation to the saltwater revealed no significant differences in hatching rates by salinities ($p=0.24$). On the other hand, medaka larvae hatched in freshwater and exposed to saltwater directly showed high mortality at >25 psu treatment groups ($p<0.0001$). However, there was no significant difference in mortality of medaka larvae hatched in 13.8 and 14.2 psu at the wide ranges of salinities (0~35 psu). Growth rates of medaka larvae hatched in the above two salinities showed no differences in body length either from 0 to 35 psu treatment groups ($p=0.64$ for 13.8 psu group and $p=0.32$ for 14.2 psu group). The number of gill chloride cell in medaka larvae sharply increased when the larvae were exposed to high salinity. Reference tests with zinc chloride revealed 96h $LC_{50}=8.84$ (7.19~10.87) mg L^{-1} using 7~10 day old medaka larvae. These were comparable or better sensitivity in comparison with the other standard test species such as North American sheepshead minnow *Cyprinodon variegatus*. Based on the results of these experiments, hatching rates and larval mortality of medaka must be good toxicity parameters for seawater bioassay and the species seems to be a good standard species for both the freshwater and seawater toxicity test.

Key words : *Oryzias latipes*, Japanese medaka, salinity, test species, marine ecotoxicology

* Corresponding author: Gyung Soo Park, Tel. 032-745-0530,
Fax. 032-745-0549, E-mail. gspark@momaf.go.kr

서 론

송사리는 한국을 비롯한 일본, 중국 및 타이완 등지의 담수계에 주로 서식하나 기수 및 염전에도 서식하는 광염성 어종이며(Yanagishima and Mori 1975; Miyamoto *et al.* 1986; Haruta *et al.* 1991), 수질오염의 생물학적 지표종(Hiraoka and Okuda 1983, 1984)일 뿐만 아니라, 생물검정용 시험생물(Shima and Shimada 1994; Rao *et al.* 1997; Chen and Cooper 1999)로서 널리 활용되고 있다. 또한 사육이 용이하고 생활사(generation time)가 짧아서 분자생물학을 포함한 다양한 생물학적 연구의 시험 생물로서도 널리 이용되고 있는 종이다(Ozato *et al.* 1989; Ozato and Wakamatsu 1994; Sakamoto *et al.* 2001). 그러나 상기 어류는 광염성 어종임에도 불구하고 주로 담수에 분포하므로 해양생태독성실험보다는(Tachikawa and Sawamura 1994; Schlenk and El-Alfy 1998; El-Alfy *et al.* 2001; El-Alfy *et al.* 2002) 주로 담수계 독성실험으로 제한되어 왔으며(Marty *et al.* 1991; Skinner *et al.* 1999; Metcalfe *et al.* 2000; Chen *et al.* 2001; Gerhardt *et al.* 2002; Bhattacharyya *et al.* 2003), 국내에서도 담수 독성 및 화합물질 독성 실험에 많이 이용되어 왔다(신 등 1985; 이 등 1987; 엄 등 1987; 김 등 1988; 최 등 1992; 박 등 1996; 김 등 2003). 그러나 담수계 생태독성실험과 달리, 해수는 다양한 염분 범위를 보이며, 특히 독성실험시 실험대상 물질의 염분을 인위적으로 조절할 경우 대상물질 본래의 독성이 변하게 되므로(Hall *et al.* 1995; Hall and Anderson 1995) 가능한 한 인위적 염분 조절 없이 독성 실험을 수행하게 된다. 따라서 해양생태독성 실험 생물로서의 가장 중요한 요소는 광범위한 염분 내성이다. 또한 수서독성평가를 위해서는 분해자, 생산자, 소비자를 대표하는 최소 3종 이상을 이용하여 평가하도록 권장하고 있으며, 소비자를 대표해서 주로 소형 어류 및 동물플랑크톤이 많이 이용되고 있다(USEPA 1993). 따라서 생태독성용 실험생물로서의 송사리는 실험실 사육이 가능하고 생활사가 짧기 때문에 염분 내성 및 표준독성 물질에 대한 민감도가 입증된다면 해양생태독성 평가용 실험생물로서 매우 유용할 것으로 판단된다.

상기 연구는 기존의 송사리가 담수 생태독성 평가에 광범위하게 이용된 점을 고려하여 해양생태독성 연구의 표준생물로서 우선 고려되었다. 또한 국내의 해양생태독성 분야는 해양성 발광박테리아를 이용한 공정시험법(해양수산부 1998)을 제외하고는 타 생물을 이용한 시험방법의 부재 등으로 독성평가가 매우 산만한 형태로 진행되고 있으며, 적용 분야 또한 매우 제한적이다.

따라서 상기 연구의 주목적은 송사리가 해양생태독성 실험의 표준시험생물로서의 가능성을 구명하는데 있다. 특히 어류를 이용한 생태독성 평가의 end point가 수정난의 부화율 및 자치어의 사망률인 점을 감안하여 주로 담수에 분포하는 송사리가 염분 변화에 따른 부화율, 자어의 생존율 및 성장률의 차이, 표준독성물질에 대한 사망률, 부화율 및 기형율의 차이 등을 구명하였다.

재료 및 방법

상기 연구에 사용된 송사리는 국립환경연구원에서 내분비장애물질 연구를 위하여 사육하고 있는 성어를 분양 받아 실험실에서 사육한 후 수정난과 치어를 이용하여 실험을 수행하였다(4년 이상 사육). 송사리의 사육 환경은 수온 22~25°C을 유지하였으며, 광도는 500 lux, 광주기는 14시간 조명, 10시간 무조명을 유지하였다. 먹이는 상업용 관상어 사료인 TetraMin flake (Tetra Werke, Germany)와 알테미아 유생(OSI PRO80™, USA)을 투여하였고, 사육수는 수돗물을 일반 필터로 1차 여과한 후, 카본 필터로 2차 여과하여 사용하였다. 실험에 사용된 해수는 연구소 전면수역(인천광역시 중구 을왕리 부근 해역)에서 채수된 해수를 모래 여과기를 거쳐 고압 여과한 후 카본 필터를 이용하여 재여과 하였다. 상기 해수는 실험에 사용하기전 GF/F(Whatman)로 여과한 후 다시 0.45 µm membrane filter (Advantec MFS Inc)로 여과하여 사용하였다. 염분 조절을 위한 희석수는 역삼투 방식을 이용한 초순수를 이용하였다. 염분내성 실험을

Table 1. Test conditions for the definitive acute toxicity test with the Japanese medaka, *Oryzias latipes* larvae

Test conditions	Static acute
Test type	Static non-renewal
Duration	48hrs/96hrs
Endpoint	Mortality, abnormality, growth rates
Temperature	25 ± 1°C
Dilution water	Filtered seawater/DI water
Photoperiod	14L : 10D
Test chamber size	500 mL
Test solution volume	300 mL
Age of test animals	7~10 days after hatched
Renewal of test solution	None
Number of animals per chamber	10
Number of replicates per concentration	3
Feeding regime	Brine shrimp nauplii
Test solution aeration	Less than 100 bubbles/min until saturation
Test concentrations	7 and control
Test acceptability criterion	90% or greater survival in control

Table 2. Summary of test conditions for Japanese medaka, *Oryzias latipes* embryo hatching test

Test parameters	Static acute
Test type	Static non-renewal
Duration	15 days
End points	Hatching rates
Temperature	25 ± 1°C
Light quality and photoperiod	Ambient laboratory light
Dilution water	Filtered seawater
Test chamber size	500 mL
Test solution volume	250~400 mL
Renewal of test solution	None
Age of test animals	Less than 24 hr after fertilized
Number of embryos per chamber	10
Number of replicates per concentration	3
Feeding regime	Not required
Aeration	4~5 bubbles per second
Test concentrations	7 and control
Test acceptability criterion	90% or greater hatching in control

위한 해수는 가장 높은 염분인 35 psu을 전술한 해수에 천일염을 추가하여 제조한 후 초순수를 이용하여 30, 25, 20, 15, 10, 및 5 psu로 조절하였고, 0 psu는 희석수로 사용된 초순수를 이용하였다.

실험기간동안 수온, 염분, 용존산소 및 pH는 수질측정기 (YSI 556MPS, USA)를 이용하여 매일 측정하였으며, 증발에 의한 실험구내의 염분 증가를 방지하기 위하여 유리 덮개를 이용하였다.

독성 실험은 비교환정수방식 (static non renewal test)이며, 실험조건에 대한 상세한 내용은 Table 1과 2에 기술하였다. 독성실험은 항온실 내에서 수행하였으며, 실험구의 수온 변화를 최소화하기 위하여 수욕조에 실험용액이 포함된 비이커를 무작위로 배치하여 실험하였다.

수정난의 부화율 실험을 위해서는 사육 수조내에서 인공산란사에 부착된 수정난을 분리하여 건강한 개체만을 골라 10개체씩 시험 용액이 포함된 500 mL 비이커에 넣고(시험용액은 약 300 mL) 15일간 실시하였으며, 사망한 개체는 수질 악화를 방지하기 위하여 즉시 제거하였다. 송사리의 자어를 이용한 성장률 및 사망률 실험을 위해서 부화후 약 7~10일된 일정크기의 개체를 선별하여 10개체씩 500 mL 비이커에 넣고(시험용액 300 mL) 48~96시간 동안 노출 실험을 실시하였다. 개체의 성장률은 실험 시작 전에 30 개체를 무작위로 선별하여 체장 (body length)을 측정하여 초기 체장으로 이용하였고(4.44 ± 0.20 mm), 실험 종료후에 전 개체를 대상으로 다시 체장을 측정하여 그 차이로 일일 체장성장률을 계산하였다. 체장 측정은 현미경 (Olympus SZX-ILLB200, Japan) 하에서 실시하였으며, 최소 측정단위는 0.01 mm 이다.

표준물질을 이용한 송사리 자어의 민감도 실험을 위한 표준용액은 copper sulfate pentahydrate (CuSO₄ · 5H₂O, first grade, Sinyo Pure Chemicals Co. LTd), cadmium chloride (CdCl₂, ACS reagent, Sigma-Aldrich), zinc chloride (ZnCl₂, ACS reagent, Sigma-Aldrich)를 초순수에 용해하여 제조하였다. 농도별 표준용액은 최고 농도의 표준 용액을 제조한 후 이를 순차적으로 희석하여 제조하였으며, 실험방법은 염분 내성 실험과 동일하다.

염분에 따른 송사리 자어의 염분 적응력을 실험하기 위하여 다양한 염분에 노출된 송사리 자어의 아가미내 염세포 출현율을 검정하였다. 각각의 염분에 노출된 송사리 자어는 whole body 상태로 10% 중성포르말린으로 고정된 후, Bouin 용액에 재고정하였고, 이후 파라핀 상법으로 처리하여 4~5 µm 두께로 연속 절편하였다. 절편된 조직들은 hematoxylin과 eosin으로 이중 염색한 다음 광학현미경 (×40~×400)으로 관찰하였다. 절편 조직은 현미경용 디지털 카메라 (Leica DFC320, 7.3 Mpixel)를 이용하여 촬영한 후 화상해석 장치인 Leica QWin & Imaging Workstations (Leica Microsystem, Germany)를 이용하여 염세포를 동정하였다.

염분에 따른 부화율 및 사망률의 유의성 검증을 위해서 분산분석 (ANOVA)을 실시하였으며, 다중비교 (multiple comparison)를 위하여 REGWQ test를 실시하였고, 상기 분석은 PC SAS를 이용하였다. 또한 각각의 표준물질에 대한 LC50, NOEC (no observed effective concentration), LOEC (lowest observed effective concentration)는 USEPA (1993)에서 제공하는 안내서에 따라 graphic method, probit analysis 또는 trimmed Spearman-Kärber method로 계산하였으며, 프로그램은 Toxcal 5.0 (Tidepool Scientific Software, USA)을 이용하였다.

결 과

1. 염분 내성 실험

염분에 따른 송사리 자어 및 수정난의 사망률을 측정하기 위하여 담수에서 사육된 개체를 순치 기간 없이 다양한 염분의 해수에 직접 노출시켜 부화율 및 생존율을 측정하였다. 실험에 이용된 모든 개체는 담수에서 산란, 수정 및 부화가 이루어진 개체를 이용하였다. 우선 염분 구간별 수정난의 부화율은 모든 구간에서 83.3~100%의 부화율을 보였으며, 대조구(담수)의 부화율 평균(100%)과 유의적 차이를 보이지 않았다 ($F=1.38$, $p=0.24$, Fig. 1). 반면 담수에서 부화된 자어를 (7~10일)

0~35 psu 구간의 염분에 노출시킨 결과, 25 psu 이상의 염분구간에서는 사망률이 급증하여, 대조구와 유의한 차이를 보였다($F=76.34, p<0.0001$, Fig. 2). 특히 30 psu 이상의 염분에서는 전 개체가 사망하여 담수에서 산란, 수정 및 부화가 이루어진 자어는 30 psu 이상의 해수에 대한 염분 내성이 매우 적었다. 반면 담수에서 산란 및 수정된 난중에서 13.8 psu와 14.2 psu에서 부화시킨 자어는 전 염분 구간에서 87.5~100.0%의 생존율을 보였다(Fig. 3). 염분에 따른 평균 생존율에 대한 유의성 검증을 위하여 분산 분석을 실시한 결과, 13.8 psu 처리그룹은 $F=9.89, p<0.0001$, 14.2 psu 처리그룹은 $F=10.20, p<0.0001$ 로 염분 구간별로 평균 생존율에 유의한 차이가 있었다. 그러나 전 염분 구간에 약 90% 이상의 생존율을 보였으므로, 독성 실험에 대한 대조구 최소 조건인 생존율 90% 이상을 만족하여 독성 실험에는 문제가 없는 것으로 판단된다. 또한 상기 개체를 이용한 성장률 실험(체장) 결과 역시 염분에 따른 체장 증가율에 뚜렷한 차이가 없었다(Fig. 4). 13.8 psu 처리그룹의 경우, 일일 평균 체장 증가율에 대한 분산분석 결과, $F=0.74, p=0.64$ 이며, 14.2 psu 처리그룹의 경우 $F=1.20, p=0.32$

로 두 그룹 모두 노출된 염분에 따른 성장률의 차이는 없었다.

따라서 담수에서 산란 및 수정된 송사리의 수정란을 이용한 해양생태독성 실험시 별도의 염분 순치 없이 직접 해수에 노출하여 실험할 수 있으며, 자어를 이용한 사망률 실험의 경우, 담수에서 산란 및 수정된 개체를 해당 염분에서 부화시키거나, 또는 기수역 염분 범위에서 부화하여 실험에 이용할 경우, 염분 변화에 따른 문제는 없을 것으로 생각된다.

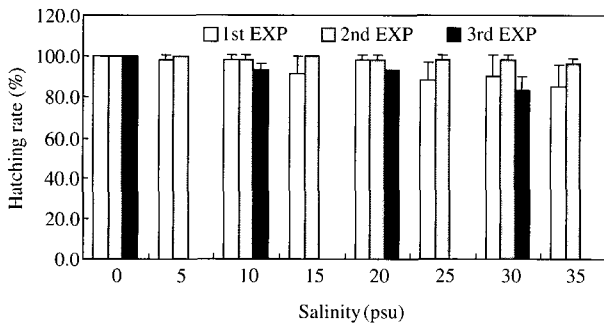


Fig. 1. Hatching rates of Japanese medaka spawned and fertilized in freshwater and exposed to various salinities.

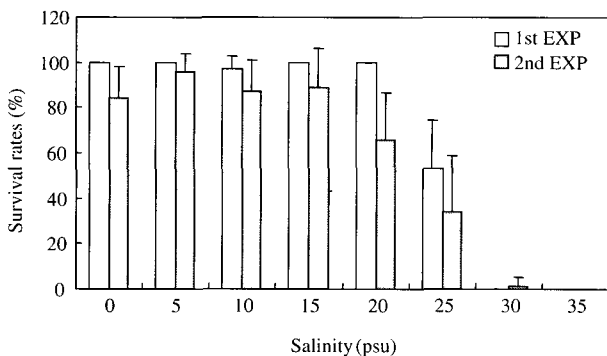


Fig. 2. Survival rates of Japanese medaka larvae hatched in freshwater following exposure to various salinity levels.

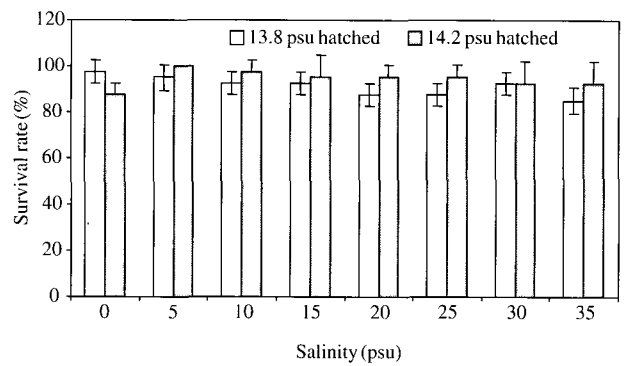


Fig. 3. Survival rates of Japanese medaka larvae hatched at 13.8 and 14.2 psu and transferred to various salinity levels.

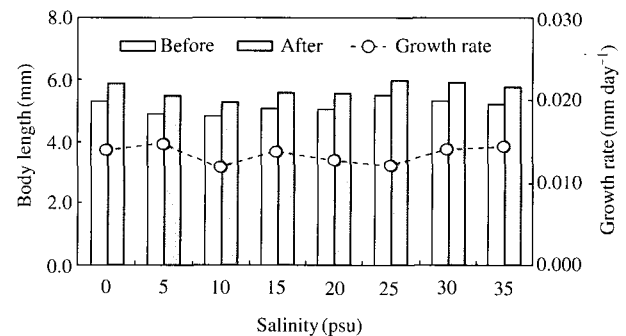
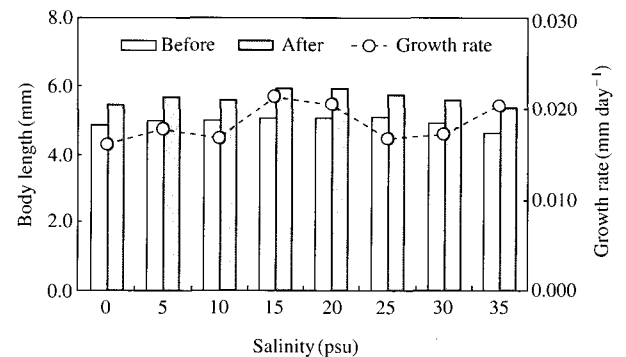


Fig. 4. Larval growth rates (as body length) of Japanese medaka hatched at 13.8 psu (top) and 14.2 psu (bottom), and exposed to wide ranges of salinities.

2. 표준독성물질에 대한 민감도 실험

송사리의 표준독성물질에 대한 민감도를 구명하기 위하여 수정란의 부화율 및 자어 사망률을 이용한 독성 실험결과, zinc chloride에 대한 48시간 및 96시간 LC₅₀은 각각 15.15 (9.51~24.15) 및 8.84 (7.19~10.87) ppm으로 나타났으며, copper sulfate에 대한 48시간 LC₅₀=0.043 (0.015~0.068) ppm, 96시간 LC₅₀=0.025 (0.008~0.048) ppm이었다 (Fig. 5). Zinc chloride 및 cadmium chloride를 이용한 15일 부화율 독성실험 결과, 10 ppm 이상의 농도에서 사망률이 급증하였다. 따라서 Graphic

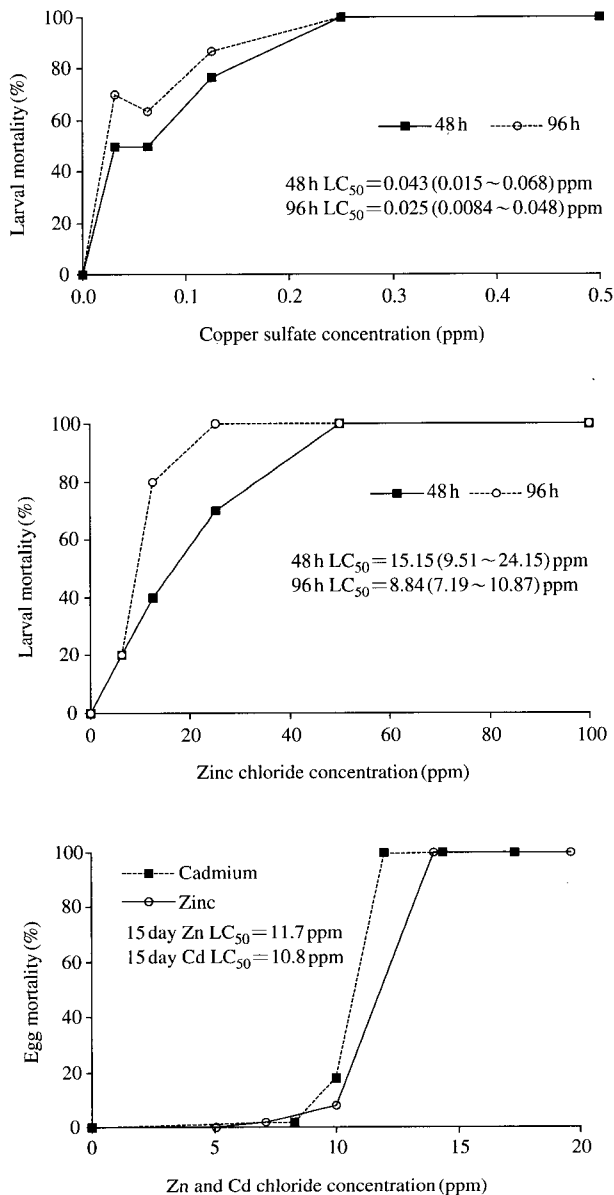


Fig. 5. Acute toxicity test of Japanese medaka *Oryzias latipes* using reference materials.

method에 의해서 산정한 송사리 수정란 부화율의 15일 LC₅₀은 zinc chloride의 경우 11.7 ppm, cadmium chloride의 경우 10.8 ppm으로 나타났다 (Fig. 5). 송사리 부화율의 경우 두 물질 모두 비슷한 결과를 보였으며, 일정 농도 이상에서만 사망 개체가 급증하는 현상을 보였다. 반면 자어 사망률의 경우, 농도-반응 (concentration-response)의 선형관계가 뚜렷하였으며, 또한 노출 물질에 따라 상이한 결과를 보였다. 또한 동일 물질에 노출실험 결과, 노출 시간을 고려할 때 자어 사망률이 수정란 부화율에 비하여 민감도가 높은 것으로 나타났다. 그러나 수정란의 부화율을 이용한 실험은 척추 만곡과 같은 아치사 현상을 관찰할 수 있는 장점이 있다. 실제로 카드뮴에 노출되어 부화된 개체중 꼬리의 기형을 (척추굴의 휘어짐)을 측정한 결과, 대조구에서는 기형이 발견되지 않았으나 8.3 ppm 및 10.0 ppm 실험구에서는 각각 22.4% 및 36.6%의 기형율을 보였다 (Fig. 6). 따라서 송사리 자어의 사망률에 의한 독성 실험과 더불어 수정란을 이용할 경우 아치사 영향 (sublethal effect)에 대한 평가도 가능할 것으로 생각된다.

고 찰

송사리속 (*Oryzias*)에 속하는 종은 전 세계적으로 약 14종이 보고되고 있으며, 수서생물중에서는 가장 보편적으로 이용되고 있는 실험생물이다 (Naruse *et al.* 1993; Naruse 1996; Roberts 1998). 이중 특히 *Oryzias latipes*는 실험실 사육에 관한 전 과정이 확립되어 있고 (Kirchen and West 1976; USEPA 1991; Iwamatsu 1994), 이에 따른 사육의 용이성과 풍부한 실험 자료를 바탕으로 전 세계적으로 이용되고 있는 실험생물이나 그동안 주로 담수계의 독성평가에 국한되어 이용되어 왔다. 따라서 본 어종이 해양 생태계 내에 존재하는 액상오염물질의 독성 시험에 표준생물로 이용될 수 있다면 기존의 풍부한 실험 자료와 시험 생물 개발에 소요되는 막대한 경비 및 시간을 절약할 수 있는 장점이 있다.

상기 실험중 가장 중요한 요소는 어류를 이용한 생태 독성평가지 가장 많이 이용되는 항목은 수정란의 부화율과 자어의 사망률이므로 염분에 따른 상기 요소가 상이한지를 검증하는데 주 목적이 있다. 송사리의 염분 내성에 대한 기존의 연구로는 상기 실험 목적과는 차이가 있으나 Inoue and Takei (2002)에 의한 4종의 *Oryzias* 속을 이용한 실험 결과와 비교하였다. 우선 상기 연구에서는 *O. latipes*의 경우 담수 사육 후 35 psu 해수로 이전한 성어는 10시간내 모두 사망하였으며, 17.5 psu의 해수로

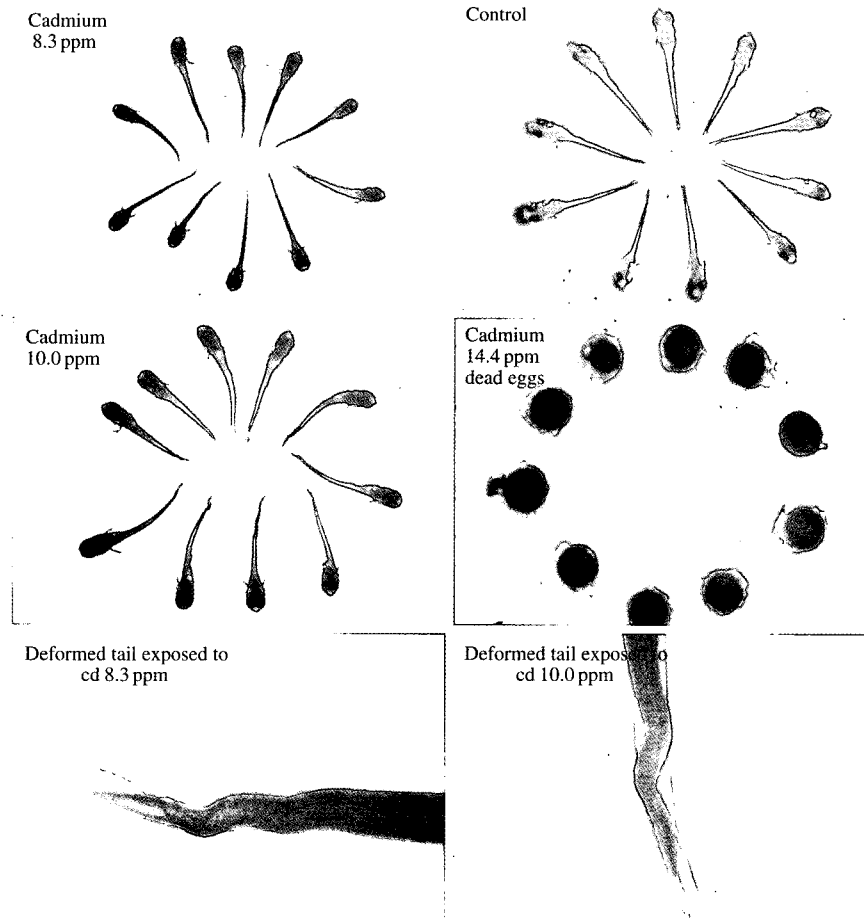


Fig. 6. Deformity and mortality of Japanese medaka fry and fertilized eggs exposed to cadmium.

이전한 성어는 25시간 이상 생존하였다. 17.5 psu 해수에 24시간 순치한 성어는 해수에서 30일 이상 생존하였으며, 담수에서 수정된 수정란의 해수내 부화율은 약 60%로 보고하여, 본 실험 결과와는 상이하였다. 우선 본 실험에서는 담수에서 사육된 성어가 35 psu 해수에서 모두 생존하였으며, 해수에 노출된 수정란의 부화율 역시 염분에 따른 뚜렷한 차이가 없었다. 상기 결과를 종합하면 송사리의 염분 적응범위는 35 psu 이상으로 판단된다.

일반적으로 해수를 이용한 독성실험시, 염분에 대한 실험 오차를 줄이기 위하여, 광염성 생물을 이용하거나 또는 대상 물질의 염분을 인위적으로 조절하는 방법이 있다. 그러나 이와 같은 방법은 독성평가 대상물질이 갖고 있던 본래의 성질이 해수중 염의 증감으로 인하여 독성이 변하는 경향을 보인다(Hall *et al.* 1995; Hall and Anderson 1995). 따라서 실험대상물질의 인위적 염분 조절보다는 광염성 생물을 이용하는 것이 바람직하다. 본 연구 결과, 담수에서 산란 및 수정된 송사리 난을 직접

해수에 노출하여 부화율을 이용한 독성 실험이 가능할 것으로 판단된다.

또한 자어를 이용한 사망률 실험의 경우, 담수에서 부화된 자어를 해수 범위의 염분에서 직접 노출 실험을 수행하는 것은 염분 충격에 의한 사망률 급증으로 불가능하므로, 이 경우에는 실험대상 염분에서 수정란을 부화시켜 얻은 자어를 사망률 실험에 이용하면 송사리를 이용한 해수독성평가가 가능할 것으로 판단된다.

Myers (1938)와 Darlington (1957)에 따르면 주로 담수에 서식하는 어류는 순수 담수어종, 담수에 주로 서식하나 해수에도 서식 가능한 종, 그리고 담수에서도 발견되나 해수와 밀접한 관계를 갖는 종으로 구분하였다. 이중 *Oryzias latipes*는 담수에 주로 서식하나 해수에도 서식 가능한 종으로, 주 서식지는 담수이나 해수에 대한 적응력이 충분한 종으로 사료된다(Inoue and Takei 2002).

일반적으로 담수 상태에서 사육된 송사리가 약 30 psu의 해수에 직접 노출될 경우 근육내의 수분 함량이 약

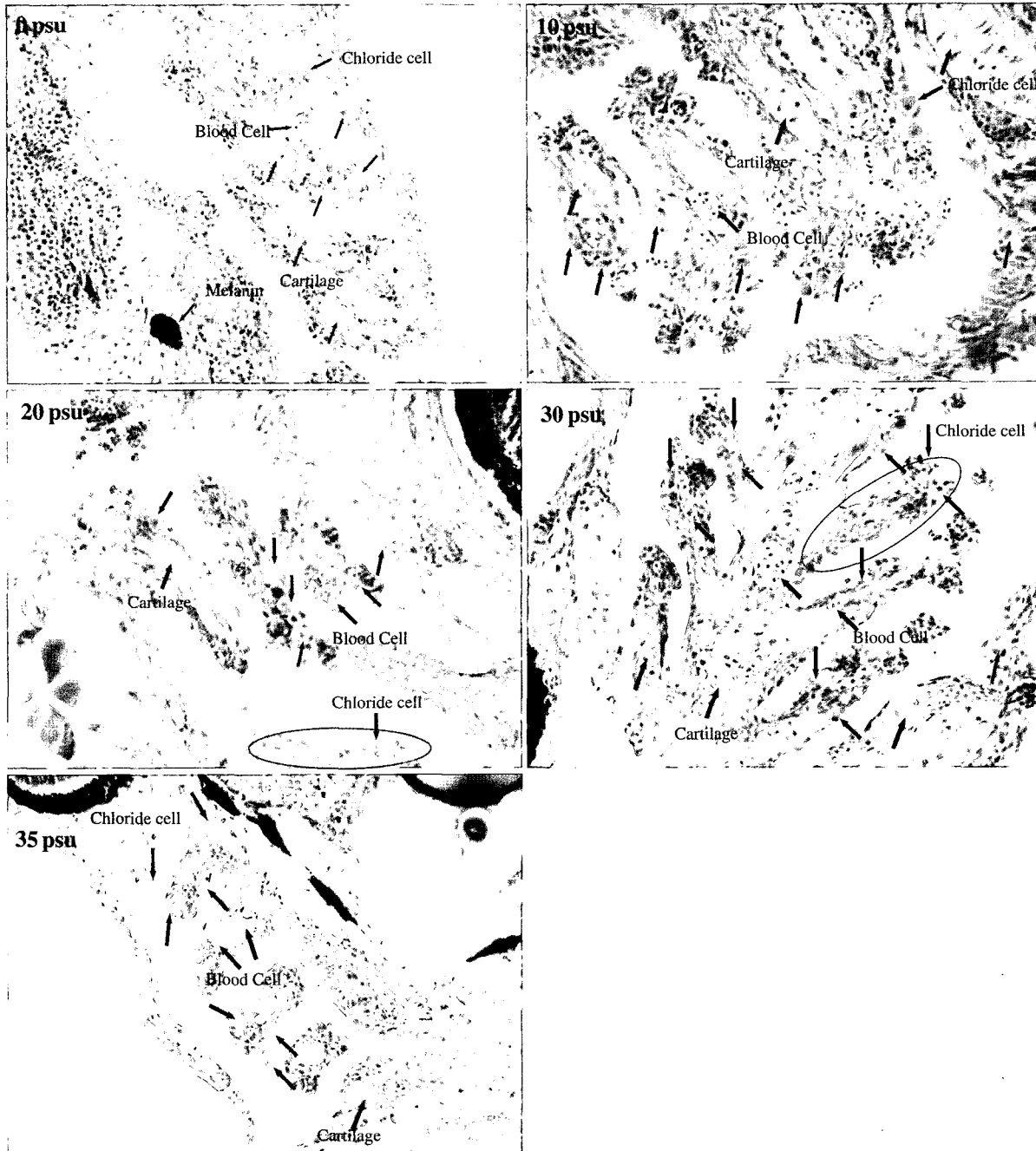


Fig. 7. Increase of gill chloride cells with the increase of salinity.

8% 정도 감소하며(노출 2시간 후), 1주 이내에 회복되고, 상기 반응은 대부분의 광염성 어류가 염분 적응 과정에서 발생하는 현상이다(Madsen 1990; Haruta *et al.* 1991; Sakamoto *et al.* 2001). 송사리의 삼투 조절 능력은 gill-chloride cell (Foskett and Scheffey 1982) 및 mitochondrion-rich cell (Van Der Heijden *et al.* 1997)이 연관된 것으로 구명되었으며, 해수에 노출될 경우 상기 세포

가 증가하여 삼투 조절 능력이 상승되는 것으로 사료된다(Pisam *et al.* 1987; Uchida *et al.* 1996, Evans *et al.* 1999). 실제로 0, 10, 20, 30 및 35 psu의 염분에 노출된 송사리 자어의 아가미 조직내에 염세포 수의 변화를 관찰한 결과, 담수에서 사육된 개체보다는 고염분에 노출된 개체에서 염세포 수가 급증하는 현상을 보였다(Fig. 7).

송사리의 부화에 관여하는 효소는 low choriolytic

Table 3. Comparison of LC₅₀'s by the test species of fish and reference materials. Data are cited at USEPA (United States Environmental Protection Agency) website (ECOTOX database, www.epa.gov/ecotox). SW=seawater/FW=freshwater

Test materials	Test species	Effect measurement	Media type	Duration	Exposure type	Concentration (ppm)	Reference
Zinc chloride	<i>Cyprinodon variegatus</i> (Sheepshead minnow)	Mortality	SW	96h	Renewal	1~10	USEPA
	<i>Menidia beryllina</i> (Inland silverside)					11.3 (9.1~14.3) 5.8~10	
	<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)	Hatching	FW	15d	Static	11.7	This study
		Mortality	FW	96h 48h		8.84 (7.19~10.87) 20	This study USEPA
Cadmium chloride	<i>Cyprinodon dearborni</i> (Killifish)	Mortality	SW	48h 96h	Static	27 25	
	<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)	Mortality	FW	96h		Renewal	
		Hatching		15d	Static	10.8	
	<i>Cyprinodon variegatus</i> (Sheepshead minnow)	Mortality	SW	96h	Static	15.9	USEPA
						1.23	
						0.18	
0.31							
<i>Menidia beryllina</i> (Inland silverside)	Mortality	SW	96h	Static	0.50		
					50		
						6.4	

enzyme과 high choriolytic enzyme 두 가지로 보고되고 있으며 (Yasumasu *et al.* 1997), 이들 효소의 염분에 따른 활성도 차이가 부화율의 차이를 일으키는 것으로 판단된다 (Yamagami 1973). 그러나 해수를 이용한 생물검정은 일정 염분에서 일괄적으로 이루어지므로 실험 결과에는 영향을 주지 않을 것으로 생각된다. 또한 염분에 따른 부화율 실험에서도 염분간 부화율의 차이에 대한 통계적 유의성이 없어 ($p=0.24$), 송사리 수정란의 부화율을 이용한 해양생태독성 실험에서 염분 변화에 따른 문제는 없을 것으로 판단된다.

흔히 송사리는 수질 오염의 지표종으로 이용되고 있다 (Hiraoka and Okuda 1983, 1984). 그러나 수질 오염의 대표종인 송사리가 독성물질에 대하여 민감한 반응을 보이는 이유는 독성실험에 이용되는 개체가 생활사 중에서 가장 예민한 시기인 수정란의 부화 시기와 초기 자어를 이용하기 때문으로 사료된다. 특히 부화된 개체의 기형율은 해당 독성물질에 대한 기형유발물질 함유 여부를 판단할 수 있는 유용한 항목으로 생각된다.

송사리의 표준독성물질에 대한 반응을 이용하여 민감도를 구명한 결과, 독성실험방법, 노출시간, 노출물질 및 life stage 등의 차이로 절대적 비교는 불가능하나 유사한 실험조건에서 비교해 볼때, 타 시험어류와 동등하거나 또는 민감한 결과를 보였다 (Table 3). 우선 동일한 물질을 사용한 zinc chloride의 경우 북미에서 주로 이용되는 *Cyprinodon variegatus* (Sheepshead minnow)의 96시간 LC₅₀=11.3 mg L⁻¹ (USEPA · ECOTOX Database, www.

epa.gov/ecotox), 송사리의 경우 LC₅₀=8.84 mg L⁻¹로 송사리가 좀더 민감한 반응을 보였다. 그러나 sheepshead minnow의 경우 노출용액이 해수이므로 절대적 비교는 불가능하다.

상기 실험 결과, 독성시험용 표준어류를 개발하는데 최소 5년 이상이 소요되는 점을 감안하면 이미 실험실 사육이 가능하고 또한 생활사 전 과정이 밝혀진 송사리는 해양 오염물질의 생태 독성 평가에 매우 유용한 시험생물로 판단된다.

감사의 글

상기 연구는 국립수산과학원 R&D 과제중 “해양생태 독성평가공정시험법” 개발을 위한 연구과제중 어류 부분의 일부 연구 자료를 이용하였다. 본 연구를 위하여 실험생물을 제공해주신 국립환경과학원의 허인애, 박응노 박사님께 감사드립니다. 또한 송사리의 사육 및 실험에 많은 조언을 해주신 안전성평가연구소의 이성규 박사님과 구피팜의 최영민 사장님께 감사드립니다.

적 요

송사리 (*Oryzias latipes*)는 한국, 일본 및 중국 등을 포함하는 동북아시아에 분포하는 어종으로 주로 담수계

독성 실험용 표준시험생물로 이용되고 있다. 본 연구는 담수에 주로 분포하는 송사리가 marine receiving water, 공극수 또는 해양투기물질과 같은 해수의 생태독성평가를 위한 표준시험생물로서 가능성을 구명하기 위하여 염분 내성 및 표준독성물질을 이용한 민감도 실험을 수행하였다. 송사리의 염분 내성을 구명하기 위하여 다양한 염분에서 사망률, 성장률 및 부화율 실험을 실시하였다. 담수에서 산란 및 수정이 이루어진 개체를 이용하여 0~35 psu 구간에서 부화율 실험을 실시한 결과, 전 염분 구간에서 대조구(0 psu)와 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p=0.24$). 반면 담수에서 부화된 자어는 염분이 25 psu를 초과할 경우 사망률이 급증하였으나, 담수에서 산란, 수정되어 기수에서 (13.8 및 14.2 psu) 부화된 자어는 전 염분 구간에서 약 90% 이상 생존하였다. 또한 기수에서 부화된 자어의 성장률(체장) 역시 염분에 따른 차이가 없었다 ($p=0.64$, $p=0.32$). 염분 별로 노출된 송사리 자어의 아가미 조직의 염세포 출현율을 검정한 결과, 고염분에서 염세포 출현이 급증하여 송사리의 염분 적응력은 매우 높은 것으로 사료된다. Zinc chloride를 이용한 표준물질독성실험 결과 송사리 자어의 96시간 $LC_{50}=8.84 \text{ mg L}^{-1}$ 로 북미에서 널리 이용되는 *Cyprinodon variegatus* (Sheepshead minnow)보다 민감한 반응을 보였으며, 타 표준시험생물과도 유사한 민감도를 보였다. 따라서 송사리는 생태독성실험에 주로 이용되는 부화율과 자어 사망률을 이용한 해수 생태독성 실험에 매우 유용한 실험생물이며, 담수, 기수 및 해수의 독성실험에 포괄적으로 이용될 수 있는 생태 독성 평가용 실험생물로 판단된다.

참 고 문 헌

- 김영배, 이성규, 김용화, 노정구. 1988. Diazinon과 Carbofuran의 송사리 (*Oryzias latipes*)와 미꾸리 (*Misgurnus anguillicaudatus*)에 대한 선택적 독성과 Acetylcholinesterase 저해. 한국환경농학회지. 7:117-123.
- 김철기, 김광백, 차의영. 2003. 다층 퍼셉트론을 이용한 유해물질 유입에 따른 송사리의 행동 반응 분석 및 인식. 멀티미디어학회. 6:1062-1069.
- 박배경, 박석순, 캐런 어스트펠드, 키이스 쿠우퍼. 1996. 송사리 알의 초기 발생과정을 이용한 매립지 침출수 독성도 평가. 환경생물. 14:55-61.
- 신천철, 이성규, 노정구. 1985. 제초제 Butachlor의 송사리에 대한 아급성 독성. 한국환경농학회지. 4:118-125.
- 엄경숙, 송민영, 정재훈, 정 용. 1987. 수은, 납, 카드뮴, 크롬이온이 송사리 (*Apiochilus latipes*)에 미치는 독성에 관한 연구. 한국물환경학회지. 3:53-62.
- 이성규, 신천철, 노정구. 1987. 농약에 대한 담수산 어류(잉어: *Cyprinus carpio*, 송사리: *Oryzias latipes*, 일본산 송사리: *Oryzias latipes*)의 약제 감수성 비교. 한국환경농학회지. 6:66-72.
- 최충길, 황영진, 위인선. 1992. 송사리 수정란에 미치는 중금속의 영향. 한국물환경학회지. 8:135-140.
- 해양수산부. 1998. 해양환경공정시험방법. 해양수산부. 317 pp.
- Bhattacharyya S, PL Klerks and JA Nyman. 2003. Toxicity to freshwater organisms from oil and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. Environ. Pollut. 122:205-215.
- Chen CM and KR Cooper. 1999. Developmental toxicity and EROD induction in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) treated with dioxin congeners. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63:423-429.
- Chen CM, SC Yu and MC Liu. 2001. Use of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in toxicity tests on different industrial effluents in Taiwan. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40:363-370.
- Darlington PJ Jr. 1957. Zoogeography: the geographical distribution of animals. Reprinted Edition. Krieger Publishing, Florida, USA.
- EL-Alfy AT, S Grisle and D Schlenk. 2001. Characterization of salinity-enhanced toxicity of aldicarb to Japanese medaka: Sexual and developmental differences. Environ. Toxicol. Chem. 20:2093-2098.
- EL-Alfy AT, E Bernache and D Schlenk. 2002. Gender differences in the effect of salinity on aldicarb uptake, elimination, and in vitro metabolism in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. Aquat. Toxicol. 61:225-232.
- Evans DH, PM Permarini and WTW Potts. 1999. Ionic transport in fish gill epithelium. J. Exp. Zool. 283:641-652.
- Foskett JK and C Scheffey. 1982. The chloride cell: definitive identification as the salt-secretory cell in teleosts. Science 215:164-166.
- Gerhardt A, LJ De Bisthoven, Z Mo, C Wang, M Yang and Z Wang. 2002. Short-term response of *Oryzias latipes* (Pisces: Adrianichthyidae) and *Macrobrachium nipponense* (Crustacea: Palaemonidae) to municipal and pharmaceutical waste water in Beijing, China: survival, behaviour, biochemical biomarkers. Chemosphere 47:35-47.
- Hall LW, MC Ziegenfuss, RD Anderson and BL Lewis. 1995. The effect of salinity on the acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake Bay copepod and fish. Mar. Pollut. Bull. 30:376-384.
- Hall LW and RD Anderson. 1995. The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. Crit. Rev. Toxicol. 25:281-346.

- Haruta K, T Yamashita and S Kawashima. 1991. Changes in arginine vasotocin content in the pituitary of the medaka (*Oryzias latipes*) during osmotic stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83:327–336.
- Hiraoka Y and H Okuda. 1983. Characteristics of vertebral abnormalities of medaka as a water pollution indicator. *Hiroshima J. Med. Sci.* 32:261–266.
- Hiraoka Y and H Okuda. 1984. A tentative assessment of water pollution by the medaka egg stationing method: aerial application of fenitrothion emulsion. *Environ. Res.* 34:262–267.
- Inoue K and Y Takei. 2002. Diverse adaptability in *Oryzias* species to high environmental salinity. *Zool. Sci.* 19:727–734.
- Iwamatsu T. 1994. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* 11:825–839.
- Kirchen RV and WR West. 1976. *The Japanese Medaka. Its Care and Development.* Carolina Biological Supply Company, North Carolina.
- Madsen SS. 1990. Enhanced hypoosmoregulatory response to growth hormone after cortisol treatment in immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol. Biochem.* 8:271–279.
- Marty GD, S Wetzlich, JM Nunez, A Craigmill and DE Hinton. 1991. Fish-based biomonitoring to determine toxic characteristics of complex chemical mixture: Documentation of bioremediation at a pesticide disposal site. *Aquat. Toxicol.* 19:329–340.
- Metcalfe TL, CD Metcalfe ER Bennett and GD Haffner. 2000. Distribution of toxic organic contaminants in water and sediments in the Detroit River. *J. Great Lakes Res.* 26:55–64.
- Miyamoto T, T Machida and S Kawashima. 1986. Influence of environmental salinity on the development of chloride cells of freshwater and brackish-water medaka, *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* 3:859–865.
- Myers GS. 1938. Fresh-water fishes and West Indian zoogeography. *Smithsonian Rep.* 1937:339–364.
- Naruse K. 1996. Classification and phylogeny of fishes of the genus *Oryzias* and its relatives. *Fish Biol. J. Medaka.* 8:1–9.
- Naruse K, A Shima, M Matsuda, M Sakaizumi, T Iwamatsu, T Soeroto and B Uwa. 1993. Description and phylogeny of rice fish and their relatives belonging to the suborder Adrianchthyoidei in Sulawesi, Indonesia. *Fish Biol. J. Medaka.* 5:11–15.
- Ozato K and Y Wakamatsu. 1994. Developmental genetics of medaka. *Devel. Grow. Different.* 36: 437–443.
- Ozato K, K Inoue and Y Wakamatsu. 1989. Transgenic fish: biological and technical problems. *Zool. Sci.* 6:445–457.
- Pisam M, A Caroff and A Rambourg. 1987. Two types of chloride cells in the gill epithelium of a freshwater-adapted euryhaline fish: *Lebistes reticulatus*; their modifications during adaptation to saltwater. *Am. J. Anat.* 179:40–50.
- Rao SS, CD Metcalfe, TA Neheli and B Schmidt. 1997. Assessing the toxicity of environmental contaminants with early stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environment Canada National Water Research Institute, Burlington, Ontario, NWRI Contribution no. 97–02.
- Roberts TR. 1998. Systematic observations on tropical Asian medaka or ricefishes of the genus *Oryzias* with descriptions of four new species. *Ichthyol. Res.* 45:213–224.
- Sakamoto T, T Kozaka, A Takahashi, H Kawauchi and M Ando. 2001. Medaka (*Oryzias latipes*) as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes. *Aquaculture* 193: 347–354.
- Schlenk D and AT EL-Alfy. 1998. Expression of brachial flavin-containing monooxygenase is directly correlated with salinity-induced aldicarb toxicity in the euryhaline fish (*Oryzias latipes*). *Mar. Environ. Res.* 46:103–106.
- Shima A and A Shimada. 1994. The Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, as a new model organism for studying environmental germ-cell mutagenesis. *Environ. Health Persp.* 102. Suppl. 12.
- Skinner L, A de Peyster and K Schiff. 1999. Developmental effects of urban storm water in medaka (*Oryzias latipes*) and inland silverside (*Menidia beryllina*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37:227–235.
- Tachikawa M and R Sawamura. 1994. The effect of salinity on pentachlorophenol accumulation and elimination by killifish (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26:304–308.
- Uchida K, T Kaneko, K Yamauchi and T Hirano. 1996. Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments and lamella and changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. *J. Exp. Zool.* 276:193–200.
- USEPA. 1991. Guidelines for Culturing the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. EPA/600/3–91/064. United States Environmental Protection Agency.
- USEPA. 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA/600/4–90/022F. United States Environmental Protection Agency.
- Van Der Heijden AJH, PM Verboost, J Eygensteyn, J Li, SE Wendelaar Bonga and G Flik. 1997. Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to fresh water or seawater; quantification by confocal laser scanning microscopy. *J. Exp. Biol.* 200:55–64.
- Yamagami K. 1973. Some enzymological properties of a hatching enzyme (chorionase) isolated from the fresh-

water teleost, *Oryzias latipes*. Comp. Biochem. Physiol. 16B:603–616.

Yanagishima S and S Mori. 1975. Studies on the variation and adaptation of fishes. I. Adaptation of killifish (*Oryzias latipes* T&S.) to saline water. 1. Field study. Zool. Mag. 66:351–358.

Yasumasu S, K Inohaya, I Iuchi and K Yamagami. 1997. The medaka hatching enzyme: structure, function and gene expression during development. pp.475–495. In Recent

Advances in Marine Biotechnology Vol. 1, Endocrinology and Reproduction (Fingerman M, R Nagabhushanam and M Thompson eds.). Oxford and IBH Publishing, New Delhi.

Manuscript Received: June 17, 2005

Revision Accepted: July 30, 2005

Responsible Editorial Member: Ju Chan Kang
(Pukyong Univ.)