

Exposure to Dithiopyr Alters Swimming Performance Parameters in Zebrafish

Junyoung Oh^{1†}, Eun-Jin Park^{2†}, Seongeun Kang¹ and Seungheon Lee^{1*}

¹Department of Marine Life Sciences, School of Marine Biomedical Sciences, College of Ocean Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

²Department of Food Bioengineering, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

Received December 17, 2015 / Revised January 18, 2016 / Accepted January 18, 2016

The aim of this study was to identify the effects of dithiopyr (DTP), a herbicide, on behavior in zebrafish. The toxicity of DTP has rarely been investigated in fish. In the present study, zebrafish were exposed to different concentrations of DTP in the range of 10-20 μM for 48 h in a test container, in order to measure the value of median lethal concentrations (LC_{50}). Behavioral experiments were performed, including the novel tank test (NTT) and the open field test (OFT), to assess stress responses or locomotion. After exposure to the DTP solution at a sublethal concentration of 2.5 - 10 μM for 6 min, the behavior of the zebrafish was observed for 6 min. In the acute toxicity test, the LC_{50} value of DTP showed as 14.49 μM in the zebrafish. The NTT showed that the duration of immobility and the velocity were significantly increased by exposure at a concentration of 5 μM of DTP, compared with a control group ($p < 0.05$). However, compared with the control group, DTP significantly decreased the distance moved and the frequency at the top of the tank, and significantly increased the turn angle and duration at the bottom, in a concentration-dependent manner ($p < 0.05$). In addition, in the OFT, exposure to DTP significantly decreased the distance moved and velocity compared with the control group ($p < 0.05$). Exposure to DTP also significantly increased the duration of immobility, the turn angle, and the meandering movement, in a concentration-dependent manner ($p < 0.05$). Further, exposure to DTP at a low concentration elevated whole-body cortisol levels in the zebrafish. The results of this study thus suggest that DTP induces a toxic response and negative effects on behavior and the endocrine system in zebrafish.

Key words : Behavioral study, dithiopyr, median lethal concentration, whole-body cortisol, zebrafish

서 론

수생환경에 있는 생물은 생활하수, 공장폐수 등 다양한 오염물질에 노출되어 있다[5]. 다양한 오염물질의 원인 중 하나는 농약의 사용이다. 경작지나 골프장에서는 잡초 방제를 위해서 농약을 사용한다. 잔디밭의 잡초 방제는 방제를 위해 인력을 활용하는 경우, 인건비가 많이 들고 작업 효율이 낮아 제초제를 이용한 화학적 방제가 빈번하게 수행되고 있다. 그러나 대상 잡초에 따라 농약 살포 횟수가 증가하는 등 여러 문제점이 나타나고 있다[11]. 농약 사용의 가장 큰 문제점은 토양에서의 농약의 잔류인데, 병충해로부터 농작물 및 잔디를 보호하기 위하여 사용된 농약은 사용 후 농지배수에 의해 수생환경으로 유입될 수 있다[21]. 수생환경으로 유입된 농약은

수생 생물, 특히 물고기의 피부나 아가미를 통해 흡수된다[5]. 이런 원인으로 육상동물과 비교하여 수생생물에서 비교적 강한 독성 작용이 나타나는 것으로 사료된다.

Dithiopyr (DTP; 2-(difluoromethyl)-4-(2-methylpropyl)-6-(trifluoromethyl) pyridine-3,5-dicarbothioate; Fig. 1)는 pyridine계 발아전처리 제초제로서 잔디밭에서 사용이 가능하고, 통상적으로 0.015 ml/m² 정도의 물량을 사용하며 일년생 잡초와 광엽 잡초 방제에 우수한 약효를 나타내고 약물독성도 적은 것으로 보고되고 있다[11]. 봄에 발아하는 잡초의 발아를 막기

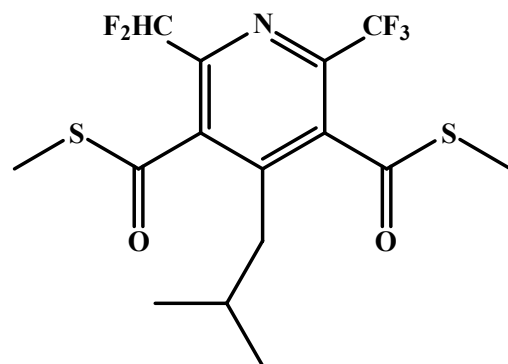


Fig. 1. Chemical structure of dithiopyr.

[†]Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3476, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : slee76@jejunu.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/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

위해 사용되는 DTP는 잡초를 완전히 사멸시키는 것이 아니라 세포분열 전중기 과정을 정지시켜 분열세포에서 식물성장에 필요한 방추체미세소관을 감소시켜 세포 내 미세관(microtubule)의 구성 단백질인 tubulin 중합조절을 변화시켜 잡초를 제어함으로써, 본질적으로 대상 잡초의 성장을 방해하는 것으로 알려져 있다[28].

DTP의 반수치사용량(median lethal dose; LD50)은 포유류에서 5,000 mg/kg 이상[36], 조류에서 2,250 mg/kg 이상으로 상대적으로 무해하고, bluegill과 rainbow trout를 이용한 급성독성시험에서는 0.46 mg/l로 매우 낮은 LC₅₀ 값으로 보고된 바 있다[13]. 상대적으로 포유류보다 어류에서 높은 독성을 보이고 있지만 DTP에 의한 어류독성에 대해서는 많이 연구된 바가 없다. 그래서 본 실험은 zebrafish를 이용하여 DTP가 어류에 미치는 독성 반응을 연구하고자 LC₅₀를 측정하였고, 더불어 행동약리학적 방법을 이용하여 유영패턴을 분석하였다.

따라서 본 연구에서는 제주도 골프장에서 잔디관리 목적을 위해 주로 사용되는 농약 중 독성연구가 거의 없는 DTP를 시험물질로 사용하였고, DTP에 실험동물인 zebrafish를 노출시켰을 때, zebrafish의 행동에 미치는 영향을 연구하고 급성독성시험을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구에서 사용된 DTP는 Dow Chemical Company (Hong Kong, China)로부터 구입하여 하였으며, whole-body cortisol 정량을 위하여 cortisol assay kit (R&D system, Minneapolis, Minnesota, USA)를 사용하였다. 그 외의 시약은 시중에 유통되는 최고 등급의 것을 구입하여 사용하였다.

실험동물

본 연구를 위한 실험동물은 수조 내에서 2주 동안 적응시킨 48마리의 wild-type의 zebrafish (*Danio rerio*) 성어를 사용하였다. 실험동물은 60 l 사육수조에서 순환 여과 시스템을 이용하여 사육되었다. 수온은 26-28℃로 조절하였고, 적응기간 동안 사료는 실험동물에게 1일 2회 공급되었다.

반수치사농도(LC₅₀)

예비실험을 통하여 LC₅₀의 범위가 10-20 μM의 범위임을 확인하였다. 본 실험은 DTP의 농도를 10-20 μM로 조절한 2 l 비커에 zebrafish를 10마리씩 넣어 OECD 급성 독성시험 가이드라인 203을 따라 진행하였다[27]. 사육수는 각 비커 별로 1 l씩 주입하였다. 이때, 사육수의 수온은 26±1℃로 유지시켰고, 산소 공급을 위해 aeration을 해주었다. 48시간 동안 반치수식 시험으로 진행되었으며, 24시간마다 시험 용액을 새로 교환하였고, 시험기간 동안 먹이는 공급하지 않았다. DTP 농

도 별로 24시간 후 사망률을 조사하고, 용액 교환 24시간 후 사망률을 조사하여 총 48시간 동안 실험어의 50%가 사망한 농도(LC₅₀)를 조사하였다. 행동실험에서의 실험농도 결정은 반수치사농도실험에서 사망이 관찰되지 않은 최고 농도를 기준으로 반수 희석하여 사용하였다. LC₅₀는 Finney의 probit 분석법을 이용하여 결과 값을 산출하였다[4].

Novel tank test

DTP 노출이 스트레스행동에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Robinson 등의 실험방법에 따라 novel tank test를 실시하였다[23]. 실험에 사용된 zebrafish는 총 48마리(group당 n=12)로, 0.9% NaCl solution 또는 DTP 용액 1 l 비커에 각각 6분간 약욕시켰다(2.5, 5 or 10 μM). Tank (15 cm height × 28 cm top × 23 cm bottom × 7 cm width)는 1.5 l의 사다리꼴 모양으로 top half와 bottom half으로 나누어 물을 가득 채운 뒤 사용하였다. Tank 정면에 camera를 설치하여 6분간 zebrafish의 유영을 관찰을 하였으며, Ethovision XT 8.5 (Noldus, Wageningen, The Netherlands) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

Open field test

DTP 노출이 행동 변화 및 자발 운동량에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Cachat 등의 방법을 이용하여 open field test를 실시하였다[25]. Zebrafish는 총 48마리(group당 n=12)로, 0.9% NaCl solution 또는 DTP 용액 1 l 비커에 각각 6분간 약욕시켰다(2.5, 5 or 10 μM). 원통형 모양의 백색 plastic cylinder (24 cm height × 21 cm diameter)에 물을 반 채워진 진행하였으며, 원통형 상단에 camera를 설치하여 Ethovision XT 8.5 (Noldus, Wageningen, The Netherlands)을 이용하여 6분간 zebrafish의 행동변화를 측정하였다.

Whole-body cortisol 측정

Barcellos 등의 방법을 이용하여 whole-body cortisol를 측정하였다[18]. 6분 동안 0.9% 생리식염수나 OF70E에 약욕시킨 zebrafish에게 즉시 NHS를 가한 후, 체액을 얻기 위해 150 mg/l 농도의 tricaine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 처리하여 안락사를 유도하였다. 안락사 유도 후 zebrafish에서 물기를 제거한 뒤 액체 질소에 급속 냉동시키고 준비해놓은 cryo tube에 1× phosphate buffer saline (PBS) 2 ml 넣고 물고기를 분쇄하였다. 분쇄한 혼합물에 5 ml diethyl ether (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 넣은 후 1분간 vortexing을 하였다. 이후 3,000× g에서 10분 동안 원심분리(Hanil, Seoul, Korea) 후 액체 질소에 30초간 급속냉동 시킨 후 상층액을 test tube에 옮겨 담았다. 이 후 진공 원심 농축기(CVE-2000, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 ether을 증발시켰다. Ether를 증발시킨 test tube에 1 ml의 0.5 M PBS를 넣고 1.7

ml tube에 옮긴 후 cortisol 측정 시까지 -20°C에서 보관하였다. Cortisol 농도는 cortisol assay kit (R&D system, Minneapolis, Minnesota, USA)를 이용하여 측정하였다. ELISA plate를 분석하기 위해서 microplate reader (Molecular Device, USA)로 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이렇게 얻은 흡광도 값은 4-parameter sigmoid minus curve를 기초하여 cortisol 농도값으로 환산되었다. Whole-body cortisol level은 각 어체 무게에 대한 농도의 비로 표현되었다.

통계처리

모든 데이터는 mean±S.E.M.으로 표현하였으며, 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Student-Newman-Keuls test를 이용하여 각 실험군 평균치 간의 유의성을 검정하였다.

결 과

DTP의 반수치사농도(LC₅₀)

DTP 농도 별로 24시간 후 사망률을 조사하고, 용액 교환 24시간 후 사망률을 조사하여 총 48시간 동안 실험어의 50%가 사망한 농도(LC₅₀)를 조사하였다. 반수치사농도 실험 결과 zebrafish에서의 DTP의 LC₅₀ 값은 14.49 μM 로 관찰되었다(Fig. 2).

DTP의 novel tank test에서의 효과

DTP를 2.5, 5 그리고 10 μM 의 농도로 6분 동안 약욕 후 novel tank test를 실시한 결과, 하층부의 머무는 시간의 경우 control 그룹에서 129.5±20.6초로 나왔고, DTP 처리한 그룹에서는 2.5 μM 농도에서는 173.4±12.9초, 5 μM 농도에서는 246.1±23.1초, 10 μM 농도에서는 274.6±31.6초로 통계적으로

유의성 있는 농도 의존적으로 증가하였다($p < 0.05$; Fig. 3A). 상층부에 머무른 횟수는 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였고, 통계적으로 유의성이 확인되었다($p < 0.05$; Fig. 3B). 그리고 최초로 상층부에 들어간 시간은 control 그룹과 비교 하였을 때 5 μM 및 10 μM에서 통계적으로 유의성이 있는 증가가 관찰되었고, 특히 5 μM에서 최초로 상층부에 들어간 시간이 가장 길게 나타났다($p < 0.05$; Fig. 3C). 회전각의 경우, control 그룹과 비교 하였을 때 통계적으로 유의성이 있는 농도 의존적으로 증가하였다($p < 0.05$; Fig. 3D). 평균 유영속도는 control 값이 5.7±0.2 cm/s 였으며, DTP 2.5 μM, 5 μM 그리고 10 μM를 처리 하였을 때 4.5±0.3 cm/s, 2.6±0.2 cm/s 그리고 2.9±0.3 cm/s로 유의성 있는 감소가 나타났다. 특히 5 μM 농도에서 평균 유영속도가 가장 느린 값이 나왔다($p < 0.05$; Fig. 3E). Control 그룹의 총 이동 거리는 2091.2±99.6 cm였으며, DTP를 투여한 그룹에서는 2.5 μM 농도에서 1623.6±108.0 cm, 5 μM 농도에서 949.4±74.0 cm, 10 μM 농도에서 1054.9±125.9 cm로 control 그룹과 비교하여 통계적으로 유의성이 있는 감소가 확인되었다($p < 0.05$; Fig. 3F). 부동 시간 측정 결과, control 그룹에서 36.7±4.9초로 나왔으며, 약물을 처리하였을 때 2.5 μM 농도에서는 72.4±9.7초, 5 μM 농도에서는 175.9±17.9초 그리고 10 μM 농도에서는 165.5±25.7초의 결과값으로 통계적인 유의성 있는 증가 현상이 확인되었다($p < 0.05$; Fig. 3G).

DTP의 open field test에서의 효과

DTP를 2.5, 5 그리고 10 μM의 농도로 6분 동안 약욕 후 open field test를 실시한 결과, 총 이동 거리는 control 그룹에서 3106.5±192.2 cm였고, 2.5 μM 농도의 DTP처리 그룹에서 2255.3±312.3 cm, 5 μM 농도의 DTP 처리 그룹에서 918.5±100.8 cm, 10 μM 농도의 DTP 처리 그룹에서는 790.3±54.5 cm로 control 그룹과 비교하여 통계적으로 유의성이 있는 감소현상

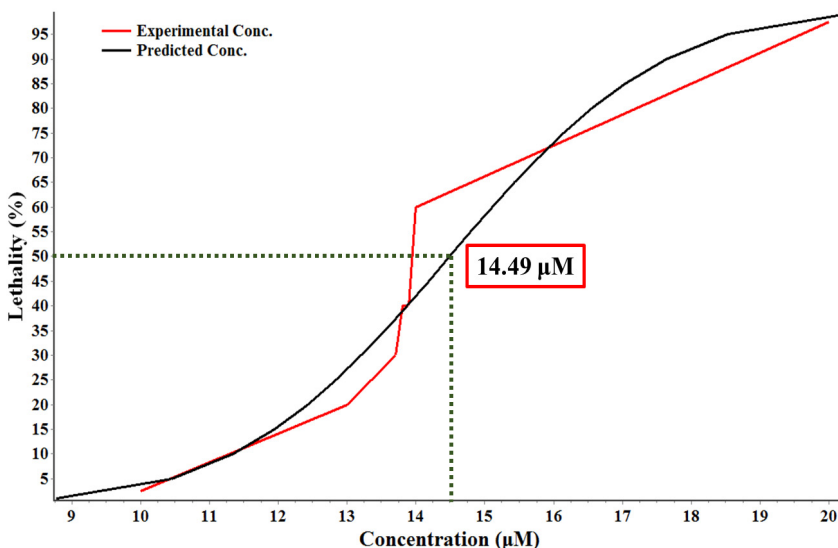


Fig. 2. The median lethal concentration value of dithiopyr in zebrafish.

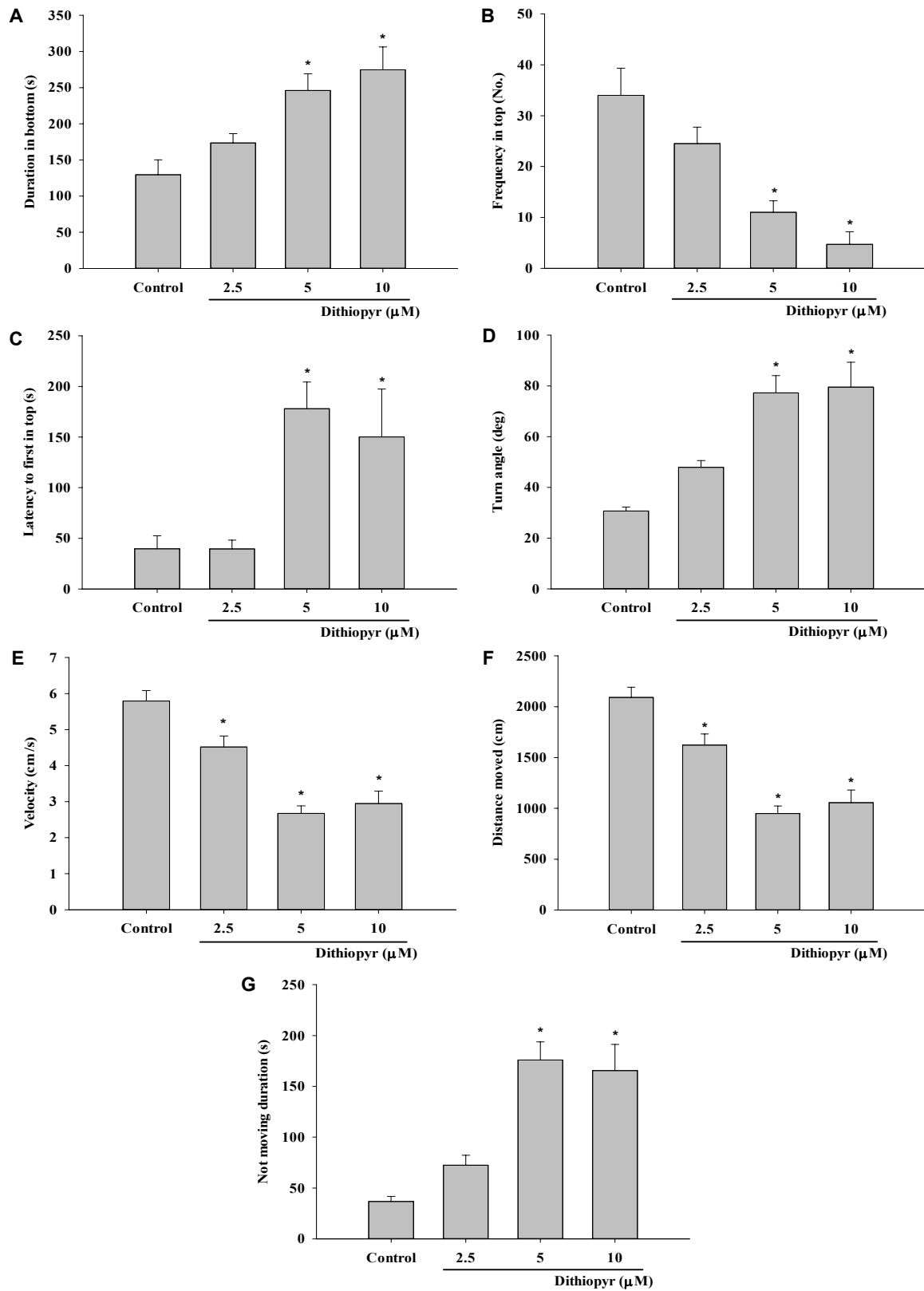


Fig. 3. Effects of dithiopyr (2.5, 5 or 10 μM) on (A) duration in bottom, (B) frequency in top, (C) latency to first in top, (D) turn angle, (E) velocity, (F) distance moved and (G) not moving duration in the novel tank test in zebrafish. Each bar represents mean±S.E.M. of 10-12 animals. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (* $p < 0.05$ vs. control).

이 확인되었다($p < 0.05$; Fig. 4A). 부동 시간에서는 control 그룹의 결과 값은 32.9 ± 7.3 초로 확인되었다. $2.5 \mu\text{M}$ 농도에서는 71.7 ± 24.2 초에서는 증가 현상은 확인되었으나 통계적인 유의성은 확인되지 않았고, $5 \mu\text{M}$ 농도에서는 179.9 ± 11.5 초, $10 \mu\text{M}$ 농도에서는 223.9 ± 11.1 초로 통계적으로 유의성 있는 증가 현상이 확인되었다($p < 0.05$; Fig. 4B). 평균 유영속도에서는 control 그룹 $8.3 \pm 0.5 \text{ cm/s}$ 과 비교하였을 때 $2.5 \mu\text{M}$ 농도에서는 $6.2 \pm 0.8 \text{ cm/s}$, $5 \mu\text{M}$ 농도에서는 $2.7 \pm 0.2 \text{ cm/s}$ 그리고 $10 \mu\text{M}$ 농도에서는 $2.1 \pm 0.1 \text{ cm/s}$ 로 농도 의존적으로 통계적으로 유의성 있는 감소 현상이 확인되었다($p < 0.05$; Fig. 4C). 회전각의

경우, control 그룹에서는 $24.7 \pm 1.9 \text{ deg}$ 와 약물 투여 그룹을 비교했을 때 $2.5 \mu\text{M}$ 농도에서는 $35.3 \pm 7.0 \text{ deg}$, $5 \mu\text{M}$ 농도에서는 $77.1 \pm 6.3 \text{ deg}$ 그리고 $10 \mu\text{M}$ 농도에서는 $81.6 \pm 4.9 \text{ deg}$ 로 통계적으로 유의성 있는 증가 현상이 나타났다($p < 0.05$; Fig. 4D). Zebrafish의 유영을 확인하는 굴곡유영에서는 control 그룹에서 $500.5 \pm 122.2 \text{ deg/cm}$ 의 수치가 확인이 되었고, $2.5 \mu\text{M}$ 농도에서는 $1012.7 \pm 442.3 \text{ deg/cm}$, $5 \mu\text{M}$ 농도에서는 $4580.3 \pm 620.0 \text{ deg/cm}$ 그리고 $10 \mu\text{M}$ 농도에서는 $5462.5 \pm 477.7 \text{ deg/cm}$ 로 통계적인 유의성 있는 증가 현상을 확인하였다($p < 0.05$; Fig. 4E).

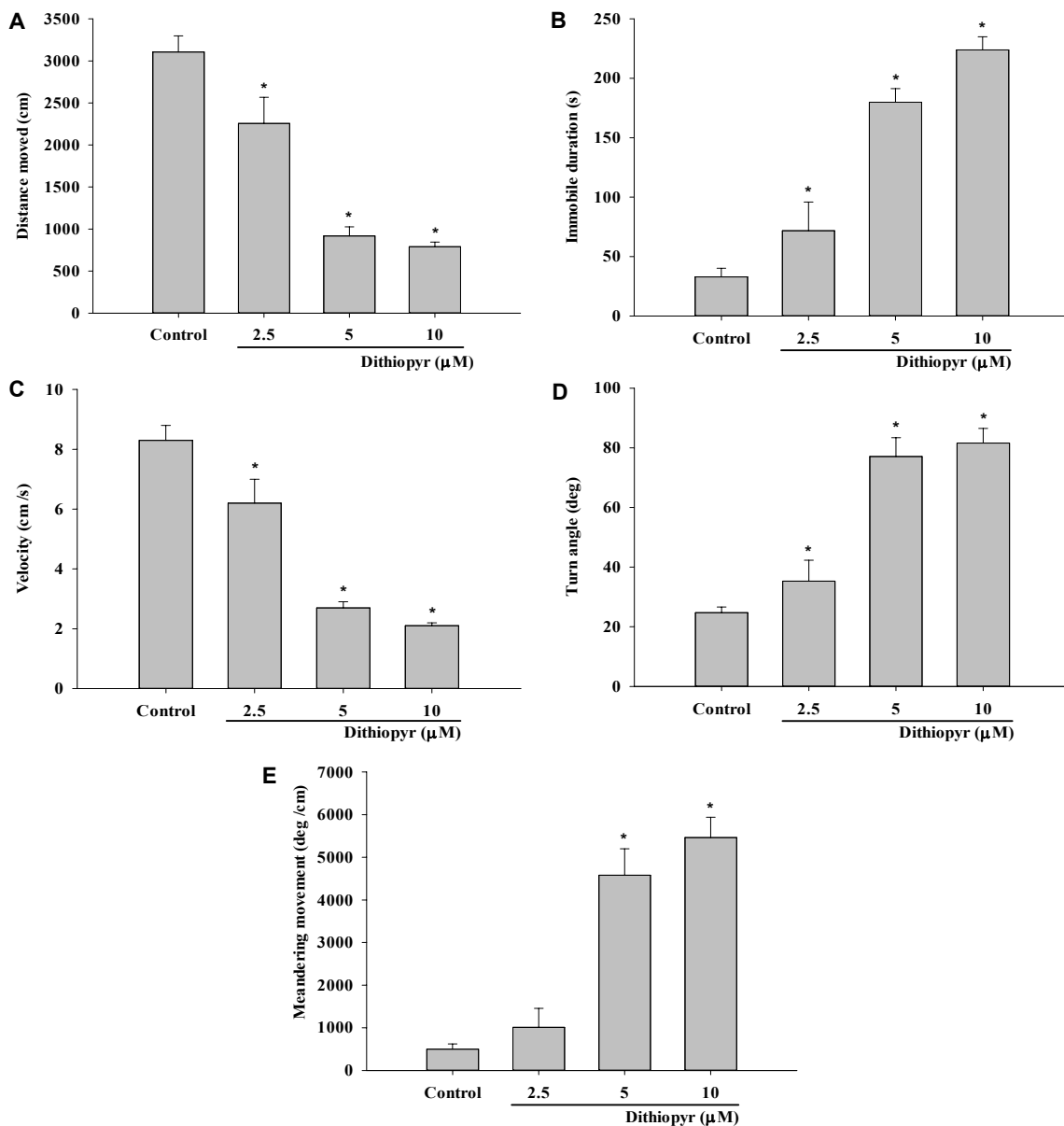


Fig. 4. Effects of dithiopyr (2.5, 5 or 10 μM) on (A) distance moved, (B) not moving duration, (C) velocity, (D) turn angle and (E) meandering movement on the open field test in zebrafish. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 10-12 animals. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($*p < 0.05$ vs. control).

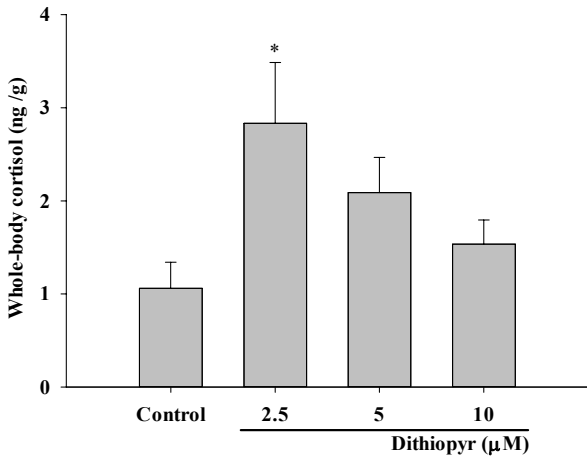


Fig. 5. Effect of the dithiopyr (2.5, 5 or 10 μM) on whole-body cortisol in adult zebrafish. Each bar represents the mean ± S.E.M. of the whole-body cortisol level of 3-4 animals. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (* $p < 0.05$ vs. control).

DTP가 whole-body cortisol에 미치는 영향

Whole-body cortisol level 측정 결과, control 그룹에서 1.1±0.3 ng/g으로 관찰되었다. DTP 처리군에서의 whole-body cortisol의 변화를 측정한 결과, 2.5 μM 농도의 그룹에서 각각 2.8±0.7 ng/g로 나타나 control 그룹과 비교하여 통계적으로 유의성 있는 증가가 관찰되었으나($p < 0.05$), 5와 10 μM에서는 유의성 있는 차이가 관찰되지 않아 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 5).

고 찰

행동의 변화는 동물이 환경 교란에 노출되었을 때, 동물의 감각과 그 환경에의 반응을 반영하며 최우선적 방어 행위이다 [3]. 본 연구에서는 제주도 골프장에서 주로 사용되는 농약 중 독성연구가 거의 이루어 지지 않은 DTP를 시험물질로 사용하였고, DTP에 zebrafish를 노출시켰을 때, 행동에 미치는 영향을 연구하고 급성 독성시험을 평가하였다.

급성 독성시험을 통해서 zebrafish에서의 DTP의 LC₅₀값이 14.49 μM 이라는 것을 확인하였고, 이는 bluegill과 rainbow trout의 LC₅₀값 보다 약 100배 정도 낮은 값이며[2], 빈용되는 제초제인 paraquat의 LC₅₀값 388.9 μM과 비교하여 약 27배 정도 낮은 값이었다[20]. DTP가 NTT에서 zebrafish에 미치는 영향이 불안 반응 및 스트레스 반응을 나타냄을 확인하였다. NTT 결과, 부동 시간과 속도에서는 5 μM 농도에서 zebrafish에 가장 높은 효과를 나타내었다. 또한 control 그룹과 비교하였을 때 이동거리, 상층부에 머무른 횟수는 유의성 있는 감소를 나타내었고, 회전각, 하층부에 머무는 시간은 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다. 그리고 DTP가 OFT에서

zebrafish에 미치는 영향이 유영과 관련이 있다는 사실을 알게 되었다. OFT 결과, DTP에 노출시켰을 때 이동거리와 평균 유영속도는 control 그룹과 비교하였을 때 유의성 있게 감소하였다. 부동시간, 회전각 및 굴곡유영에서는 DTP에 노출시켰을 때 농도 의존적으로 유의성 있게 증가함을 관찰할 수 있었다. 두 가지 행동실험의 결과 DTP가 zebrafish한테 불안감 또는 스트레스 반응을 야기하는 것을 알 수 있었다. 그러나 whole-body cortisol level를 측정된 결과, 흥미롭게도 농도의존적으로 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다.

행동 변화는 다양한 생물종에서 생태계의 변화에 따른 생리학 적 기능과 연관이 있기 때문에, 유해한 화학 공해를 탐색하는데 유용한 지표로 사용될 수 있다[30]. 최근 신경 행동 연구의 모델로 zebrafish의 잠재력이 부각되고 있다. 많은 연구에서 zebrafish larvae의 행동[10, 33, 34, 37]에 실험이 진행되었을 뿐만 아니라 에탄올[15, 24]과 fluoxetine [1]와 같은 여러 가지 약물에 대한 반응을 행동 변화와 연관 지어 연구되고 있다. 또한 성어 zebrafish는 연구는 사회적 행동[32], 후각 관련 행동[26], 불안[35], 중독[16], 수면[12], 학습 및 기억[38] 등의 다양한 연구에서 사용되고 있다.

NTT에서는 하층부에 머무는 시간 및 최초로 상층부에 들어간 시간, 회전각의 유의성 있는 증가 현상(Fig. 3A 및 3C, 3D, 3G)과 총 이동 거리 및 평균 유영속도, 상층부 진입 회수에서 통계적으로 유의성 있는 감소 현상(Fig. 3B 및 3E, 3F)이 확인되었다. 이러한 현상은 Kist 등이 zebrafish를 100 μg/l 농도의 microcystins에 노출 시킨 후, NTT 실시 결과와 매우 유사하였다[22]. 저자는 총 이동거리가 감소하고, 부동 시간이 증가하는데, 이는 microcystins가 zebrafish에게 화학적 스트레스 요인으로 작용하여 zebrafish의 행동에 영향을 미친다고 보고한 바 있다[22]. 새로운 환경에 노출된 zebrafish는 바닥에서 유영하는 강력한 불안 반응을 나타내는 것으로 알려져 있고[8], 본 연구에서 DTP에 노출에 의해서 하층부의 머무는 시간이 증가하게 되는데, 이러한 결과는 microcystins에 zebrafish를 노출시켰을 때 하층부의 머무는 시간이 증가 하는 것과 유사하며 DTP 또한 zebrafish에 화학적 스트레스로 작용을 하여 불안 및 스트레스 반응을 유도한 것으로 사료된다.

자발운동량 및 유영 패턴을 분석하기 위하여 OFT를 실시한 결과, 총 이동 거리와 평균 유영속도에서 통계적으로 유의성 있는 감소 현상이 확인 되었고(Fig. 4A 및 4C), 부동 시간 및 회전각, 굴곡유영에서 통계적으로 유의성 있는 증가현상이 관찰되었다(Fig. 4B 및 4D, 4E). 기존 보고에 따르면 OFT에서는 zebrafish에게 lysergic acid diethylamide를 250 μg/l 농도로 20분간 노출시켰을 때 총 이동거리와 평균 유영속도가 감소하고 부동 시간이 증가하는 경향이 확인되었고[19], 본 연구에서도 총 이동 거리와 평균 유영속도가 농도의존적으로 통계적으로 유의성 있게 감소되고 부동 시간이 농도의존적으로 통계적으로 유의성 있게 증가되는 현상을 확인하였다. 기존 연구 결

과와 비교하였을 때 DTP에 노출되는 것은 zebrafish에게 화학적 스트레스로 작용을 하여 이동거리 감소 및 수영속도, 움직이는 시간 등에 영향을 준 것으로 사료된다. 또한 스트레스 하의 zebrafish는 정상적인 직선 수영을 적게 하고 좌우로 몸을 흔드는 비정상적인 수영을 많이 하게 된다. 그렇기 때문에 굴곡 수영이나 회전각의 증가를 비정상적인 수영을 스트레스나 불안 등의 비정상적인 심리상태에 대한 척도로 사용한다 [9]. 본 연구에서는 시간 당 수영 방향의 변화를 통하여 굴곡 수영을 측정된 결과, control 그룹과 비교하여 DTP에 노출된 실험군에서 굴곡 수영 및 회전각이 유의성 있게 증가하였고 이는 DTP에 노출되는 것이 zebrafish에 화학적 스트레스로 작용을 하여 불안 및 스트레스 반응을 유도한 것으로 사료된다.

많은 연구가 스트레스 호르몬과 행동 간의 중요한 연관성에 대하여 보여 주고 있다[14, 29, 31]. Cortisol의 증가는 어류에서 스트레스 반응의 1차적인 지표로 사용되고 있다[7]. Zebrafish도 인간과 마찬가지로 1차적 스트레스 호르몬으로 cortisol을 사용한다[6]. 그렇기 때문에 본 연구에서도 DTP 노출에 의해서 나타난 행동의 변화가 스트레스 호르몬에 의한 것인지를 확인하기 위하여 whole-body cortisol를 측정하였다. 그러나 control 그룹과 비교하여 저농도인 2.5 μM 에서만 유의성 있는 증가가 관찰되었고 나머지 농도에서는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. Whole-body cortisol level은 소형어종에서 스트레스 활성에 대한 지표로 유효하게 사용되어 왔으나, Zhang 등의 연구에 따르면 살충제인 monocrotophos에 대한 노출 실험에서도 저농도인 1 $\mu\text{g}/\text{l}$ 에서만 whole-body cortisol level의 증가가 관찰되고 10과 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ 의 고농도에서는 whole-body cortisol level에 영향을 주지 않았다고 보고하고 있다[39]. 이 결과는 본 연구에서의 경향과 매우 흡사하다. 게다가 스트레스 유도 후 여성호르몬인 17 β -estradiol 또는 남성 호르몬인 11-ketotestosterone를 처리하였을 때 서로 반대 성에서 whole-body cortisol level 증가를 억제된다는 연구결과가 보고된 바 있다[17]. 저자들은 공통적으로 이런 현상이 내분비계의 교란에 의한 것이라고 설명하고 있다. 본 연구에서 DTP 노출이 whole-body cortisol level의 변화에 미치는 영향을 명확하게 밝혀내지는 못하였지만 기존 연구에서 언급하고 있는 내분비계의 교란과 밀접한 관련이 있을 것으로 추정하고 있다.

DTP는 현재 경작지나 골프장에서는 잡초 방제를 위해서 널리 사용되는 제초제이다. 제초제 사용은 상품 작물을 보호하고 상품의 가치를 증가시키며 경제적으로 손해를 줄일 수 있는 방법으로 농업 환경에서 중요한 수단이지만, 제초제의 과도한 사용은 어체에게 스트레스 인자로 작용할 수 있음을 본 연구를 통해 확인할 수 있었다. 본 연구는 제초제 사용으로 인한 환경 영향 및 어류의 스트레스 반응에 대해서 학문적으로 기여할 것으로 사료된다. 또한 차후 추가 연구를 통하여

DTP의 내분비계 교란 작용기전을 명확하게 밝혀야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2015학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었음.

References

1. Airhart, M. J., Lee, D. H., Wilson, T. D., Miller, B. E., Miller, M. N. and Skalko, R. G. 2007. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicol. Teratol.* **29**, 652-664.
2. Akerman, J. W. Review of Dithiopyr in Registration Standard Format. Washington, D.C.: United States Environmental Protection Agency, 1990. pp. 1-26.
3. Anras, M. L. B. and Lagardère, J. P. 2004. Measuring cultured fish swimming behaviour: first results on rainbow trout using acoustic telemetry in tanks. *Aquaculture* **240**, 175-186.
4. Arostegui, I., Nunez-Anton, V. and Quintana, J. M. 2012. Statistical approaches to analyse patient-reported outcomes as response variables: an application to health-related quality of life. *Stat. Methods Med. Res.* **21**, 189-214.
5. Atamaniuk, T. M., Kubrak, O. I., Husak, V. V., Storey, K. B. and Lushchak, V. I. 2014. The Mancozeb-containing carbamate fungicide tattoo induces mild oxidative stress in goldfish brain, liver, and kidney. *Environ. Toxicol.* **29**, 1227-1235.
6. Barcellos, L. J. G., Ritter, F., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Silva, L. B. d., Bedin, A. C., Finco, J. and Cericato, L. 2007. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* **272**, 774-778.
7. Barton, B. A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* **42**, 517-525.
8. Blaser, R. and Gerlai, R. 2006. Behavioral phenotyping in zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods. *Behav. Res. Methods* **38**, 456-469.
9. Blaser, R. E., Chadwick, L. and McGinnis, G. C. 2012. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **208**, 56-62.
10. Borla, M. A., Palecek, B., Budick, S. and O'Malley, D. M. 2002. Prey capture by larval zebrafish: evidence for fine axial motor control. *Brain Behav. Evol.* **60**, 207-229.
11. Choi, J. S., Woo, K. J. and Yang, G. M. 2003. Effect of Reducing spray Water Volume on Weed Control by Dithiopyr in Zoysiagrass (*Zoysia japonica*) Kor. *J. Hort. Sci. Technol.* **21**, 226- 229.
12. Cirelli, C. and Tononi, G. 2000. Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. *J. Neurosci.* **20**,

- 9187-9194.
13. Company, D. C. Material Safety Data Sheet, Dimension EC Herbicide. Dow agrosiences, 2012. pp. 1-7.
 14. Contreras-Sanchez, W. M., Schreck, C. B., Fitzpatrick, M. S. and Pereira, C. B. 1998. Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* **58**, 439-447.
 15. Damodaran, S., Dlugos, C. A., Wood, T. D. and Rabin, R. A. 2006. Effects of chronic ethanol administration on brain protein levels: a proteomic investigation using 2-D DIGE system. *Eur. J. Pharmacol.* **547**, 75-82.
 16. Darland, T. and Dowling, J. E. 2001. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11691-11696.
 17. Fuzzen, M. L., Bernier, N. J. and Van Der Kraak, G. 2011. Differential effects of 17 β -estradiol and 11-ketotestosterone on the endocrine stress response in zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **170**, 365-373.
 18. Ghisleni, G., Capiotti, K. M., Da Silva, R. S., Oses, J. P., Piato, A. L., Soares, V., Bogo, M. R. and Bonan, C. D. 2012. The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **36**, 176-182.
 19. Grossman, L., Utterback, E., Stewart, A., Gaikwad, S., Chung, K. M., Suciuc, C., Wong, K., Elegante, M., Elkhayat, S., Tan, J., Gilder, T., Wu, N., Dileo, J., Cachat, J. and Kalueff, A. V. 2010. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav. Brain Res.* **214**, 277-284.
 20. Ken, C. F., Lin, C. T., Shaw, J. F. and Wu, J. L. 2003. Characterization of fish Cu/Zn-superoxide dismutase and its protection from oxidative stress. *Mar. Biotechnol. (NY)* **5**, 167-173.
 21. Kim, J. H., Lee, B. H., Hur, J. S., Lee, G. S. and Koh, S. C. 2010. Phytoremediation of the pesticides, endosulfan (α and β) and fenitrothion, using aquatic plants. *J. Kor. Oil Chem. Soc.* **27**, 249-256.
 22. Kist, L. W., Piato, A. L., da Rosa, J. G., Koakoski, G., Barcellos, L. J., Yunes, J. S., Bonan, C. D. and Bogo, M. R. 2011. Acute Exposure to Microcystin-Producing Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Alters Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Swimming Performance Parameters. *J. Toxicol.* **2011**, 280304.
 23. Kyzar, E., Stewart, A. M., Landsman, S., Collins, C., Gebhardt, M., Robinson, K. and Kalueff, A. V. 2013. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. *Brain Res.* **1527**, 108-116.
 24. Loucks, E. and Carvan, M. J., 3rd. 2004. Strain-dependent effects of developmental ethanol exposure in zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* **26**, 745-755.
 25. Mamczarz, J., Pereira, E. F., Aracava, Y., Adler, M. and Albuquerque, E. X. 2010. An acute exposure to a sub-lethal dose of soman triggers anxiety-related behavior in guinea pigs: interactions with acute restraint. *Neurotoxicology* **31**, 77-84.
 26. Mann, K. D., Turnell, E. R., Atema, J. and Gerlach, G. 2003. Kin recognition in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) based on olfactory cues. *Biol. Bull.* **205**, 224-225.
 27. OECD. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In. Paris: OECD Publishing, 1992. pp. 1-9.
 28. Oh, S. H., Lee, C. W., Song, B. H. and Song, S. D. 2002. Effects of Spreading Oil Formulation of Cyclosulfamuron and Dithiopyr Mixture on Weed Control and Rice Growth in Paddy Rice. *Kor. J. Weed Sci.* **22**, 42-48.
 29. Oliveira, R. F., Almada, V. C. and Canario, A. V. 1996. Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Horm. Behav.* **30**, 2-12.
 30. Oulton, L. J., Taylor, M. P., Hose, G. C. and Brown, C. 2014. Sublethal toxicity of untreated and treated stormwater Zn concentrations on the foraging behaviour of *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae). *Ecotoxicology* **23**, 1022-1029.
 31. Pottinger, T. G. and Carrick, T. R. 2001. Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in rainbow trout. *Horm. Behav.* **40**, 419-427.
 32. Pyron, M. 2003. Female preferences and male-male interactions in zebrafish (*Danio rerio*). *Can. J. Zool.* **81**, 122-125.
 33. Saint-Amant, L. and Drapeau, P. 1998. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J. Neurobiol.* **37**, 622-632.
 34. Saint-Amant, L. and Drapeau, P. 2001. Synchronization of an embryonic network of identified spinal interneurons solely by electrical coupling. *Neuron* **31**, 1035-1046.
 35. Vitebsky, A., Reyes, R., Sanderson, M. J., Michel, W. C. and Whitlock, K. E. 2005. Isolation and characterization of the laire olfactory behavioral mutant in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Dyn.* **234**, 229-242.
 36. Ward, D. P. Summary of Toxicology Studies With Dithiopyr. Toxicology Department, The Agricultural Group, A Unit of Monsanto Company, 1993. pp. 1-11.
 37. Watkins, J., Miklosi, A. and Andrew, R. J. 2004. Early asymmetries in the behaviour of zebrafish larvae. *Behav. Brain Res.* **151**, 177-183.
 38. Williams, F. E., White, D. and Messer, W. S. 2002. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. *Behav. Processes* **58**, 125-132.
 39. Zhang, X., Zhong, Y., Tian, H., Wang, W. and Ru, S. 2015. Impairment of the cortisol stress response mediated by the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to monocrotophos pesticide. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **176-177**, 10-16.

초록 : Dithiopyr에 노출이 zebrafish의 유영 행동에 미치는 영향오준영^{1†} · 박은진^{2*} · 강성은¹ · 이승현^{1*}(¹제주대학교 해양생명과학과, ²제주대학교 식품생명공학과)

본 연구에서는 발아전처리 제초제인 Dithiopyr (DTP)를 시험물질로 사용하여 급성 독성시험을 평가하고, zebrafish의 행동에 미치는 영향을 연구하였다. 급성 독성시험 결과 zebrafish에서의 DTP의 LC₅₀값은 14.49 μ M이었다. 또한 DTP 노출이 유영 패턴에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 아치사농도(2.5-20 μ M)에서 novel tank test (NTT)와 open field test (OFT)의 두 가지 행동실험을 실시하였다. NTT를 실시한 결과, 하층부의 머무는 시간 및 최초로 상층부에 들어간 시간, 회전각, 부동 시간의 경우 control 그룹과 비교하여 통계적으로 유의성 있게 농도 의존적으로 증가하였다($p < 0.05$). 또한 상층부에 진입한 횟수 및 평균 유영속도에서 통계적인 유의성 있는 감소 현상이 확인되었다($p < 0.05$). OFT를 실시한 결과, 총 이동 거리 및 평균 유영속도에서 유의성이 있는 감소 현상이 확인되었다($p < 0.05$). 부동 시간 및 회전각, 굴곡유영에서는 유의성 있는 증가 현상이 확인되었다($p < 0.05$). 또한 Whole-body cortisol level 측정 결과, 저농도 노출 그룹에서만 유의성 있는 증가가 관찰되었으나($p < 0.05$), 5와 10 μ M에서는 유의성 있는 차이가 관찰되지 않아 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.