Journal of Environmental Science International
23(3); 483~492; March 2014

pISSN: 1225-4517 eISSN: 2287-3503
http://dx.doi.org/10.5322/JESI.2014.23.3.483

ORIGINAL ARTICLE

이산화탄소로 산성화된 해수에 노출된 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 혈구세포에 대한 유전독성(DNA 손상)

최태섭[1)*] · 이지혜[1)] · 성찬경[1),2)] · 이정석[1)] · 박영규[3)] · 강성길[4)]

1)(주)네오엔비즈 환경안전연구소, 2)서울시립대학교 에너지환경시스템공학과,
3)한국해양과학기술원 해양순환 · 기후연구부, 4)한국해양과학기술원 해양시스템안전연구소

Genotoxicity (DNA damage) on Blood Cells of Parrot Fish (*Oplegnathus fasciatus*) Exposed to Acidified Seawater Making of CO_2

Tae Seob Choi[1)*], Ji-Hye Lee[1)], Chan-Gyoung Sung[1),2)], Jung-Suk Lee[1)], Young-Gyu Park[3)], Seong-Gil Kang[4)]

[1)]*Institute of Environmental Protection and Safety, NeoEnBiz Co. Daewoo Technopark A-1306, Dodangdong, Bucheon, Kyeonggido 420-806, Korea*
[2)]*Department of Energy and Environmental System Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea*
[3)]*Ocean Circulation and Climate Research Division, Korea Institute of Ocean Science and Technology (KIOST), 787 Haean-ro, Sangnok-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do 426-744, Korea*
[4)]*Offshore CCS research Unit, Korea Research Institute of Ships & Ocean Engineering (KRISO), 1312 Yusung-daero, Yusung-gu, Daejeon 305-343, Korea*

Abstract

DNA damage such as genotoxicity was identified with comet assay, which blood cell of a marine parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*) was exposed to an acidified seawater, lowered pH gradient making of CO_2 gas. The gradient of pH were 8.22, 8.03, 7.81, 7.55 with control as HBSS solution with pH 7.4. DNA tail moment of fish blood cell was 0.548 ± 0.071 exposed seawater of pH 8.22 condition, on the other hand, DNA tail moment 1.601 ± 0.197 exposed acidified seawater of pH 7.55 lowest condition. The approximate difference with level of DNA damage was 2.9 times between highest and lowest of pH. DNA damage with decreasing pH was significantly increased with DNA tail moment on blood cell of marine fish (ANOVA, $p < 0.001$). Ocean acidification, especially inducing the leakage of sequestered CO_2 in geological structure is a consequence from the burning of fossil fuels, and long term effects on marine habitats and organisms are not fully investigated. The physiological effects on adult fish species are even less known. This result shown that the potential of dissolved CO_2 in seawater was revealed to induce the toxic effect on genotoxicity such as DNA breakage.

Key words : Fish, Carbon dioxide, Seawater pH, Genotoxicity, DNA damage, Comet assay

Received 24 January, 2014; **Revised** 6 March 2014;
Accepted 12 March, 2014
[*]**Corresponding author** : Tae Seob Choi, Institute of Environmental Protection and Safety, NeoEnBiz Co. Daewoo Technopark A-1306, Dodangdong, Bucheon, Kyeonggido 420-806, Korea
Phone:+82-10-4626-7195
E-mail : tschoi@neoenbiz.com

ⓒ The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
ⓒ 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.

1. 서 론

대기 중의 이산화탄소(CO_2) 농도가 2100년 1,000 ppm 수준으로 증가하면 표층 해수의 평균 pH는 약 0.3～0.5 정도 떨어질 수 있는 것으로 예측되고 있다(Andersson 등, 2005; Caldeira와 Wickett, 2005). 이와 같은 표층해수의 산성화는 해수 중 수소이온(H^+)의 농도가 2배 이상 증가함을 의미하는 것으로 이에 따른 해수의 물리화학적 환경 변화 및 생태계 변화(또는 피해)는 매우 심각할 수 있다. 또한 대기 중 CO_2의 농도는 2100년 이후에도 지속적으로 늘어날 가능성이 있어 표층 해수의 산성화는 가속화 될 것으로 예상한다(Andersson 등, 2005). 다양한 예측 모델에 따라 해수의 pH는 2200년이면 최대 1.0 이상 감소하여 6.7 수준까지 떨어질 수도 있다고 보고되고 있다(Sabine, 2004).

해수의 pH는 일반적으로 7.5～8.5 범위에 있으며, 해양 표층에서 햇빛이 강한 경우 해산식물에 의한 광합성작용이 활발하여 해수의 pH가 증가하기도 하지만 이에 상응하여 해산동물에 의한 호흡 때문에 해수의 pH는 다시 감소하여 평형을 이루게 된다(Wetzel, 1983). 이 외에 아주 드물게 호기성 해수의 pH가 7.7～7.6 수준까지 감소하는 경우도 있다(Kuntzen, 1981). 표층해수의 pH 변화는 해수가 갖는 충분한 완충능력 때문에 관심을 갖지 않는 경우가 대부분이지만 pH는 해수화학(seawater chemistry)의 관점에서 가장 핵심적인 요소이다(Steele 등, 2010). 표층해수의 pH 변화는 광합성, 호흡, 석회형성(calcification), 화학평형, 세포외 효소의 기능, 미세환경에서의 보상기작 등 생물의 생리활성에 광범위하게 영향을 미칠 수 있다(Fabry 등, 2008). 또한 해수화학에 있어서 pH의 감소는 해수에 녹아 있는 금속이온의 화학적 형태를 변화시키거나, 양쪽성 물질의 전하상태를 바꾸며, 기타 다양한 화합물의 용해도를 변화시킴으로서 해양에 서식하는 생물들에게 간접적인 악영향을 미칠 수 있다(Cambel과 Stokes, 1985). 표층해수 pH 변화로 인해 해수에 용존되어 있는 유해한 화합물의 생물학적 독성과 축적 정도에 영향을 미침으로써 그 결과로 나타나는 생물에 대한 악영향은 매우 중요한 문제가 될 수 있을 것이다.

해수 pH 변화로 인해 일본산 진주조개의 경우 pH 7.4와 7.7에서 각각 사망률이 증가하거나 성장이 감소되는 결과를 보여 주었으며, pH 7.6은 조개 패각의 용해를 지시하는 것임을 밝혔다(Kuwatani와 Nishii, 1969). Sunda와 Guillard(1976)는 물질의 농도가 일정하지만 해수의 pH가 7.7로 감소했을 때, 식물플랑크톤에 대한 구리의 독성이 증가한다고 보고하였다. 이 연구는 해수에서 중금속의 화학적 평형이 pH가 감소함으로서 구리이온이 증가하고 그에 따른 생물학적 독성영향도 증가한다는 것을 보여준 것이다. 일반적으로 해수 pH 7.5～7.0 범위에서는 생물에 대해 치명적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 하지만 일부 해산식물의 경우 pH 6.0 이하에서도 살 수 있는 호산성 또는 산성 환경에 잘 견디는 종이 있는 것도 보고되어 있다(Diaz와 Maberly, 2009).

해양생물의 개체 또는 개체이하 수준에서 해수 pH 변화에 의한 영향을 평가하기란 매우 어렵다. 일반적으로 생물은 내외부의 환경변화로부터 항상성(homeostasis)을 유지하기 위해 다양한 생리적 기능을 갖추고 있거나, 환경변화의 초기에 대사활동을 통해 영향을 받지 않으려 하기 때문이다. 해산어류에서 혈액의 pH 변화를 조절 가능한 수준은 해수에서 이산화탄소분압(pCO_2)의 농도가 5000 μatm까지인 것으로 알려져 있다 (Hayashi 등, 2004; Michaelidis 등, 2007). 이산화탄소분압(pCO_2)이 증가된 해수에 어류가 노출되는 경우 체내 pCO_2의 증가를 초래할 것이며, 그 결과 체액에서 호흡성 과다산증(respiratory acidosis)에 대한 보상을 위하여 산(acid) 배출이 필요하게 되며, 어류에서 산-염기 조절기능을 일차적으로 담당하는 곳은 아가미에서 이러한 과정이 일어날 것이다(Perry와 Gilmour, 2006). 어류 아가미에서 일어나는 산-염기의 조절은 장(gut)이나 신장에서 일어나는 이온교환에 의해서 완결될 것이다. 고삼투압(hyperosmotic) 환경인 해수에 서식하는 어류의 경우 생육에 필요한 물을 얻는 과정에서 과량의 칼슘이온(Ca^{2+})이 체내에 풍부해지며 이것은 결국 탄산칼슘으로 침적되게 된다.

일반적인 해수 pH 수준에서는 중탄산염(HCO^{3-})이 가장 많이 분포하지만 해수의 pH가 7.5 이하로 감소하는 경우 상대적으로 자유 이산화탄소 형태(CO_2 +

H_2CO_3)가 증가한다. 이러한 자유 이산화탄소 형태의 증가는 해양에 서식하는 생물에게 호흡기능부전과 같은 직접적인 영향을 미칠 수 있으며, 생물의 세포외 공간(extracellular space)으로 유입되어 화학적 감각신경의 pH를 감소시켜 아데노신의 축적과 분비를 통해 심장이나 근육기능의 부전을 유발할 수 있다고 알려져 있다(Pörtner 등, 2004). 또한 자유 이산화탄소 형태는 수소이온과는 달리 전하를 띠지 않는 중성으로 쉽게 세포막을 통과할 수 있으며, 따라서 해수에 유입된 고농도의 CO_2는 생물의 세포 내로 많은 양이 흡수될 수 있으며, 흡수된 CO_2가 가수분해되어 수소이온과 중탄산염을 형성하게 되면 세포 내 pH가 감소하고 중탄산염 농도가 증가하는 과정을 통해서 생리생화학적 저해영향이 나타날 수 있다(Pörtner 등, 2004).

생물의 세포내 pH가 변화하는 것은 다양한 효소계의 활성도 및 이온 교환 과정에 영향을 미치거나, 혈액의 pH를 변화시켜 순환계와 근골격계의 기능에 영향을 미칠 수도 있다(Knutzen, 1981). 또한 탄산칼슘이 주성분인 이매패류나 고둥류, 갑각류 등의 외피 생성과정에 영향을 미칠 수 있으므로, CO_2의 영향은 어떤 특정 기능이나 조직에만 영향이 한정되어 나타나지 않을 것이다(Brennan 등, 2004).

본 연구는 해수에서 용존 CO_2의 증가로 인한 pH의 변화에 의한 해양생물에 대한 영향을 살펴보기 위하여 어류 혈액을 채취하여 CO_2로 산성화된 해수에 *in vitro* 상태로 노출시킨 후, 혈구세포 속에서의 DAN 손상 정도를 comet assay(single cell gel electrophoresis)기법을 활용하여 관찰하였다. Comet assay는 유해화학물질 또는 환경변화에 의한 직접적인 DNA 나선구조의 절단 능력(-strand의 breaking capacity)을 측정할 수 있으며(Hovhannisyan, 2010), 상대적으로 빠르고 매우 민감한 형광현미경 관찰을 기반으로 하여 DNA 손상 및 복구(회복)의 정도를 개개의 세포수준에서 측정할 수 있다는 장점을 가지고 있다(Collins 등, 2008; Tice 등, 2000; Wong 등, 2005). 또한 comet assay는 다양한 요인에 의해 발생할 수 있는 생물의 산화스트레스에 의한 DNA 손상을 측정하는 가장 좋은 방법 중 하나로 해양 생태계의 생태학적인 건강/위험을 측정하는 중요한 역할을 하고 있다(Adams, 1993). 그리고 comet assay를 활용한 일부 연구들은 유기물질 오염과 중금속 오염을 평가하는데 적용되고 있다(Li 등, 2006). 생물체 내에서 DNA의 손상은 RNA로의 전사를 저해하여 결국 효소활동 저해, 일반 대사기능 저하, 세포 내 기능 손상, 성장 저해, 생체 내 조직과 기관의 위축 및 기능 저하, 생물의 성장 둔화, 노화, 면역기능 저하와 생식기능저하, 질병에의 잦은 노출, 그리고 주위 환경에 대한 적응력 저하 등 광범위한 생체 내 생리이상을 유발하는 것으로 알려져 있다(Wilson 등, 1998).

본 연구에서는 CO_2로 산성화된 해수의 생물에 대한 유전독성(genotoxicity) 영향을 파악하기 위하여 CO_2로 산성화시킨 해수에 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 혈액을 *in vitro* 상태로 노출시킨 후 혈구세포 속에서의 DAN 손상 정도를 comet assay 기법을 이용하여 측정하였으며, 이를 통해 CO_2에 의한 생물영향을 세포수준에서 확인할 수 있는지 여부를 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시험생물과 해수의 pH 조절

산성화된 해수에 노출된 생물의 DNA 손상 정도를 평가하기 위하여 이용된 시험생물은 경남 통영 인근 해역에 서식하는 체장 약 10 cm 정도의 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)이었으며, 2011년 2월 경남 통영 인근에서 채집된 개체를 살아있는 상태로 수조에 담아 실험실로 이동하였다. 돌돔은 실험실로 이동한 후에는 20 L 크기의 수조에 옮겨 담았으며, 수조는 공기발생기를 부착하여 폭기하고, 11～13℃ 수온에서 실험 전까지 유지하였다. 시험생물인 돌돔(*O. fasciatus*)은 한국어류검색도감(Encyclopedia of Fish in Korea, Yoon, 2002)을 참고하여 동정 확인하였다.

해수의 pH 구배는 농도가 조절된 CO_2 가스(balanced CO_2 + Air, 용기압력은 20℃에서 10 MPa, (주)에어코리아)를 이용하여 조절하였다. 해수의 pH를 조절하기 위해 준비한 CO_2 가스는 총 4개 농도구배였으며, 각각 380, 740, 1,500, 3,000 ppm이었다. 각 농도별 조제된 CO_2 가스를 2 L 크기의 폴리카보네이트 용기에 담은 멸균해수에 약 2시간 이상 폭기하였다. 각 농도별 CO_2 가스를 이용하여 폭기한 해수의 최종 pH 구배는 각각 8.22, 8.03, 7.81, 그리고 7.55이었다. CO_2 가스

를 이용하여 pH가 조절된 해수는 50 mL을 취하여 마개가 있는 배양용 플라스크에 담아 공기와 접촉하지 않도록 밀봉하여 실험 전까지 해수의 pH를 유지하였다. 해수의 pH는 pH meter(model 420, Thermo Orion, USA)를 이용하여 확인하였다.

2.2. Comet assay

돌돔 혈구세포를 추출하기 위하여 주사기를 항문 쪽으로 주입하여 척추 아래를 흐르는 배주동맥으로부터 10～100 μL의 혈액을 채혈하였다. 혈구세포가 포함된 돌돔의 혈액 1～2방울에 Hank's balanced salt solution (HBSS) 2 mL를 넣어 희석하였다. 희석한 돌돔 혈액 중 100 μL를 취하여 CO_2 가스와 염산으로 pH를 조절한 해수 100 μL와 HBSS 용액 800 μL가 담겨 있는 1.5 mL 크기의 원추형 튜브에 넣고 마개를 막아 한 시간 동안 4℃의 암냉소에 보관하였다.

Comet assay는 Singh 등 (1988)을 참고하였으며, 일부 과정을 수정하여 이루어졌다. CO_2와 염산으로 pH를 조절한 해수에 노출된 돌돔 혈액시료를 암냉소로부터 꺼내 5,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 원심분리를 통해 분리되어진 혈구세포들을 0.6 % low-melting agarose gel (LMA) 60 μL를 넣고 흔들어 재부유시켰다. 이 중 30 μL를 취하여 1.5 % normal-melting agarose gel (NMA)로 미리 코팅되어진 슬라이드의 한쪽에 올리고, 남은 시료에 agarose gel 500 μL를 추가하여 흔든 후, 30 μL를 취하여 동일한 슬라이드의 다른 한쪽에 올리고 각각 커버글라스를 덮은 후, 약 3분간 얼음 위에 정치하여 시료를 응고시켰다. 시료가 응고된 슬라이드에서 커버글라스를 제거한 뒤 agarose gel 30 μL로 한 번 더 코팅 시킨 후, 커버글라스를 덮고 얼음 위에 다시 약 3분간 정치하였다. 시료를 응고시킨 슬라이드의 커버글라스를 제거하고, 세포핵을 제외한 세포 소기관을 용해시키기 위한 lysis 완충용액 (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10 % DMSO, 1 % Triton X-100)이 담긴 coplin jar에 넣고 시료를 약 2시간 이상 냉장 보관하였다. 이때 적당한 용기에 증류수를 담아 함께 냉장하여 차가운 증류수를 준비하였다. 시간이 경과한 후, 응고된 시료가 올려진 슬라이드와 차가운 증류수를 꺼내고, 차가운 증류수를 3개의 coplin jar에 나누어 담고 시료 슬라이드를 2분 간격으로 3번 옮겨 주었다. 다른 coplin jar에 DNA unwinding 완충용액 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13)을 넣고 슬라이드를 옮겨 담아 15분간 다시 냉장 보관하였다. 그 후 동일한 DNA unwinding 완충용액을 채운 전기영동 용기에 슬라이드를 넣고 25 V, 300 mA의 조건에서 25분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 시료 슬라이드를 0.4 M Tris-HCl 용액 (pH 7.5)이 든 coplin jar에서 2분씩 3번 세척함으로써 시료 슬라이드의 중성화가 이뤄지도록 하였다. 중성화 시킨 시료 슬라이드를 차가운 에탄올이 담긴 coplin jar에 5분간 담근 후, 꺼내어 25℃의 실온에서 건조시켰다. 건조된 시료 슬라이드에 EtBr(ethidium bromide)용액 30 μL을 넣어 염색시킨 후, 형광현미경 200배율 하에서 돌돔 혈구세포의 DNA 손상 정도를 관찰하였다.

2.3. 자료의 분석

EtBr용액으로 염색된 돌돔 혈구세포의 DNA 손상 정도는 형광현미경에 장착된 CCD카메라를 이용하여 촬영하고, 이미지 자동분석 소프트웨어(Komet ver. 5, Kinet Imaging Ltd.)을 이용하여 DNA tail moment (부서진 DNA 꼬리의 길이(μm) X 꼬리부분에 있는 DNA(%))를 분석하였다. 한 개의 시료 슬라이드에서 약 50개의 혈구세포 DNA 손상 정도를 반복 측정하였다. CO_2와 염산으로 조절된 해수 pH 구배의 영향을 확인하기 위하여 분산분석(ANOVA, $p < 0.05$)을 수행하였으며, CO_2로 조절된 해수 pH 조건과 염산으로 조절된 유사한 수준의 해수 pH 조건에서 DNA 손상의 통계적 차이를 t-test($p < 0.05$)를 이용해 확인하였다.

3. 결 과

Comet assay는 단일세포 젤 전기영동법(single-cell gell electrophoresis)으로 단일세포 수준에서 DNA 단일가닥 손상(single strand break)을 확인할 수 있는 방법으로 알려져 있다(Hovhannisyan, 2010). 본 연구는 해수에서 CO_2 농도 증가로 인한 pH의 변화에 의한 어류(돌돔) 혈구세포의 DNA 손상 정도를 comet assay를 이용하여 확인하였다. 돌돔 혈구세포를 이산화탄소를 이용하여 산성화된 해수의 pH 구배에 노출한 후

DNA 손상이 전혀 없는 세포핵과 DNA 단일가닥 손상이 많이 나타난 세포핵의 대표적인 이미지를 Fig. 2에 나타내었다. DNA 단일가닥 손상이 많은 경우 상대적으로 단일가닥의 길이가 짧아져 (+)극으로 많이 이동하게 되어 Fig. 2(e)에 나타난 것과 같이 혜성처럼 꼬리가 길어지게 된다. 꼬리부분에 DNA의 양이 많거나 꼬리의 길이가 길어지면 tail moment의 값(DNA 손상의 정도)이 커지게 된다. 따라서 tail moment 값이 커질수록 DNA 단일가닥 손상이 많음을 의미한다 (Kim 등, 2003).

해수의 산성화는 가스상의 CO_2를 해수에 폭기하여 pH를 조정하였으며, pH의 농도구배는 8.22, 8.03, 7.81, 7.55 이었다. 대조구는 HBSS 용액을 이용하였으며, HBSS의 pH는 7.4 이었다. pH 8.22 조건에서 돌돔 혈구세포의 DNA tail moment는 0.548 ± 0.071 (mean ± S.E) 이었으며, pH 8.03에서 0.835 ± 0.124, pH 7.81에서 1.114 ± 0.143, pH 7.55에서 1.601 ± 0.197 이었다. pH 7.4인 HBSS에서의 DNA tail moment는 0.657 ± 0.138이었다(Fig. 1). 대조구로 활용한 HBSS에서 DNA tail moment와 비교하여 가장 낮은 수준인 pH 7.55에 노출된 혈구세포의 DNA tail moment는 약 2.4배 정도 증가하였다. 따라서 이산화탄소로 산성화된 해수의 pH 농도구배에서 pH가 감소함에 따라 돌돔 혈구세포의 DNA tail moment가 유의하게 증가하고 있음을 확인하였다(Table 1, ANOVA, $p < 0.001$). pH 구배의 가장 낮은 조건과 높은 조건인 pH 7.55와 8.22에서의 DNA tail moment를 비교하였을 때 약 2.9배의 차이를 보였다. 이는 해수의 산성화로 인해 pH가 낮아지고, 상대적으로 짧은 시간의 노출에도 돌돔 혈구세포의 DNA가 손상되고 있음을 보여주는 결과였다.

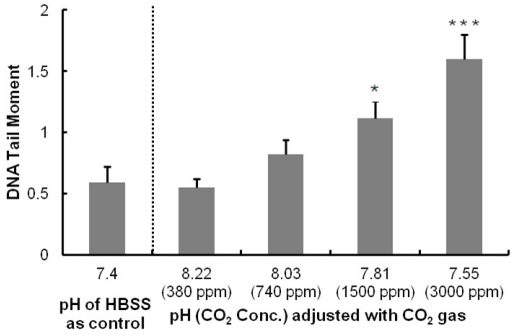

Fig. 1. Variation of DNA tail moment with a range of seawater pH adjusted with CO_2 on the DNA damage of blood cells of *O. fasciatus*. Error bar means standard error of 45~50 replicates. The asterisk (*, **, ***) denotes that results are significantly different from the control at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

4. 고 찰

해양생물의 DNA의 손상은 다양한 요인에 의해 발생할 수 있으며, 해양환경에서는 햇빛에 노출될 때 자외선(UV-B) 영역의 복사선을 흡수함으로서 DNA에 손상을 입히는 것이 가장 일차적인 원인으로 알려져 있다. 이는 세포 내에 자외선에 민감한 거대분자들이 많이 존재하며, 특히 DNA는 주요 표적이 되어 자외선에 의한 치명적인 독성이 발현된다. 환경 중에서 DNA 손상과 같은 유전독성을 발현하는 화합물로는 대표적으로 해양환경에서 자주 검출되는 유기오염물질인 다환방향족탄화수소(PAHs)의 한 성분인 benzo[a]pyrene 생물체 내에서 DNA 손상을 일으키는 것으로 가장 많이 알려져 있다(Claxton 등, 1998). 이 외에도 유기염소계 화합물 및 유도체, 지방족 화합물, 방향족 아민(aromatic amines) 등 다양한 화합물이 유전독성을 갖는 것으로 알려져 있다(De flora 등, 1989). 유전독성

Table 1. Summary of the analysis variance (ANOVA) for the effect with a range of seawater pH adjusted with CO_2 on the DNA damage of blood cells of *O. fasciatus*.

Condition	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	Probability
Between groups	35.123	4	8.781	9.036	< 0.001***
Total	267.359	243			

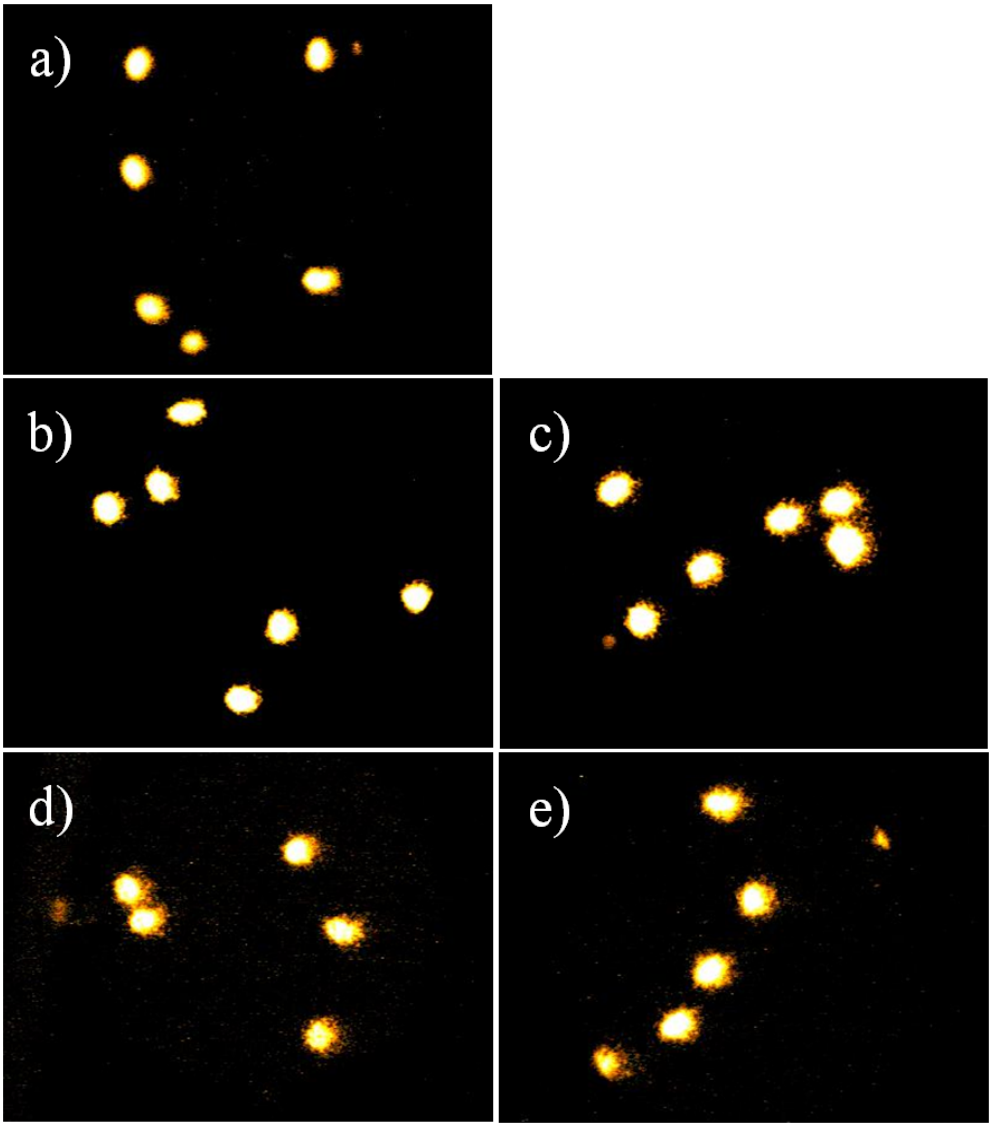

Fig. 2. Image after running the comet assay with *O. fasciatus* blood cells, a) pH 7.4 of HBSS as control, b) pH 8.22 made by CO_2 gas, c) pH 8.03, d) pH 7.81, e) pH 7.55, respectively.

을 발현하는 화합물 중에서 DNA와 상호작용을 통해 독성이 발현되는 경우 먼저 대사작용에 의해 활성화된 후 유전독성물질로서 독성작용이 발현되게 되며, 간접적으로는 산소 또는 수산기를 갖는 라디칼의 형성을 통해 유전독성을 발휘하게 된다(De flora 등, 1989).

이산화탄소(CO_2)나 일산화탄소(CO)와 같은 화합물이 직접적으로 또는 pH 변화와 같이 간접적으로 해양생물에 대해서 세포독성이나 유전독성을 발현한다는 연구는 아직 확인된 바 없다. 일부 인간과 관련된 연구에서 초임계상태의 이산화탄소를 이용하여 추출된 추출물이 암세포주에 대해 세포독성이 발현된다는 연구는 있었다(Ghafar 등, 2013).

해양 표층에서 해수의 pH는 7.5~8.5 사이이며, 평균적으로 약 8.1 정도가 일반적이다. 과거에 비해 pH

가 평균적으로 약 0.1 정도 감소하는 것은 해수 중의 수소이온(H^+)이 약 30% 증가하는 것과 동일하다(Caldeira와 Wicket, 2003). 표층해수의 pH 변화에 대한 예측 시나리오에 따르면 향후 100년 내에 pH 7.9까지 감소할 것으로 예상되며(Thornton, 2009), 예측 시나리오를 기반으로 Caldeira와 Wicket (2003)이 계산한 바에 따르면 2100년 정도에는 pH 7.7까지 2250년까지 pH 7.4까지 감소할 것으로 예상하였다. 해수 표층에서의 pH 변화는 해양에서 탄소의 순환과 관련된 다양한 기작(용존무기탄소가 관여하는 다양한 순환 및 기작 등)에 영향을 미칠 것이며, 해양에 서식하는 생물에게 장기적인 생리적 효과를 발휘할 수 있을 것이며, 이에 대해서는 널리 알려져 왔다(Kleypas 등, 1999; Sabine 등, 2004; Royal Society, 2005). 하지만 이산화탄소에 의해 해수의 산성화가 발생하고 해수의 pH가 급격하게 변화하는 환경에 해양생물이 노출되었을 때, 생물의 DNA 손상이 발생하는 유전독성의 발현에 대한 연구는 아직까지 없었다. 본 연구에서는 해산어류의 혈액을 채취하여 *in vitro* 상태로 노출하고, comet assay를 이용하여 혈액에 존재하는 DNA의 손상을 확인하였다. 이러한 pH 변화에 의해 DNA 손상을 유도하는 정확한 기작에 대해서는 명확하지 않으나, 분석화학적 방법이나 생물학적 방법을 이용한 추후 연구를 통해 파악할 수 있을 것으로 기대하고 있다.

급격한 pH 변화에 노출된 해산어류의 생리학적 영향 등이 나타나는 세포독성이나 유전독성에 대해서는 많은 연구가 수행되지는 않았으며, 일부 연구에서 서로 다른 성장단계에 있는 어류 등에서 감각능력과 관련된 생리적 영향이 나타날 수 있음을 보여준 결과가 전부다(Munday 등, 2009). Hayashi 등 (2004)은 이산화탄소에 기인한 pH의 감소에 따른 독성을 평가하였다. 넙치(Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*)를 CO_2를 이용하여 pH 6.18까지 낮춘 산성화된 해수에 노출하였으며, 이와 동시에 황산(H_2SO_4)으로 산성화한 해수에 넙치를 노출하여 개체의 사망률을 측정하였다. CO_2로 산성화된 해수에 노출한 실험구에서 48시간이내에 어류가 사망하였으며, 반면에 황산으로 산성화된 해수에 노출된 실험구에서는 한 마리밖에 죽지 않는 결과를 보였다. 이 결과는 pH를 낮추기 위하여 이용한 CO_2로 인하여 만들어진 탄소과다(hypercapnia)의 유해성을 보여준 것이라고 판단된다. CO_2는 세포외 체액(extracellular fluids)에서 산성증(acidosis)를 유발할 뿐만 아니라 해산어류의 모든 성장단계에서 CO_2의 치명적인 독성영향의 일차적인 이유가 되는 심장에서 분출되는 혈액의 양을 감소시키는데 기여하는 심장세포에 대한 치명적인 손상이 원인일 것으로 판단하고 있다(Gunnarsson, 2010). Hayashi 등 (2004)은 이 결과를 통해서 어류들이 수소이온(H^+) 농도의 증가보다 탄소과다에 훨씬 더 민감하다고 판단하고 있다. 그 이유는 해수에서 CO_2 증가로 인한 탄소과다 환경에서 CO_2 활성분자가 양전하된 수소이온(H^+)보다 세포막을 쉽게 통과할 수 있기 때문에 높은 이산화탄소 분압(pCO_2)에 민감하지 않다는 것이다. 또한 해수 중에서 CO_2 농도의 증가는 어류의 아가미에서 가스교환이 이루어지는 라멜라(lamellas)에서 산소(O_2) 분자에 대한 친화력(affinity)의 감소를 유도할 것이다(Lee 등, 2003; Ishimatsu 등, 2004).

해수에서 CO_2 농도가 증가하게 되면 어류 체내의 이산화탄소 분압(pCO_2)은 증가하게 되고 혈액의 pH는 감소하게 된다. 평형에 도달하게 되면 아가미상피에서 H^+와 HCO_3^-가 교환되어 pH를 회복한다. 어류의 체액(body fluids)의 정상적인 pH는 약 7.4 정도이며, 동맥의 혈액은 약간 더 염기성이며, 정맥을 흐르는 혈액은 조금 더 산성이다. 이것은 혈액의 대사활성이 정맥혈액에서 용존 CO_2의 농도를 높이기 때문이다(Gunnarsson, 2010). 세포외 체액에서 pH의 감소 또는 증가는 각각 산성증 또는 알칼리혈증(alkalosis)을 유도하며, 해양 척추동물에서 산성증은 단백질 기능장애와 신경세포 시냅시스의 기능장애에 대한 가장 분명한 증거로 인식되고 있다(Widdicombe과 Spicer, 2008). 해양생물에서 세포외 체액에서 일정한 pH를 유지하기위한 능력은 생물의 종류에 따라 다르다. 어류와 같은 척추동물의 경우 세포외 체액에서 항상성을 유지하기 위하여 일정한 pH 상태를 유지하여야 하며, pH의 변화는 다양한 물질의 세포벽 통과가 달라지면 이에 따른 세포내 유입의 차이로 인하여 물질의 영향도 달라질 수 있다(Claiborne 등, 2002; Pörtner 등, 2004).

다양한 요인에 의한 pH 감소의 영향은 저서생물에서도 관찰되어 왔다. 해양에서 극피동물의 역할은 해

양퇴적물에서 저서교란 또는 생물학적 광물합성의 역할을 수행하여 퇴적물 깊숙이 산소를 공급하며 생물다양성의 증가 기여하는 것으로 알려져 있다(Ambrose 등, 2001). 극피동물의 경우 pH의 변화에 대단히 민감하며, 그 이유는 외형(exoskeleton)에 탄산칼슘을 사용하기 때문에 pH와 탄산염(CO_3^{2-})의 포화에 매우 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(Feely 등, 2004; Kleypas 등, 2006). Kikkawa 등 (2004)은 어류인 *Pagrus major*를 이용하여 실시한 시범적인 연구에서 동일한 pH 하에서도 CO_2를 이용해 산성화한 해수의 독성영향이 염산을 이용한 경우보다 훨씬 더 큰 것으로 나타나 CO_2 증가에 따른 생물영향은 단순한 산성화(pH 감소)에 따른 영향만으로 설명할 수 없음을 보고하였다. 대기 중 CO_2가 해수로 유입되면 수소이온의 농도와 함께 용존 CO_2의 농도도 증가하게 되는데, 이렇게 생성된 용존 CO_2는 무극성으로 세포막을 투과하여 세포내로 유입될 수 있다. 세포로 유입된 CO_2는 가수분해를 통해 수소이온을 생성하게 되므로 세포내 pH를 낮추게 되는데 이때 세포는 항상성 기작에 의해 다시 원래의 pH로 회복하기 위해 중탄산염 등 이온교환을 실시하게 된다. 하지만 원래의 pH로 회복되어지기까지는 일정한 시간이 소요되면 그 과정에서 일부 세포내 기관들이 손상될 수 있다.(Seibel과 Walsh, 2001). 대기 중 CO_2 유입으로 산성화된 해수에는 염산으로 산성화된 해수와 동일한 농도의 수소이온과 함께 매우 높은 농도의 용존 CO_2가 함께 존재하게 되므로 이론적으로는 상대적으로 더 큰 독성 영향을 예상할 수 있다. 최근 어류인 *P. major*의 유생에 대한 실험에서 Ishimatsu 등 (2004)은 흥미로운 결과를 보고하였다. 동일한 해수를 CO_2와 염산으로 각각 산성화시킨 다음 어류 유생을 노출 배양한 결과 동일한 pH에서 CO_2로 산성화한 해수에서의 사망률이 염산으로 산성화한 해수에서보다 매우 크게 나타난 것이다. 이와 같은 결과는 CO_2의 어류 유생에 대한 독성영향은 단순히 해수가 산성화된 결과로 나타나는 것이 아님을 보여주는 증거가 될 수 있다.

본 연구에서의 어류 혈구세포의 DNA 손상을 관찰하기 위하여 이용한 CO_2의 농도 수준은 최대 약 0.3 % 수준이었으며, DNA tail moment는 1.6으로 유전독성이 알려진 물질의 DNA tail moment 4 (Benzo[a]Pyrene 0.01 ppb 조건) 또는 DNA tail moment 20 (Pyrene 1 ppb 조건) 수준에 미치지 못하였다. 따라서 추가적인 실험을 통하여 저농도의 CO_2로 산성화된 해수에 만성적으로 노출된 어류의 성장, 대사, 이상행동 등의 원인이 DNA 손상기인여부를 확인 할 필요가 있다. 하지만 본 연구를 통해서 상대적으로 낮은 수준의 CO_2로 산성화된 해수에 노출된 어류 혈구세포의 DNA 손상 영향은 급성영향으로 생물저해영향이 나타남을 알 수 있었다. DNA 손상과 같은 유전독성이 발현되는 농도 수준은 대기 중 CO_2 증가로 인해 나타나는 수준으로 보기에는 어렵다고 판단되며, CO_2 가스가 심해에 투기되는 조건에서는 투기지점 부근의 제한적인 시공간적 범위에서는 존재할 수 있는 농도 수준으로 볼 수 있다.

대기 중 CO_2 농도의 지속적인 증가에 대한 해법으로 CO_2의 지중저장이 실현가능한 기술로 실증되고 있는 과정에서 표층 해수의 산성화와 용존 CO_2 농도 증가에 따른 생물학적 위해에 대한 연구들이 증가하고 있다. 대기 중 CO_2 농도를 제어하기 위한 방안의 하나로 제시된 해저지층구조에 영구격리하는 방안은 필연적으로 심해생태계에 대한 잠재적인 위해성에 대한 체계적인 연구를 필요로 하고 있으며, 기후변화와 같은 환경문제 해결을 위한 대안으로 제시된 해양처리기술이 또 다른 환경적 문제를 야기하는 것은 바람직하지 않을 것이므로 이에 따른 실제적인 환경적 피해를 정량적으로 파악하고 최소화할 수 있는 위해성 평가 체계의 마련은 해양처리기술의 실제 적용에 앞서 반드시 해결되어야 할 과제라고 할 수 있을 것이다 (IPCC, 2005).

감사의 글

본 논문은 2013년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구입니다 (CO_2 해양지중저장 기술개발).

참 고 문 헌

Adams, S. M., Brown, A. M., Goede, R. W., 1993, A quantitative health assessment index for rapid evaluation of fish condition in the field, Trans. Am. Fish. Soc., 122, 63-73.

Ambrose, Jr. W. G., Clough, L. M., Tilney, P. R., Beer, L., 2001., Role of echinoderms in benthic remineralization in the Chukchi Sea, Mar. Biol., 139, 937-949.

Andersson, A. J., Mackenzie, F. T., Lerman, A., 2005, Coastal ocean and carbonate systems in the high CO_2 world of the Anthropocene, Am. J. Sci., 305, 875-918.

Brennan, S. T., Hughes, A. V., Friedmann, S. J., Burruss, R. C., 2004, Natural gas reservoirs with high CO_2 concentrations as natural analogues for CO_2 storage, Conf. Proceedings, 7th Greenhouse Gas Control Technologies Conference (GHGT-7), IEA Greenhouse Gas Programme, Vancouver, Canada.

Caldeira, K., Wickett, M. E., 2003, Anthropogenic carbon and ocean pH. Nature, 425, pp. 365.

Caldeira, K., Wickett, M. E., 2005, Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. J. Geophys. Res., 110, C09S04.

Campbel, P. G. C., Stokes, P. M., 1985, Acidification and toxicity of metals to aquatic biota, Canadian J. of Fish. & Aqua. Sci., 42, 2034-2049.

Claiborne, J. B., Walton, J. S., Compton-McCullough, D., 1994, Acid-base regulation, branchial transfers and renal output in a marine teleost fish (the long-horned sculpin; *Myoxocephalus octodecimspinosus*) during exposure to low salinities, Exp. Biol., 193, 79-95.

Claxton, L. D., Houk, V. S., Hughes, T. J., 1998, Genotoxicity of industrial wastes and effluents, Mutat. Res., 410, 237-243.

Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Tina R., 2008, The comet assay: topical issues. Mutagenesis, 23, 143-151.

De Flora, S., Zanacchi, P., Bennicelli, C., Camoirano, A., Basso, C., Bagnasco, M., Izzotti, A., Badolati, G. S., 1989, Genotoxicity biotranformation and interactions of marine pollutants as related to genetic and carciongenic hazards. In "Carciongenic, mutagenic and teratogenic marine pollutants. Impacts on human health and the environment. Advances in applied biotechnology series. Vol. 5. pp 284. Portfolio Publishing Company, Woodlands, Texas, US.

Diaz, M. M., Maberly, S. C., 2009, Carbon concentrating mechanisms in acidophilic algae, Phycologia 48, 77-85.

Fabry, V. J., Seibel, B. A., Feely, R. A., Orr, J. C., 2008, Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes, ICES J. of Mar. Sci., 65, 414-432.

Feely, R. A., Sabine, C. L., Lee, K., Berelson, W., Keleypas, J., Fabry, V. J., Milero, F. J., 2004, Impact of anthropogenic CO_2 on the $CaCO_3$ system in the oceans, Science, 305, 362-366.

Ghafar, S. A. A., Ismail, M., Yazan, L. S., Fakurazi, S., Ismail, N., Chan, K. W., Tahir, P. M., 2013, Cytotoxic activity of Kenaf Seed Oils from supercritical carbon dioxide fluid extraction towards human colorectal cancer (HT29) cell lines, Evid-Based Compl. Alt. Med., 2013,.1-8.

Gunnarsson, F., 2010, The honour thesis in ecotoxicology - Sublethal effects of low pH in two fish species (*Gasterosteus aculeatus* and *Gadus morhua*), Göteborg university. Department of Zoological Institution. 30 pp.

Hayashi, M., Kita, J., Ishimatsu, A., 2004, Comparison of the acid-base responses to CO_2 and acidification in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Mar. Pol. Bull., 49, 1062-1065.

Hovhannisyan, G. G., 2010, Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology, Mol. Cytogen., 3, 17.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2005, Carbon Dioxide Capture and Storage, IPCC Special Report, Cambridge University Press, New York.

Ishimatsu, A., Kikkawa, T., Hayashi, M., Lee, K. S., Kita, J., 2004, Effects of CO_2 on Marine Fish: Larvae and Adults. J. of Oceanogra., 60, 731-741.

Kikkawa, T., Kita, J., Ishimatsu, A., 2004, Comparison of the lethal effect of CO_2 and acidification on red sea bream (*Pagrus major*) during the early developmental stages, Mar. Pollut. Bull. 48, 108-110.

Kim, G. B., Lee, R. F., Maruya, K. A., 2003, Application of single cell gel electrophoresis for detection of DNA single strand breaks in DNA of fish blood cell. J. Kor. Fish Soc., 36, 346-351.

Kleypas, J. A., Buddemeier, R. W., Archer, D., Gattuso, J. P., Langdon, C., Opdyke, B. N., 1999, Geochemical consequences of increased atmospheric carbon

dioxide on coral reefs, Science, 284, 118 – 120.

Kleypas, J. A., Feely, R. A., Fabry, V. J., Langdon, C., Sabine, C. L., Robbins, L. L., 2006, Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research, Report of a workshop held on 18-20 April 2005, St. Petersburg, FL, sponsored by NSF, NOAA, and the U.S. Geological Survey.

Knutzen, J., 1981, Effects of decreased pH on marine organism, Mar. Pollut. Bull., 12, 25-29.

Kuwatani, Y., Nishii, T., 1969, Effects of decreased pH of culture water on the growth of the Japanese pearl oyster, Bull. Japanese Soc. Sci. Fish., 35, 342-350.

Lee, K. S., Kita, J., Ishimatsu, A., 2003, Effects of lethal levels of environmental hypercapnia on cardiovascular and blood-gas status in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Zoolog. Sci., 20, 417-422.

Li, Y., Wu, Y., Chen, Y., Kong, Z., 2006, Genotoxicity evaluation and a primary risk assessment of organic pollutants in the drinking water sources of Nanjing, China, J. of Environ. Sci., 18, 983-988.

Michaelidis, B., Spring, A., Pörtner, H., 2007, Effects of long-term acclimation to environmental hypercapnia on extracellular acid-base status and metabolic capacity in Mediterranean fish *Sparus aurata*, Mar. Biol., 150, 1417-1429.

Munday, P. L., Dixson, D. L., Donelson, J. M., Jones, G. P., Pratchett, M. S., Devitsina, G. V., 2009, Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A, 106, 1848-1852.

Perry, S. F., Gilmour, K. M., 2006, Acid-base balance and CO_2 excretion in fish: unanswered questions and emerging models, Respir. Physiol. Neurobiol., 154, 199 – 215.

Pörtner, H. O., Langenbuch, M., Reipschläger, A., 2004, Biological impact of elevated ocean CO_2 concentrations: lessons from animal physiology and earth history, J. of Oceanogra., 60, 705-718.

Royal Society, 2005, Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide, Policy Document 12/05, The Royal Society, London.

Sabine, C. L., 2004, The Oceanic Sink for Anthropogenic CO_2, Science, 305, 367-371.

Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., 2004, The oceanic sink for anthropogenic CO_2, Science, 305, 367-371.

Seibel, B. A., Walsh, P. J., 2003, Biological impacts of deep sea carbon dioxide injection inferred from indices of physiological performance, J. Exp. Biol., 206, 641-650.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., 2008, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell, Exp. Cell Res., 175, 184-191.

Steele, J. H., Thorpe, S. A., Turekian, K. K., 2010, Marine chemistry and geochemistry, A derivative of encyclopedia of ocean sciences, 2nd Edition. Elsevier Ltd. 605 pp.

Sunda, W. G., Guillard, R. R. L., 1976, The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton, J. Mar. Res., 34, 511-529.

Thornton, C., Daniel, O., 2009, Effect of low pH on carbohydrate production by a marine planktonic diatom (*Chaetoceros muelleri*). Research letters in biology., 20, 4 pages, Article ID 105901.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F., 2000, Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, Environ. Mol. Mutagen., 35, 206-221.

Wetzel, R. G., 1983, Limnology, 2nd ed. Saunders College Publishing, Philadelphia, PA.

Widdicombe, S., Spicer, J. I., 2008, Predicting the impact of ocean acidification on benthic biodiversity: What can animal physiology tell us? Mar. Biol. Ecol., 366, 187-197.

Wilson, J. T., Pascoe, P. L., Parry, J. M., Dixon, D. R., 1998, Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda) Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.

Wong, V. W. C., Szeto, Y. T., Collins, A. R., Benzie, I. F. F., 2005, The comete assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research, Curr. Top. Nutraceut. Res., 3, 1-14.

Yoon, C. H., 2002, Encyclopedia of Fish in Korea, Academy Press, 747pp.