

유전독성물질로 오염된 해양생물의 생물검정법으로서 comet assay 이용

김기범·안준건·김재원*
경상대학교 해양산업연구소, *부경대학교 해양과학공동연구소
(2005년 8월 24일 접수; 2005년 11월 23일 채택)

Use of comet assay as a bioassay in marine organisms exposed to genotoxicants

Gi-Beum Kim, Joon-Gun An and Jae-Won Kim*

Marine Industry Institute, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea
*Korea Inter-University Institute of Ocean Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
(Manuscript received 24 August, 2005; accepted 23 November, 2005)

Using single cell gel electrophoresis, DNA single strand breaks were determined in various marine organisms. DNA damage on fish blood cells was detected to know whether there was a difference between Incheon, Pohang, Masan, and Tongyeong as a control site. Tongyeong showed the lowest DNA damage among the study areas. Mussels, transplanted to Masan Bay for one month, revealed high DNA damage at sites with high economical activity. In two weeks exposure of polychaete to Incheon sediments, higher DNA damage was detected in the sediment adjacent to Incheon harbor than open sea. These results suggested that the marine organism from the polluted area revealed a relatively high DNA damage. In addition, these areas might be contaminated with genotoxic compounds and comet assay was useful as a bioassay to detect DNA damage in marine organisms.

Key Words : Comet assay, Fish, Transplantation, Mussel, Polychaete, Sediment

1. 서론

해양의 표층을 유영하는 대부분의 어류뿐만 아니라, 해양퇴적물에 서식하는 저서생물들은 자외선(Ultraviolet light, UV)뿐만 아니라 여러 오염물질에 노출되어 다양한 DNA 손상이 일어나게 된다. 특히 UV의 경우 빛에 민감한 세포내 화학물질을 들뜨게 한 후 주위에 있는 산소에 에너지를 전달함으로써 활성산소를 만들어 DNA에 여러 형태의 DNA 손상을 일으킨다. 이러한 DNA 손상은 RNA 전사와 DNA 합성을 방해하여 극단적인 경우 치사에 이르게 하므로 생물학적으로 중요한 의미를 가진다.

이러한 DNA 손상을 측정하기 위하여 자매염색

분체교환(Sister Chromatid Exchange), 염색체이상(Chromosomal aberration), 소핵실험(Micronucleus test)과 같은 방법이 개발되어져 이용되고 있으나, 이들 실험에 이용되어질 수 있는 세포의 종류는 매우 제한적이다. 그러므로 이러한 문제점을 해결하기 위해 세포의 분열주기에 관계없이 대부분의 세포에 적용시킬 수 있는 alkaline elution¹⁾, alkaline unwinding²⁾, alkaline precipitation³⁾ 등의 DNA 손상측정법이 개발되어져 왔다. 특히 Singh et al.⁴⁾에 의해 개발되어진 single cell gel electrophoresis, 일명 comet assay는 앞의 DNA 손상 측정법보다 훨씬 민감하다고 알려져 있다. 이러한 장점으로 comet assay-전기영동시 손상되어진 DNA 부분이 핵성의 꼬리와 같이 보이는 것으로부터 붙여진 이름-은 유전독성학^{5,6)}과 전염병학^{7,8)}등의 생물학 관련분야에 널리 적용되었다. 해외에서는 해산어류나 이매패류를 이용한 유전독성물질 노출여부를 판단하는 생물

Corresponding Author : Gi-Beum Kim Marine Industry Institute, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea
Phone: +82-55-640-3164
E-mail: kgb@gsnu.ac.kr

검정법(bioassay)으로 환경모니터링에도 사용되어지기 시작하였으며⁹⁻¹¹⁾, 국내에서는 최근에 들어서야 어류와 진주담치를 이용한 예비조사가 이루어졌다^{12,13)}. 한편 이러한 DNA 손상을 일으키는 물질은 여러 가지가 알려져 있으며, 그 중 환경오염물질로는 PAHs가 대표적이다. 국내에서도 진주담치를 PAHs의 몇 가지 화합물에 노출시킨 후 comet assay를 이용하여 DNA 손상의 유도를 확인하기도 하였다¹²⁾.

본 연구에서는 기존 예비조사의 결과를 바탕으로 국내에서는 처음으로 전국 연안에서 채집된 어류의 혈액을 분석하여 DNA 손상 정도에 있어서 채취지역에 따른 차이를 알아보았다. 동시에 어류시료에서 PAHs의 분석을 통하여 PAHs와 DNA 손상과의 상관관계를 살펴보았다. 그리고 마산만에 이식되어진 진주담치와 오염된 퇴적물에 노출된 지렁이에서의 DNA 손상 정도를 조사하여 comet assay가 야외 현장에서 유전독성물질 노출 여부를 지시하는 생물검정법으로 사용 가능한지에 대해 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료채집, 이식 및 노출실험

통영주변해역에서 2003년 7월과 8월 2차례에 걸쳐 6개 정점에서 9종 26마리의 어류를 채집하였다 (보리멸; *Sillagos sihama*, 노래미; *Hexagrammos agrammus*, 참돔; *Pagrus major*, 전갱이; *Trachurus japonicus*, 갈치; *Trichiurus lepturus*, 조피볼락; *Sebastes schlegeli*, 용치놀래기; *Halichoeres poeiopterus*, 볼락; *Sebastes inermis*, 문절망둑; *Acanthogobius flavimanus*).

마산만에서는 2003년 11월과 2004년 1월 2차례에

걸쳐 2개 정점에서 3종 24마리의 어류를 채집하였다 (문절망둑; *Acanthogobius flavimanus*, 노래미; *Hexagrammos agrammus*, 도다리; *Pleuronichthys cornutus*). 같은 시기에 진주담치를 10마리씩 어망에 담아 마산만내 3개 정점에 한달간 이식실험을 실시하였다.

인천연안에서 2004년 1월 2개 정점에서 2종 10마리의 어류를 채집하였다 (송어; *Mugil cephalus*, 문절망둑; *Acanthogobius flavimanus*). 이 때 채취된 인천 연안 3개 정점의 퇴적물을 1l 비이커에 담고 각 비이커에 10마리의 지렁이를 2주간 노출하였다.

포항에서는 2004년 8월 2개 정점에서 4종 7마리의 어류를 채집하였다 (실망둑; *Cryptocentrus filifer*, 별망둑; *Chasmichthys gulosus*, 문절망둑; *Acanthogobius flavimanus*, 배도라치; *Pholis nebulosus*).

어류 채집지역과 정점들은 Fig. 1에 나타내었으며, 채집일자과 채집되어진 생물종의 일반명과 학명은 Table 1에 나타내었다.

2.2. Comet assay

2.2.1. 세포추출

어류 혈액은 항문쪽으로 주사기(sterile hypodermic syringe, 1 ml, 25G)를 주입하여 척추 아래를 흐르는 배주동맥으로부터 10-100 μ l를 채혈하여 원심분리한 후 혈구세포만을 실험에 이용하였다. 적혈구수에 대한 백혈구수의 비율이 먹장어(1/4) 등 몇몇 어종을 제외하고는 대부분 1/100 이하이므로, 별도로 혈구종류에 따라 분리를 시도하지는 않았다. 진주담치의 경우 아가미조직을 소량 취하여 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 씻어준 다음

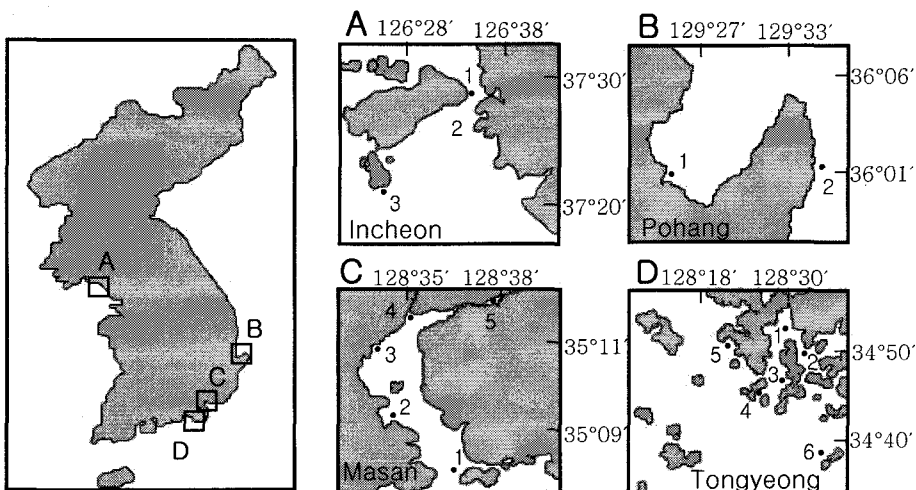


Fig. 1. Map of sampling sites.

Table 1. Fish collected in Korean coastal areas during the period of this study

Date	Area	Species
Nov. 14, 2003	Tongyeong	<i>Sillagos sihama</i> (sand smelt) <i>Hexagrammos agrammus</i> (spotty belly greenling) <i>Pagrus major</i> (red seabream) <i>Trachurus japonicus</i> (horse mackerel)
Aug. 22, 2003	Tongyeong	<i>Trichiurus lepturus</i> (hairtail) <i>Sillagos sihama</i> (sand smelt) <i>Sebastes schlegeli</i> (jacopever) <i>Halichoeres poeiopterus</i> (multicolorfin rainbowfish) <i>Sebastes inermis</i> (rockfish) <i>Acanthogobius flavimanus</i> (common brackish goby)
Nov. 30, 2003	Masan	<i>Acanthogobius flavimanus</i> (common brackish goby)
Jan. 3, 2004	Masan	<i>Hexagrammos agrammus</i> (spotty belly greenling) <i>Pleuronichthys cornutus</i> (flounder)
Jan. 9 2004	Incheon	<i>Mugil cephalus</i> (gray mullet) <i>Acanthogobius flavimanus</i> (common brackish goby)
Aug. 27, 2004	Pohang	<i>Cryptocentrus filifer</i> (gafftopsail goby) <i>Chasmichthys gulosus</i> (gluttonous goby) <i>Acanthogobius flavimanus</i> (common brackish goby) <i>Pholis nebulosus</i> (gunnel)

tissue grinder로 분쇄하여 사용하였다. 지렁이는 꼬리부분을 5mm정도 잘라 진주담치에서와 같이 tissue grinder로 분쇄한 후 분석에 임하였다.

2.2.2. comet assay 실험법

본 실험에 이용되어진 DNA 손상분석법은 Singh et al.⁴⁾의 분석법에 약간의 수정을 가한 후 사용하였다. 각 조직으로부터 추출되어진 충분한 수의 세포들을 마이크로원심분리관에서 HBSS 1 ml로 희석하였다. 원심분리를 통해 분리되어진 혈구 혹은 조직 세포들을 0.6 % low-melting agarose gel (LMA) 30 μ l로 재부유시킨 후 1.5 % normal-melting agarose gel로 미리 코팅되어진 슬라이드글라스에 놓고 커버글라스를 덮었다. 3 분간 슬라이드글라스를 열음 위에서 응고시킨 후 다시 한번 0.6 % LMA로 코팅하여 다시 3 분간 열음 위에서 응고시켰다. 응고시킨 슬라이드글라스는 커버글라스를 제거한 후 lysis buffer solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10% dimethyl sulfoxide, 1% Triton X-100)이 담긴 coplin jar에 넣고 2 시간 이상 냉장 보관하였다. 그 후, 4 °C 증류수가 담긴 coplin jar에 슬라이드글라스를 2 분 간격으로 3 번 옮겨주었다. DNA unwinding buffer solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13)을 넣은 4번째 coplin jar에 슬라이드글라스를 15 분간 냉장 보관하였다. 그 후 슬라이드글라스를 동일한 DNA unwinding buffer solution로 채워진 전기영동기에 넣

고 25 분간 25 V, 300 mA에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동한 슬라이드글라스를 중성화시키기 위하여 0.4 M Tris 용액 (pH 7.5)에 2 분 간격으로 3 회 세척하였다. 마지막 Tris 용액에서 꺼낸 슬라이드글라스를 찬 에탄올이 담긴 coplin jar에 5 분간 담귀둔 후 실온에서 건조시켰다. 건조된 슬라이드글라스는 ethidium bromide 용액 (20 μ g/ml)으로 염색시켜 형광현미경 (Nikon Eclipse E200)으로 200 배 배율에서 관찰하였다. 염색되어진 DNA의 영상을 CCD카메라를 통해 컴퓨터로 불러들인 후, 이미지 자동분석 소프트웨어 (Komet version 5, Kinet Imaging Ltd)로 DNA tail moment (부서진 DNA 꼬리의 길이(μ m) \times 꼬리부분에 있는 DNA (%))를 측정하였다. 각 슬라이드 당 50 개의 핵을 분석하여 평균과 표준오차를 계산하였다.

2.3. PAH 분석

통영에서 채집된 어류는 현장에서 혈액을 채취한 후 실험실로 옮겨 동결건조시켰다. 막자사발에 곱게 갈 시료를 1 g 취하여 Na₂SO₄ 약 100 g과 함께 갈아주었다. 이를 텀블에 쏟은 후, 시료위에 내부표준 물질인 Chrysene-d₁₂, Phenanthrene-d₁₀, Anthracene-d₁₀, Perylene-d₁₂, Naphthalene-d₈를 100 ng씩 첨가한 후 속실텍에 넣고, 수조에서 16시간 추출하였다. 자동용매농축기로 10 ml까지 농축시킨 후 450°C에서 태운 플로리실을 이용하여 불순물을 제거하였다. 이 용출액을 자동용매농축기로 다시 약 10 ml

까지 농축시킨 후 핵산으로 다시 농축시켰으며, 이용액을 질소가스 하에서 시료가 최종적으로 1 ml가 될 때까지 농축시켰다. GC-MS를 이용한 PAHs의 분석은 Yim et al.¹⁴⁾에 기술된 조건을 따라 수행되어졌다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 통영 어류혈액에서의 DNA 손상

통영 연안 6개 지점에서 채집된 어류혈구세포에서의 DNA 손상정도를 Table 2에 나타내었다. DNA 손상이 가장 적게 발견되는 어종은 문절망둑으로 매물도 앞(정점6)에서 채집되었고, 가장 높은 DNA 손상을 보인 어종은 갈치로서 통영 미륵도 서부연안(정점5)에서 채집되었다. 대부분의 어류에서 DNA 손상정도는 1에서 2사이의 손상정도를 나타내었다. 정점별로는 매물도 앞(정점6)에서의 채집된 어류들이 다른 정점들에 비해 낮은 DNA 손상을 보여주었다(Table 3). 하지만, 두 정점에서 동시에 채집된 어종은 보리멸(정점 1과 5)과 조피볼락(정점 2와 4)뿐이었으며, 이들 어종만을 이용하여 DNA 손상정도를 비교하였을 때 보리멸의 경우 정점 5보다 정점1에서 높은 DNA 손상정도를 보여주었다. 그러나 조피볼락의 경우에는 조사정점에 따른 DNA 손상에 있어서 차이를 나타내지 않았다.

한편 해양생물체내의 PAH 대사산물농도와 DNA 손상사이에는 상관관계가 있으며^{15,16)}, PAHs로 오염된 San Diego Bay에 이식된 진주담치에서도 높은 DNA 손상이 발견된 바 있다¹⁷⁾. 이들 연구로부터 PAHs는 생물체내에 축적될 때 DNA 손상을 일으킬 수 있는 유전독성물질인 것으로 판단되어 본 연구에서도 어류체내에 축적된 PAHs를 분석하여 어류혈액중의 DNA 손상과의 상관관계를 살펴보았다. DNA 손상이 측정되었던 같은 어류에 대해 분석되었던 PAHs의 농도는 평균 174 ng/g (범위: 76-394 ng/g)이었다. 지역적으로는 정점 1과 2에서 약 300 ng/g이 넘는 높은 값을 보였고, 매물도(정점6)지역에서는 76 ng/g으로 가장 낮은 값을 보였다 (Table 4). 하지만, 어종에 따른 PAH화합물에 대한 대사능력이 다르고, PAH농도에 밀접한 관계를 가지는 지방함량 또한 어종에 따라 차이를 보이기 때문에¹⁸⁾, 어종의 구분없이 단순히 PAH축적농도를 비교하는 것은 무리가 따를 것으로 판단된다. 그러므로 동일 어종에 대해서만 다시 PAH 농도를 비교해 보았다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 정점1과 5에서 동시에 채집된 보리멸은 정점 1에서 PAH 농도와 DNA 손상정도가 동시에 높게 나타났다. 한편 정점2와 4에서 채집된 조피볼락의 경우에는 보리멸에서와 비슷

Table 2. DNA tail moment in the blood of fish collected from Tongyeong

Site	Species	Tail Moment (Avg±Std err, n=50)	
		Average	Range
1	<i>Sillagos sihama</i>	1.44±0.33	
	<i>Sillagos sihama</i>	1.81±0.38	
	<i>Sillagos sihama</i>	1.16±0.26	
2	<i>Sebastes schlegeli</i>	0.87±0.13	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	1.61±0.3	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	0.41±0.14	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	0.61±0.12	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	1.5±0.23	
3	<i>Trachurus japonicus</i>	1.87±0.32	
	<i>Pagrus major</i>	1.75±0.31	
	<i>Hexagrammos agrammus</i>	1.41±0.23	
4	<i>Sebastes schlegeli</i>	2.18±0.35	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	1.09±0.17	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	0.81±0.16	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	0.41±0.13	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	0.92±0.12	
	<i>Sebastes schlegeli</i>	0.61±0.12	
5	<i>Trichiurus lepturus</i>	3.24±0.46	
	<i>Sillagos sihama</i>	0.55±0.13	
	<i>Sillagos sihama</i>	0.25±0.08	
6	<i>Sillagos sihama</i>	0.4±0.13	
	<i>Halichoeres poecilopterus</i>	0.53±0.09	
	<i>Halichoeres poecilopterus</i>	1.07±0.16	
	<i>Sebastes inermis</i>	0.5±0.09	
	<i>Acanthogobius flavimanus</i>	0.24±0.05	

Table 3. DNA tail moment in the blood of fish collected from Korean coastal area

Area	Site	Sample Number	Tail Moment	
			Average	Range
Tongyeong	1	3	1.47	1.16~1.81
	2	6	1.06	0.41~1.61
	3	3	1.68	1.41~1.87
	4	6	1.00	0.41~2.18
	5	4	1.11	0.25~3.24
	6	4	0.58	0.24~1.07
Incheon	1	9	1.45	0.64~2.57
	2	1	0.64	0.64
Masan	1	10	1.4	0.43~3.73
	5	14	0.42	0.10~1.59
Pohang	1	6	1.71	0.2~3.15
	2	1	2.11	2.11

한 PAH 농도 차이를 보였으나, DNA 손상 정도에 있어서는 차이가 나타나지 않았다.

이러한 PAH의 농도와 DNA 손상과의 관계에서 불일치가 나타난 첫 번째 이유로 통영 어류에서의 PAH 체내 농도가 비교적 낮아 PAH가 DNA 손상을 일으킨 대표적 오염물질이 아닐 가능성을 들 수 있다. 앞서 예를 든 Steinert et al.¹⁷⁾의 연구에 따르면 San Diego Bay지역에서의 퇴적물 및 한달간 이식되어진 진주담치에서의 PAH 농도는 각각 536-94000 ng/g (습식중량)과 404-5250 ng/g (습식

중량)이었으며, 이를 본 연구에서 건조시료를 이용하여 분석되어진 농도와 비교한다면 (수분함량 80% 가정) San Diego Bay지역은 통영지역보다도 대략 100배 이상 높은 것으로 판단된다. 그러므로, DNA 손상과 PAH농도사이에 좋은 상관관계를 보인 해외 연구 지역에 비해 본 조사지역은 적어도 DNA 손상을 일으키는 PAHs 화합물에 대해서는 상대적으로 청정지역으로 판단된다. 또한 Fig. 2에 나타난 바와 같이 전갱이(정점3)와 갈치(정점5)와 같은 어종에서는 PAH 농도가 100 ng/g보다도 낮은 값을 보였음에도 불구하고 가장 높은 PAH농도를 보인 보리멸(정점1)보다도 더 높은 DNA 손상이 발견되었다. 이는 매물도처럼 외해가 아닌 인근해역에 위치한 정점 주변이 PAHs 이외에 DNA 손상을 일으킬 수 있는 다른 종류의 유전독성물질로 오염되었을지도 모를 가능성을 보여주고 있다.

두 번째로, 단순히 어류의 생물학적 차이를 들 수 있는데, DNA 손상을 일으키는 오염물질이외에 다른 생물학적 및 물리화학적 조건에 의해서도 생물체내에서 DNA 손상정도가 변화한다는 것이 알려져 있다. Akcha et al.¹⁹⁾에 의하면 가자미 성어가 자치어에 비해 보다 높은 DNA 손상을 보였으며, 또한 성어에서는 수컷이 암컷보다 DNA 손상이 높음을 보여주어 유전독성물질의 노출유무 이외에 생물학적인 요인에 의해서도 영향을 받을 수 있음이 제시되었다. Skarphéðinsdóttir et al.²⁰⁾는 진주담치에서의 DNA 손상은 계절에 따라서도 변화한다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 채집된 어류에 대해 연령이나 성(sex)판별을 실시하지 않았기 때문에 이로 인한 DNA 손상에 대한 영향을 알 수는 없었다.

3.2. 공업단지 주변 어류혈액에서의 DNA 손상

청정해역을 포함하는 통영인근 해역과는 다르게 공업단지를 끼고 있어 대표적 오염해역으로 알려진 인천항 주변해역, 마산만 지역, 포항 영일만 주변해역에서 어류를 채집하여 DNA 손상을 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. 인천 영종도 입구(정점1)에서 채집된 송어에서는 평균 1.45(범위; 0.64-2.57)의 값을 보였으며, 인천 내항 입구(정점2)에서 채집된 문절망둑에서는 0.64의 값을 보였다. 마산에서는 상류지역(정점5)에서 채집된 문절망둑(평균; 0.42, 범위; 0.10-1.59)보다도 소리도 앞(정점1)에서 채집된 노래미와 도다리에서 더 높은 값(평균; 1.4, 범위; 0.43-3.73)을 보여주었다. 포항 정점1에서 채집된 실망둑, 별망둑, 그리고 문절망둑에서는 평균 1.71(범위; 0.20-3.15)의 DNA 손상정도를 나타내었고, 정점2에서 채집된 배도라치에서는 2.11의 값을 보여주었다. 어류가 너무 적게 채집된 정점들(인천 정점2와

Table 4. PAH concentration in the fish collected from Tongyeong

Site	Species	ΣPAHs (ng/g)
1	<i>Sillago sihama</i>	394, 282, 267, 287
2	<i>Sebastes schlegeli</i>	314 [#]
3	<i>Trachurus japonicus</i>	81
	<i>Pagrus major</i>	95
	<i>Hexagrammos agrammus</i>	86
4	<i>Sebastes schlegeli</i>	116 [#]
5	<i>Trichiurus lepturus</i>	78
	<i>Sillago sihama</i>	89, 98
6	<i>Halichoeres poecilopterus</i>	NA
	<i>Sebastes inermis</i>	76
	<i>Acanthogobius flavimanus</i>	NA

[#] Six fish were pooled and analyzed for PAH. NA means "not analyzed".

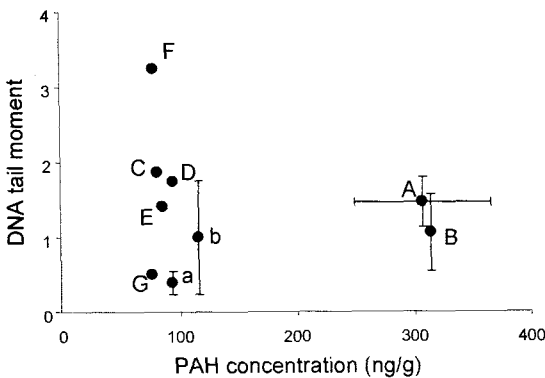


Fig. 2. Relationship between PAH concentration and DNA damage in the blood of fish collected from Tongyeong coastal area (A; *S. sihama* from station 1, a; *S. sihama* from station 5, B; *S. schlegeli* from station 2, b; *S. schlegeli* from station 4, C; *T. japonicus* from station 3, D; *P. major* from station 3, E; *H. agrammus* from station 3, F; *T. lepturus* from station 5, G; *S. inermis* from station 6).

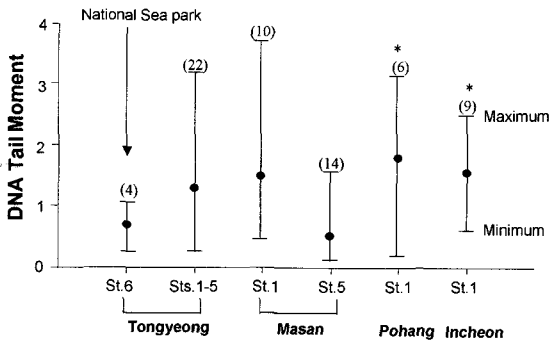


Fig. 3. Comparison of DNA damage in fish blood cells among different sampling areas. * means $p < 0.05$ compared with station 6 in Tongyeong.

포항 정점2)을 제외한 후 통영에서의 어류에서 측정된 DNA 손상값들과 비교하여 보았다(Fig. 3). 지역별로 채집되어진 어류의 종류가 달라 직접적인 비교가 어렵지만 통영 매물도 앞(정점6)에서 채집된 어류에 비해 포항과 인천에서 채집된 어류에서 통계적으로 유의하게 높은 DNA 손상이 발견되었다. 한편 마산만 내에서는 정점간에 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았으나, 마산만 입구에 비해 바다쪽의 정점에서 높게 나왔다. 마산시²¹⁾와 창원시²²⁾의 경우 하수관거물이 2003년 기준으로 각각 80%와 67%로 낮은 상당한 양의 하수가 처리과정을 거치지 않은 채 바다로 흘러 들어가는 것으로 알려져 있다. 다시 말해 주변지역으로부터 마산만으로 흘러들어온 생활하수 등에 의해 해수가 점점 오염되어 바다쪽으로 갈수록 DNA 손상이 증가한 것으로 판단된다. Choi et al.²³⁾에 의한 하수기인 지시자인 fecal sterol의 분석 결과에서도 특히 덕동하수처리장의 해양배출관의 부근(정점 1) 퇴적물에서 coprostanol이 높게 검출되어 본 연구에서와 유사한 경향을 나타내었다. Pavlica et al.¹¹⁾의 연구에서도 생활하수처리장과 연결된 강 하류에 이식되어진 이매패류(zebra mussel)에서 대조구에 비해 높은 DNA 손상이 유도되었다. 마산만 지역에서 유기오염물질을 분석한 연구²⁴⁾ 또한 본 연구의 정점2에서 4에 이르는 지역이 정점5 부근에 비해 유기오염물질(PAHs, PCBs, 유기염소계 살충제)의 높은 농도분포를 보여주었다. 이는 앞서 말한 낮은 하수관거물로 인해 마산만의 입구에서 바다쪽으로 흘러가면서 오염물질의 공급이 증가함을 보여주는 증거라고 판단된다.

3.3. 마산만 이식실험에서의 진주담치 아가미에서의 DNA 손상

거제의 청정해역에서 채집되어진 진주담치를 마산만 3개 정점에 한 달간 이식한 후 아가미조직에서

DNA 손상을 측정하였다. 경제활동이 활발한 횡집 앞(정점3)과 한진중공업 앞(정점4)에 이식된 진주담치에서는 평균 4.48과 5.11로 가포만(정점2, 평균 2.76)에 비해 평균적으로 높게 나타났다. 한진중공업 앞(정점4)에서 분석되어진 진주담치 중 DNA 손상을 측정할 수 있었던 시료개체수가 너무 적어 가포만(정점2)에 비해 통계적으로 유의하게 높지는 않았으나, 횡집 앞(정점3)에서는 통계적으로 유의하게 높은 DNA 손상을 보여주었다. Shaw et al.²⁵⁾은 PCBs로 오염된 지역에 이식된 진주담치의 소화기관에서 대조구에 비해 통계적으로 유의한 DNA 손상 증가를 관찰하였으며, Steinert et al.¹⁷⁾에 의한 연구에서도 오염된 San Diego Bay에 이식된 진주담치의 혈구세포에서 훨씬 높은 DNA 손상이 나타났다. 본 연구에서 밝혀진 것처럼 횡집 앞(정점3)에 이식된 진주담치의 아가미 조직에서의 DNA 손상 정도가 가포만(정점2)에 비해 상대적으로 높은 것은 Khim et al.²⁴⁾에 나타난 마산만에서의 유기오염물질 농도 분포와 일치하며, 이로부터 진주담치는 오염물질의 빠른 축적으로 인한 오염물질의 모니터링을 위한 표적생물일 뿐만 아니라¹⁴⁾, 특정 지역에서 DNA의 구조에 영향을 줄 수 있는 유전독성물질의 노출 여부를 알려주는 comet assay를 위한 표적생물로도 사용될 수 있음을 본 연구에서도 보여 주었다. 하지만, 진주담치에서의 DNA 손상 정도의 기저값을 알기 위해서는 거제 앞 청정해역에서의 자료를 확보하여야 하며, 이러한 확인작업을 통해 마산만 정점에서 DNA 손상 정도가 확실하게 증가하였다고 말할 수 있을 것이다. 그러므로 이러한 목적을 위해서는 향후 보완조사가 필요하다고 판단된다.

3.4. 인천퇴적물의 지렁이 노출실험

인천 연안의 3개 정점에서 채취된 퇴적물에 지렁이를 2주간 노출시킨 후 DNA 손상을 분석한 결과를 Table 6에 나타내었다. 육상 지렁이를 오염토양에 노출시켜 DNA 손상을 유도한 실험을 통하여, 지렁이가 comet assay의 적용에 적합하다는 것이 밝혀진 바 있다²⁶⁾. 본 연구에서는 각 정점당 10마리의 지렁이를 넣어 주었으나, 인천항구에서 가장 멀리 떨어진 정점3에서는 무려 7마리가 치사하였다. 정점

Table 5. DNA damage in the gill of mussel 1 month after transplantation to Masan Bay

Site	Sample Number	Tail Moment	
		Average	Range
2	8	2.76	1.43~5.78
3	9	4.48	1.79~7.34
4	4	5.11	2.02~7.62

Table 6. DNA damage of earthworm 2 weeks after exposure to Incheon sediment

Site	Sample Number	Tail Moment	
		Average	Range
1	7	3.94	1.23~10.37
2	9	4.91	0.74~8.52
3	2	2.35	1.47~3.23

3의 퇴적물은 입자의 크기가 상당히 조립하였으며, 지렁이의 서식조건에 맞지 않은 이러한 퇴적물의 물리화학적인 특성에 의해 치사가 일어난 것으로 판단되었다. 한편 정점3의 퇴적물에 노출된 지렁이에서 가장 낮은 DNA 손상(평균 2.35)를 보였으며, 인천 내항근처(정점1)에서 최대 10.37의 DNA 손상을 보였다. 정점1과 정점2에 노출된 지렁이에서의 DNA 손상 평균값은 정점3에 비해 2배 가까이 높으나, 정점3의 시료 개수가 작아 통계적으로 유의하게 차이가 나지는 않았다. 또한 치사율이 높은 정점3에서 DNA 손상 정도가 낮은 점으로부터 DNA 손상 정도와 치사와는 관련이 없는 것으로 생각되었다. 한편 기존의 연구²⁷⁾에 의하면 정점1과 2부근에서의 PAH농도는 약 100-200ng/g의 수준인데, Lee et al.²⁸⁾에 의하면 새우를 PAH 농도가 1.5 µg/g이상의 퇴적물에 노출시켰을 때에만 DNA 손상이 유도된 바 있다. 본 연구에서는 Lee et al.(2004)의 PAH값보다도 훨씬 낮은 농도로 오염된 퇴적물에 노출된 지렁이에서도 DNA 손상이 검출되었는데, 이는 새우에 비해 지렁이의 경우 퇴적물과 직접 접촉하며 생활하기 때문으로 사료된다.

3.5. 해양생물에서 DNA 손상기작과 요인

대부분의 해양생물은 햇빛에 노출될 때 자외선(UV) 영역의 복사선을 흡수함으로써 DNA에 손상을 입히게 된다. 이러한 손상의 대부분은 UV-B 영역(280-320 nm)의 빛에 의해 주로 발생하는 것으로 추측되고 있다. 세포내에는 이들 UV에 민감한 거대분자들이 많이 존재하며, 특히 DNA는 주요표적이 되어 치명적인 독성을 발현하게 된다. UV-B에 노출된 DNA에서 발견되는 주요산물로는 cyclobutane pyrimidine dimers와 pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct가 있다. 돌연변이나 치사와 같은 여러 생물독성은 UV-B에 의한 이러한 photoproduct의 생성과 연관되어지고 있다^{29,30)}. 이 외에도 UV-B의 노출은 단백질-DNA 교차결합이나, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine와 같은 DNA 손상(lesion)을 일으킬 수도 있다. 환경 중에 자주 검출되는 유

기오염물질인 PAHs의 한 성분인 benzo(a)pyrene 또한 생물체내에서 미소크롬 MFO (mixed-function oxygenases)에 의해대사되어져 DNA에 손상을 일으키기도 한다^{31,32)}.

결국 UV와 여러 화합물들의 화학적인 기작으로 인해 DNA의 여러 이중가닥의 손상이 유발된다. 생물체 내에서 이러한 DNA 손상이 일어나면 RNA로의 전사가 원활히 이루어지지 않아 결국 효소활동저해, 일반 대사기능 저하, 세포내 기능 손상, 성장 저해, 생체내 조직과 기관의 위축 및 기능 저하, 생물의 성장 둔화, 노화, 면역기능 저하와 생식기능 저하, 질병에의 잦은 노출, 그리고 주위 환경에 대한 적응력 저하 등에 따른 생체내의 생리이상으로 인해 결국 중의 소멸을 가져와 먹이 연쇄과정을 타고 생태계 전체에 심각한 문제를 일으키게 된다³³⁾. 특히 UV에 항상 노출되는 해수 표층에 서식하고 있는 식물 플랑크톤과, 육상 식물들은 DNA 손상에 의한 광합성의 저해로 말미암아 사멸하게 될 것이며, 결국 먹이연쇄 과정을 타고 전 생태계의 멸종을 일으키게 된다. 하지만, 이러한 현상이 자연환경에서 발견되지 않는 것은 생물들은 스스로 DNA 손상에 대해 회복할 수 있는 능력을 가지고 있기 때문이다. 이러한 DNA 회복 과정을 자세히 보면 결국 DNA손상의 회복 과정 중에 DNA strand에 절단(break)이 필연적으로 발생하는 것을 알 수가 있다. 즉, 실제 UV나 오염물질에 의한 DNA 손상 그 자체로는 DNA strand에 절단을 일으키지 않는 경우가 많으며, 그 회복 과정에서 절단이 발생하게 되는 것이다. 결국 comet assay에 의해 DNA 사슬의 절단이 많이 발견된다는 것은 그만큼 DNA에 여러 형태의 손상이 많이 존재한다는 것을 암시해 주고 있다.

본 연구에서 채집되거나 노출된 해양생물에서의 DNA 손상정도가 지역에 따라 다른 것은 UV에 의한 것이라기보다는 지역별로 DNA 손상을 일으키는 특정 오염물질, 다시말해 유전독성물질이 조사지역에 따라 다른 농도로 잔류하기 때문으로 판단된다. 현재까지 수행된 연구에 의하면 해양생물에서 DNA 손상에 영향을 주는 화합물들로는 주로 benzo(a)pyrene을 비롯한 PAHs계 화합물 혹은 중금속, 살충제 등을 들 수 있다^{15~17,25)}. 하지만 최근에는 세균감염의 정도와 DNA 손상과의 상관관계로부터 세균에 의한 산물이 DNA strand break까지 유도하는 것이 보고되었다³⁴⁾. 그러므로 각 지역에서 DNA 손상을 유도하는 대표적인 요인은 screening 방법으로서 comet assay를 적용한 후 분석화학적 방법이나 또 다른 생물학적인 방법을 통해 파악될 수 있을 것이다.

4. 결 론

인천, 포항, 통영 그리고 마산에서 채집된 어류혈액에서의 DNA 손상을 측정 한 결과, 통영지역이 다른 지역에 비해 상대적으로 낮은 DNA 손상을 보여주었다. 통영 지역내에서도 외해(매물도)에서 채집된 어류에서 통영의 내만 지역보다 낮은 값을 보여주었다. 마산에서의 어류와 이식되어진 진주담치의 분석으로부터 DNA 손상이 증가되고 있는 것을 관찰하였다. 이로부터 마산, 창원지역에서 마산만으로의 유전독성물질 유입이 마산만 입구에서 바다쪽으로 갈수록 증가하고 있는 것으로 판단되었다. 인천 퇴적물에서의 지렁이 노출실험으로부터 인천항부근 퇴적물이 높은 유전독성물질을 함유하는 것으로 나타났다. 이러한 결과들로부터 해양생물에서의 DNA 손상정도를 보여주는 comet assay가 특정지역에서 유전독성물질의 노출유무를 나타내는 좋은 생물검정법임을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부에 의해 지원된 수산특정과정제 <과제번호 22001004>의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) Bolognesi, C., R. Rabboni and P. Roggieri, 1996, Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* as indicators of marine pollutants, *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C, 319-323.
- 2) Shugart, L., 1988, An alkaline unwinding assay for the detection of DNA damage in aquatic organisms, *Mar. Environ. Res.*, 214, 321-325.
- 3) Black, M. C., J. R. Ferrell, R. C. Horning and L. K. Martin, 1996, DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field, *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 802-808.
- 4) Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider, 1988, A simple technique for quantification of low DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.
- 5) Tice, R. R., R. W. Andrews, O. Hirai and N. P. Singh, 1991, The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells, In: Witmer, C. R., R. R. Snyder, D. J. Jollow, G. F. Kalf, J. J. Kocsis and I. G. Sipes (eds) *Biological reactive intermediates. IV. Molecular cellular ef-*

- fects and their impact on human health*, Plenum Press, New York, pp. 157-164.
- 6) Higami, Y., I. Shimokawa, T. Okimoto and T. Ikeda, 1994, An age-related increase in the basal level of DNA damage and DNA vulnerability to oxygen radicals in the individual hepatocytes of male F344 rats, *Mutation Res.*, 316, 59-67.
- 7) Kleiman, N. J. and A. Spector, 1993, DNA single strand breaks in human lens epithelial cells from patients with cataract, *Curr. Eye Res.*, 12, 423-431.
- 8) Olive, P. L. and J. P. Banáth, 1993, Induction and rejoining of radiation induced DNA single strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle, *Mutation Res.*, 294, 275-283.
- 9) Shaw, J. P., A. T. Large, J. K. Chipman, D. R. Livingstone and L. D. Peters, 2000, Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay), *Mar. Environ. Res.*, 50, 405-409.
- 10) Bombail, V., D. Aw, E. Gordon and J. Batty, 2001, Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland, *Chemosphere*, 44, 383-392.
- 11) Pavlica, M., G. I. V. Klobučar, N. Mojaš, R. Erben and D. Papeš, 2001, Detection of DNA damage in hemocytes of zebra mussel using comet assay, *Mutation Res.*, 490, 209-214.
- 12) Kim, G. B. and S. J. Bae, 2003, Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and gill of oyster exposed to pyrene and benzo(a)pyrene, *J. Aquaculture*, 16, 196-201 (in Korean).
- 13) Kim, G. B., R. F. Lee and K. A. Maruya, 2003, Application of single cell gel electrophoresis to detect DNA single strand breaks in DNA of fish blood cell, *J. Kor. Fish. Soc.* 36, 346-351 (in Korean).
- 14) Yim, U. H., J. R. Oh, S. H. Hong, W. J. Shim, S. H. Lee and J. H. Shim, 2002, Identification of PAHs sources in bivalves and sediments 5 years after the Sea Prince oil spill in Korea,

- Environ. Forensics, 3, 357-366.
- 15) Brown, J. S. and S. A. Steinert, 2003, DNA damage and biliary PAH metabolites in flatfish from southern California bays and harbors, and the Channel Islands, Ecol. Indicators, 3, 263-274.
 - 16) Frenzilli, G., V. Scarcelli, I. D. Barga, M. Nigro, L. Förlin, C. Bolognesi and J. Sturve, 2004, DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour, Mutation Res., 552, 187-195.
 - 17) Steinert, S. A., R. S. Montee, J. M. Leather and D. B. Chadwick, 1998, DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay, Mutation Res., 399, 65-85.
 - 18) 해양연구원, 2004, 내분비계 장애물질이 연안생태계에 미치는 영향 연구, 과학기술부, BSPN50300-1640-4, 188pp.
 - 19) Akcha, F., G. Leday and A. Pfohl-Leszkovicz, 2004, Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage, Mutation Res., 552, 197-207.
 - 20) Skarphéðinsdóttir, H., G. Ericson, H. P. Halldórsson and J. Svavarsson, 2005, Seasonal and intertidal impact on DNA adduct levels in gills of blue mussels (*Mytilus edulis* L.), Environ. Pollut., 136, 1-6.
 - 21) 마산시, 2005, http://www.masan.go.kr:8080/statistics/statistic_year3/main/static.asp.
 - 22) 창원시, 2005, <http://changwon.go.kr/statistical/html2004/html2004/>.
 - 23) Choi, M. K., H. B. Moon, S. S. Kim and Y. Lee, 2005, Distribution of sewage-derived organic matter using fecal sterol in Masan Bay, Korea. J. Environ. Sci., 14, 481-490
 - 24) Kim, J. S., K. Kannan, D. L. Villeneuve, C. H. Koh and J. P. Giesy, 1999, Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan Bay, Korea. 1. Instrumental analysis, Environ. Sci. Technol., 33, 4199-4205.
 - 25) Shaw, J. P., A. T. Large, D. R. Livingstone, A. Doyotte, J. Renger, J. K. Chipman and L. D. Peters, 2002, Elevation of cytochrome P450-immunopositive protein and DNA damage in mussels (*Mytilus edulis*) transplanted to a contaminated site, Mar. Environ. Res., 54, 505-509.
 - 26) Verschaeve, L. and J. Gilles, 1995, Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 54, 112-119.
 - 27) Kim, G. B., K. A. Maruya, R. F. Lee, J. H. Lee, C. H. Koh and S. Tanabe, 1999, Distribution and source of polycyclic aromatic hydrocarbons in the vicinity of Incheon Harbor, Korea. Mar. Pollut. Bull., 38, 7-15.
 - 28) Lee, R. F., K. A. Maruya and K. Bulski, 2004, Exposure of grass shrimp to sediments receiving highway runoff: Effects on reproduction and DNA, Mar. Environ. Res., 58, 713-717.
 - 29) Kim, J. K., D. Patel and B. S. Choi, 1995, Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity, Photochem. Photobiol., 62, 44-50.
 - 30) Yasui, A. and S. J. McCready, 1998, Alternative repair pathways for UV-induced DNA damage, BioEssay, 20, 291-297.
 - 31) Hook, S. E. and R. F. Lee, 2004, Interactive effects of UV, benzo[a]pyrene and cadmium on DNA damage and repair in embryos of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*, Mar. Environ. Res., 58, 735-739.
 - 32) Toyooka, T., Y. Ibuki, M. Koike, N. Ohashi, S. Takahashi and R. Goto, 2004, Coexposure to benzo[a]pyrene plus UVA induced DNA double strand breaks: visualization of Ku assembly in the nucleus having DNA lesions, Biochem. Biophys. Res. Commun., 322, 631-636.
 - 33) Kurelec, B., 1993, The genotoxic disease syndrome, Mar. Environ. Res., 35, 341-348.
 - 34) Ladeira, M. S. P., M. A. M. Rodrigues, D. V. F. Maia and D. M. F. Salvadori, 2005, Use of comet assay to assess DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori* comparisons between visual and image analysis, Mutation Res., 586, 76-86.