

## 해수 중 용존 이산화탄소 농도 증가가 두토막눈썹참갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)의 세포내 에너지 할당에 미치는 영향

문성대<sup>1,2</sup> · 이지혜<sup>1</sup> · 성찬경<sup>1</sup> · 최태섭<sup>1</sup> · 이규태<sup>1</sup> · 이정석<sup>1,†</sup> · 강성길<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(주)네오엔비즈 환경안전연구소  
<sup>2</sup>충남대학교 생명시스템과학대학 생물과학과  
<sup>3</sup>한국해양과학기술원 해양시스템안전연구소

## Cellular Energy Allocation of a Marine Polychaete Species (*Perinereis aibuhitensis*) Exposed to Dissolving Carbon Dioxide in Seawater

Seong-Dae Moon<sup>1,2</sup>, Ji-Hye Lee<sup>1</sup>, Chan-Gyoung Sung<sup>1</sup>, Tae Seob Choi<sup>1</sup>, Kyu-Tae Lee<sup>1</sup>,  
Jung-Suk Lee<sup>1,†</sup>, and Seong-Gil Kang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Environmental Protection and Safety, NeoEnBiz Co. Daewoo Technopark A-1306, Dodangdong, Bucheon, Kyeonggi-do 420-806, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological Science, School of Biological Sciences and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>3</sup>Maritime and Ocean Engineering Research Institute (MOERI)/Korea Institute of Ocean Science and Technology (KIOST), 171 Chang-dong, Yusung-gu, Daejeon 305-343, Korea

### 요 약

해수 중 용존 이산화탄소 농도 증가가 두토막눈썹참갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*)의 세포내 에너지 할당(CEA, cellular energy allocation)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.39(대조구=390 ppmv), 3.03 (=3,030 ppmv), 10.3 (=10,300 ppmv), 그리고 30.1 (=30,100 ppmv) mM의 이산화탄소 농도를 갖는 해수에 청충을 7일간 노출하여 세포 에너지와 세포 전자전달체계(ETS, electro transport system) 활성을 분석하였다. 실험생물의 지질, 당질, 그리고 단백질 함량과 ETS로부터 에너지 소비율을 계산하여 CEA를 산출한 결과 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 CEA가 감소하였다. 지질의 경우 이산화탄소 농도가 증가 할수록 지질함량도 증가하였으며, 당질은 이산화탄소 농도가 3.03 mM인 실험구에서 가장 낮고 10.3 mM인 실험구에서 일부 증가하였으나 가장 높은 농도에서는 다시 감소하는 경향을 보였다. 단백질은 이산화탄소 농도가 3.03 mM인 실험구에서는 영향이 없었지만, 10.3 mM 이상의 농도에서부터 유의한 수준의 CEA 감소가 나타났다. 에너지 소비율은 이산화탄소 최고 농도에서만 유의한 증가 현상이 나타났지만, CEA는 대조구와 비교해 3.03 mM의 실험구부터 감소하였다. 이산화탄소는 해수중 pH를 낮추어 시험생물에 스트레스를 증가시키고, 세포내 에너지 할당변화에 영향을 미친 것으로 판단된다. 해산 갯지렁이를 이용한 CEA 평가결과는 대기 중 이산화탄소의 증가 또는 이산화탄소 저감을 위해 추진되고 있는 해양 지중저장사업 과정에서 누출된 이산화탄소의 해양생태계 위해성을 예측하는 자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

**Abstract** – An experiment was conducted to evaluate the biochemical adverse effect of increased carbon dioxide in seawater on marine polychaete, *Perinereis aibuhitensis*. We measured the available energy reserves, Ea (total carbohydrate, protein, and lipid content) and the energy consumption, Ec (electron transport activity) of *Perinereis aibuhitensis* exposed for 7-d to a range of CO<sub>2</sub> concentration such as 0.39 (control =390 ppmv), 3.03 (=3,030 ppmv), 10.3 (=10,300 ppmv), and 30.1 (=30,100 ppmv) CO<sub>2</sub> mM, respectively. The cellular energy allocation (CEA) methodology was used to assess the adverse effects of toxic stress on the energy budget of the test organisms. The results of a decrease in CEA effect of increased carbon dioxide in seawater from all individual in Ea and Ec. Increase of carbon dioxide reduced pH in seawater, significantly. The chemical changes in sea-

<sup>†</sup>Corresponding author: jslee@neoenbiz.com

water caused by increasing pCO<sub>2</sub> might cause stresses to test organisms and changes in the cellular energy allocations. Results of this study can be used to understand the possible influence of CO<sub>2</sub> concentration increased by the leakage from sub-sea bed storage sites as well as fossil fuel combustion on marine organisms.

**Keywords:** Carbon dioxide Capture and Storage(CCS)(이산화탄소 포집 및 저장), Carbon dioxide(이산화탄소), Cellular Energy Allocation(CEA)(세포내에너지할당), Polychaete(다모류), Ocean acidification(해양산성화)

## 1. 서 론

이산화탄소(CO<sub>2</sub>)는 지구온난화(global warming)의 주범으로 인식되면서(IPCC[2001]) 이산화탄소 배출량을 감소하기 위해 국제적인 협약 및 제재 방안들이 활발히 진행되고 있다. 그중 대규모 배출원으로부터 이산화탄소를 회수하여 장기간 격리시키는 탄소 포집 및 저장(carbon dioxide capture and storage; CCS)기술은 이산화탄소 저감에 있어 현실적인 사업으로 인정받아 추진되고 있다(IPCC[2005]; Herzog[2001]). 국내에서도 역시 이산화탄소 포집과 저장 기술 연구에 대한 관심과 국가적인 재정 지원이 크게 증가하고 있으며, 이산화탄소의 해양 지중저장 과정 또는 이후 발생할 수 있는 해양 유출에 대해 효율적인 관리방안의 구축에도 많은 노력을 기울이고 있다(강성길[2006]). 특히 최근 국제해사기구(IMO)에서 승인된 해저 지중저장을 통한 이산화탄소 격리는 빠른 시일 내에 현실화 가능한 사업으로 인정받아 추진되고 있다. 하지만 해양 또는 지중저장 기술들이 이산화탄소를 일시적으로 제거하는 효과는 크지만 해양환경 및 생태계에 부정적인 영향을 미칠 수 있다는 점에서 우려를 낳고 있다(Seibel and Walsh[2001]). 따라서 대기중 이산화탄소 저감을 위한 사업의 일환으로 해양 또는 지중저장 처리를 할 경우 생태계 영향을 최소화할 수 있는 처리 조건을 모색하는 것이 바람직 할 것이며(IPCC[2001]), 이산화탄소로 인한 물리 화학적 변화가 해양생물에게 미치는 피해를 정확하게 파악하고 정량적으로 평가할 수 있는 기법 개발이 필요하다(Kita and Ohsumi[2004]).

이산화탄소로 인해 산성화(acidification)된 표층 해수 또는 이산화탄소 심해 저장과정에서 유출되어 나타나는 심해 pH 감소는 해양생물의 세포막 기능, 특히 이온교환 등에 악영향을 줄 수 있으며(Knutzen[1981]), 이산화탄소 자체가 생물에 흡수되어 세포내 pH 감소와 생화학적 특성 및 기능에 부정적인 영향을 미칠 수 있다(Pörtner[2008]). 산성화된 해수가 생물에게 미치는 영향을 살펴보면, 해산 갯지렁이인 *Nereis virens*는 pH 6.5이하에 10일간 노출될 경우 생존율과 굴착(burrowing activity)기능이 저해되고 glycogen이 감소되는 영향이 있는 것으로 보고되었다(Batten and bamber[1996]). 해산 이매패류는 pH 7이하부터 생존율, 성장률 그리고 먹이 섭취율이 감소한다는 연구결과가 실험적으로 밝혀진바 있다(Bamber[1990]).

본 연구에서는 해양으로 유입된 고농도의 이산화탄소가 해저 생물에게 미치는 영향을 파악하기 위해 저서 무척추동물인 두토막눈 썩참갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*, 이하 청충)를 이용하여 세포내 에너지 할당 변화(Cellular Energy Allocation; CEA)를 통한 독

성학적 영향을 규명하고자 하였다. CEA는 생물의 세포 수준에서 일어나는 여러 가지 과정에서 흡수된 에너지의 양과 소비되는 에너지의 양 사이의 양적 균형이 어느 정도 이루어지고 있는지를 평가하는 값이다. CEA는 급성 독성 반응이 일어나는 시간보다 짧은 기간의 노출에서도 그 영향이 나타나는 것으로 보고되어 있어 측정에 투입되는 노력이 만성독성 실험보다 적다는 장점이 있다(De Coen and Janssen[1997]; [2003]). De Coen and Janssen[2003]은 담수산 물벼룩인 *Daphnia magna*를 이용한 실험을 통하여 CEA가 급성 영향이 나타나는 수준보다 훨씬 낮은 수준에서 반응을 나타내고 있으며, 독성물질 농도에 대한 개체군 성장률(intrinsic rate of population increase)의 반응과 유사한 농도범위에서 반응이 나타남을 보였다. 이 때, CEA는 48-96시간의 비교적 짧은 기간의 실험으로 측정된 결과이며 개체군성장률은 21일 동안의 장기간 노출에 의한 결과이다. CEA는 실험실 외 현장 서식생물에도 적용 가능하다. 지중해담치를 대상으로 대조지역과 서식지역 개체군 CEA를 비교하여 오염의 정도 파악 등 *in situ* biomarker로도 활용되고 있다(Erk *et al.*[2011]). CEA 분석은 현재까지 국내에서 많이 시도되고 있지 않지만, 향후 현장노출 생물 또는 실험실 노출생물의 생화학적 영향을 파악할 수 있는 독성 지표로 그 이용 가치가 높을 것으로 사료된다.

## 2. 재료 및 방법

해수 중 이산화탄소 농도 증가로 인한 생물의 세포내 에너지 할당 변화를 관찰하기 위해 이용한 청충(*P. aibuhitensis*)은 2010년 11월 인천연안에서 채집된 것을 이용하였다. 채집된 청충은 아이스박스에 담아 실험실로 운반하였으며, 실험실에서 육안으로 각 개체를 검사하여 상처를 입은 개체는 제거하고, 건강한 개체만을 선별하여 2주 이상 실험실 환경에 순치시켰다. 순치는 55×150×10 cm 크기의 사각형 아크릴수조에 오염되지 않은 퇴적물을 3 cm 두께로 깔아 주었으며, 그 위에 0.1 μm로 여과된 해수를 퇴적물 위에 약 2 cm 높이로 채워 23 °C 조건의 항온실에서 순치하였다. 순치에 사용한 퇴적물은 인천 영종도 연안에서 채취한 퇴적물로 300 μm 표준체를 통과시켜 굵은 입자와 내서 생물을 제거하여 사용하였다. 순치 환경조건은 '해산 갯지렁이 자원조사 및 사육기법 개발'(MST[1991])을 참고하였다.

해수 중 용존 이산화탄소의 증가가 청충의 세포내 에너지 할당 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 4개의 CO<sub>2</sub> 농도구배, 즉 0.39 (대조구=390 ppmv), 3.03 (=3,030 ppmv), 10.3 (=10,300 ppmv), 그리고 30.1 (=30,100 ppmv) mM의 합성기체를 연속적으로 폭기한 해수에 청충을 7일간 배양한 이후 세포내 에너지 할당 변화를 측

정하였다. 본 연구에서는 대조구를 제외한 이산화탄소 최고 농도 (30.1 mM High), 중간 농도(10.3 mM Medium) 그리고 낮은 농도 (3.03 mM Low)로 각 3배의 농도차이를 두었으며 이는 선행연구 (Sung *et al.*[2010])의 결과를 추가적으로 고려한 것이다. 각 이산화탄소 농도구는 CO<sub>2</sub> 혼합 가스(용기압력: 20 °C 10 MPa; (주)에어코리아)는 공기와 순수 이산화탄소를 혼합하여 조제하였으며, 각 농도별 가스 조성비를 측정하여 이산화탄소 농도를 확인하였다. 여기서 0.39 mM의 이산화탄소는 대기중 일반적으로 나타나는 농도이며(Gentzsis[2000]), 본 연구에서는 이를 대조구로 이용하였다. 이산화탄소 합성기체는 대부분이 공기이고 이산화탄소는 최대 3%이기 때문에 수중 용존산소는 실험기간 중 90% 이상을 유지하였다.

증가된 용존 이산화탄소에 대한 노출실험은 U.S. EPA[1990]에서 제시된 표준독성시험법을 참고하였다. 노출실험은 20±1 °C 조건의 항온배양기 안에 가스가 일정속도로 주입되는 가스 챔버(gas chamber)에서 이루어졌고, 노출 용기로는 1-L 유리비커를 사용하였다. 노출실험에 사용된 퇴적물은 순치에 사용된 퇴적물과 동일하며, 1-L 유리비커에 200 mL씩 넣어주었다. 자연해수는 인천시립수산종묘배양연구소에서 공급받아 0.1 µm 필터를 통과시킨 후 750 mL씩 넣어주었다. 노출실험 전에 이산화탄소 가스를 해수에 폭기시킨 후 pH 변화를 주기적으로 모니터링 하였으며, 평형상태에 도달할 때까지 폭기하였다. 그 결과 주입 가스의 이산화탄소 농도가 높아질수록 pH 가 뚜렷이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 먼저 이산화탄소를 폭기하기 전 자연해수의 pH는 7.88±0.01로 측정되었으며, 대조구(0.39 mM)로 순수 공기만을 주입한 실험구의 pH는 8.18±0.0.3으로 측정되었다. Low, Medium 그리고 High 실험구에

서의 pH는 7.53±0.02, 7.04±0.0.2 그리고 6.62±0.0.3으로 각각 측정되었다. 실험기간동안 측정된 염분과 암모니아성 질소의 평균값은 각각 30.9±0.5 psu, 40.0±3.6 mg/L 이었다(Table 1).

생물노출은 각 비커에 2개체씩 노출하였으며 실험구당 반복구는 3개로 설정하여 1 농도 당 6개체가 노출되도록 하였다. 이산화탄소 혼합가스는 노출이 끝날 때 까지 지속적으로 폭기하였고, 먹이는 공급하지 않았다. 노출 종료 후 청충을 수거하여 생존여부를 관찰한 결과 모든 실험구의 개체가 생존한 것을 볼 수 있었고, 생존 개체는 깨끗한 여과해수로 옮겨 체내 퇴적물을 배설하도록 하였다. 체내 퇴적물을 모두 배설한 개체는 액체질소에서 급속 냉동한 후 CEA를 분석하였다.

### 2.1 세포에너지할당(CEA) 분석

청충의 두부를 제외한 상부 6체질을 잘라내어 균질화한 후 세포내 에너지 할당을 분석하였다. 청충 체내에 포함된 수분함량에 따라 각 에너지 함량이 달라질 수 있기 때문에 건조중량으로 환산하여 보정하였다. 청충 체내 함수율은 81.5±1.8% (n=4)수준 이었다. E<sub>a</sub> (Energy available)는 지질(lipid), 당질(Glucose), 단백질(protein)을 분석하였고, E<sub>c</sub>는 세포 전자전달 체계 Electro transport system(ETS) 활성을 측정하여 에너지 수지를 계산하였다. 지질의 분석은 Bligh and Dyer[1959]의 방법을 따랐다. 청충을 균질화하여 클로로포름과 메탄올을 이용하여 지질을 추출하였고 황산을 이용하여 발색시켰다. 단백질은 Bradford's reagent를 사용한 Bradford[1976]의 방법을 따랐고, 구리를 이용한 발색법을 이용하였다. 당질의 분석은 Roe and Dailey[1966]의 방법을 따랐고 균질화된 시료를 trichloroacetic acid(TCA)로 추출하고, 페놀과 황산을 이용하여 발색시켜 측정하였다. E<sub>c</sub>의 분석은 electron transport activity(ETS)를 측정하는 방법으로 Owens and King[1975]의 방법을 따랐다. 그리고 정량적으로 분석된 각각의 농도는 Gnaiger[1983]의 방법에 따라 에너지 단위로 환산하였고, 지질은 39,500 mJ/mg, 단백질은 24,000 mJ/mg, 당질은 17,500 mJ/mg 그리고 ETS는 484 kJ/mol O<sub>2</sub>로 계산되었다.

CEA를 계산하는 방법은 E<sub>a</sub>(Energy available)에 해당하는 지질, 당질, 단백질의 에너지 계산과 E<sub>c</sub>(ETS)의 계산으로 나뉜다. 일반적

**Table 1.** Water conditions of overlying water in various concentrations of CO<sub>2</sub> for 7-d sediment toxicity tests

CO <sub>2</sub> Conc. (mM)	pH (±S.D)		Salinity (psu)	NH <sub>3</sub> -N (mg/L)
	before purging	after purging		
0.39 (Control)	7.88±0.01	8.18±0.03	30.2	44.9
3.03 (Low)	7.88±0.01	7.53±0.02	30.9	40.5
10.3 (Medium)	7.88±0.01	7.04±0.02	31.1	37.6
30.1 (High)	7.89±0.00	6.62±0.03	31.2	37.1

**Table 2.** Summary of the analysis variance (ANOVA) for the test parameter of *P. aibuhitensis* at the end of 7-d exposure to various concentration of CO<sub>2</sub>

Test parameter	Condition	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	Probability
E <sub>a</sub>	Between Groups	2.43E+05	3	8.09E+04	0.134	0.9371
	Total	5.08E+06	11			
E <sub>c</sub>	Between Groups	9.08E+05	3	3.03E+05	15.1	0.0012
	Total	1.07E+06	11			
CEA	Between Groups	2.75E+02	3	9.16E+01	8.89	0.0063
	Total	3.57E+02	11			
ΔE <sub>a</sub>	Between Groups	2.43E+05	3	8.09E+04	26.1	0.0002
	Total	2.68E+05	11			
E <sub>c avg</sub>	Between Groups	2.27E+05	3	7.57E+04	15.1	0.0012
	Total	2.67E+05	11			
ΔCEA	Between Groups	1.37E-01	3	4.60E-02	19.2	0.0005
	Total	1.56E-01	11			

으로 현장 생물의 CEA 분석은 노출 초기의 CEA를 분석할 수 없기 때문에 CEA를 계산할 수 없다. 하지만, 본 연구에서는 초기 노출상태와 이산화탄소에 일정기간 노출이 진행된 후의 에너지 할당 변화량을 분석하였기 때문에 CEA 또는 ΔCEA를 계산할 수 있었다. CEA에 대한 계산방법은 Verslycke *et al.*[2004a]을 따랐으며 ΔCEA의 경우 Verslycke and Janssen[2002]; Verslycke *et al.*[2003]에서 제시하는 방법을 따랐다.

**2.2 통계 분석**

서로 다른 이산화탄소 농도를 갖는 실험구간 결과의 유의한 차이에 대해서는 분산분석(ANOVA)을 수행하였다. 대조구와 실험구간의 차이에 대한 유의성 검증은 Dunnett t-tests를 실시하여 검증하였으며, 유의수준은 0.05로 설정하였다(Table 2).

**3. 결 과**

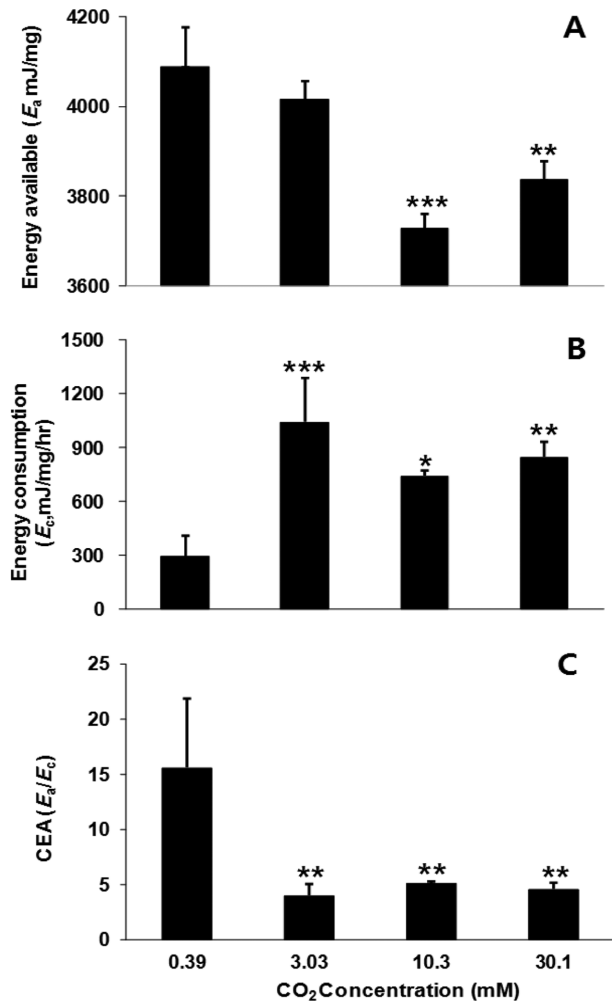
**3.1 세포내 에너지 할당 변화**

이산화탄소로 산성화된 자연해수에 청충을 7일간 노출시킨 후 생존율 변화를 살펴본 결과 모든 농도에서 생존율이 100%로 나타났다. 하지만, 지질(Lipid), 당질(Glucose), 단백질(Protein), 그리고 세포의 전자전달 체계 활성(ETS)에서 실험구간의 차이가 나타났다. 지질의 함량을 측정된 결과 이산화탄소 농도가 증가 할수록 지질함량이 증가하는 것으로 나타났다. 당질 함량은 모든 실험구에서 대조구와 통계적으로 유의한 차이( $p < 0.05$ )를 보였고, 단백질 함량은 이산화탄소의 농도가 증가 할수록 감소하였다. 지질, 당질, 단백질 에너지양의 합으로  $E_a$ 를 산출한 결과 Low에서는 대조구와 차이가 없었으나, Medium과 High에서는 대조구와 유의한 차이가 나타났다(Fig. 1A), (Table 3).

에너지 소비율 변화는 Low, Medium 그리고 High 모두에서 대조구와 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이( $p < 0.05$ )를 보였다(Fig. 1B). 에너지 소비율은 Low에서 가장 높았으며 이후, High, Medium 순으로 낮아졌다.  $E_a$ ,  $E_c$ 를 이용한 CEA 계산 결과 모든 농도에서 대조구보다 낮았으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 1C).

**3.2 노출 초기값을 고려한 세포내 에너지할당(ΔCEA) 변화**

ΔCEA는 이산화탄소 노출 후 청충 체내의 에너지 함량( $E_a$ )에서 노출 전 에너지 함량의 차이 값( $\Delta E_a$ )으로 노출 후 에너지 변화량을 알 수 있다. 본 연구에서는 모든 실험구별 개체 체중 당 동일한 먹



**Fig. 1.** Comparison of (A) Energy available, (B) Energy consumption, and (C) Cellular energy allocation of *P. aibuhitensis* at the end of 7-d exposure to various concentration of CO<sub>2</sub>. The asterisk (\*, \*\*, \*\*\*) denotes results are significantly different from the control at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , respectively.

이량을 공급할 수 없었기 때문에 먹이 공급을 하지 않았다. 따라서 노출 전 순치과정에서 축적된 에너지가 7일 노출 과정에서 소모될 것으로 추정되며, 동일 조건에서 소비되는 에너지 차이를 통해 생물의 영향을 판단하였다.

이산화탄소 농도별 지질의 변화량은 대조구를 제외한 모든 실험구에서 대조구와 통계적으로 유의한 차이( $p < 0.05$ )를 보였다. High에서 대조구와 가장 큰 차이를 보였고, 그 다음으로는 Low, Medium

**Table 3.** Available and consumed energy of *P. aibuhitensis* exposed to CO<sub>2</sub> for 7 days (data are shown as mean ± standard deviation)

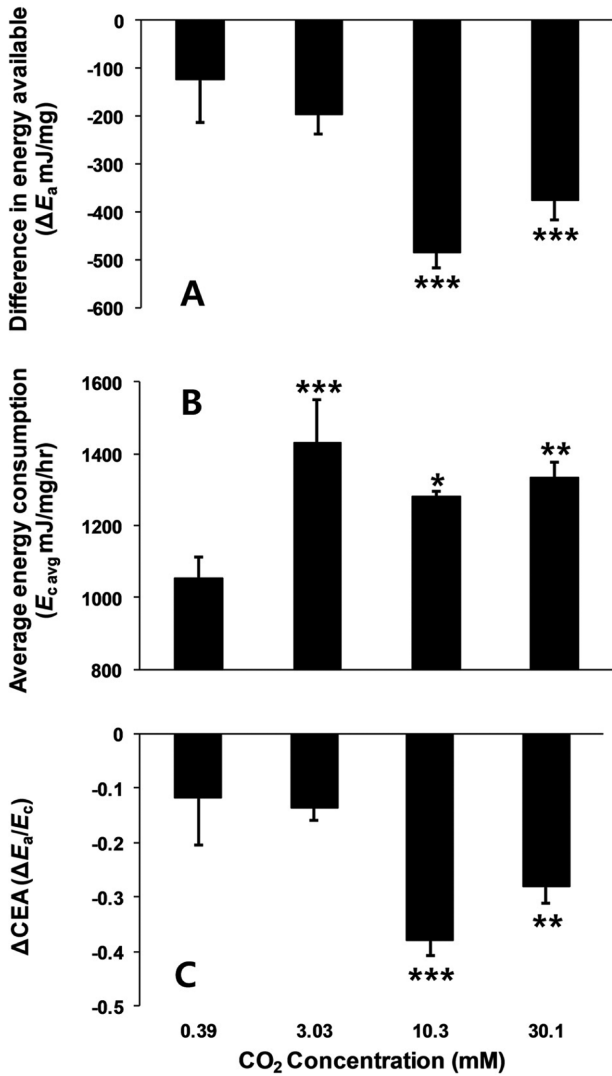
CO <sub>2</sub> Conc. (mM)	Energy contents, Unit: mJ/mg dry weight				
	Lipid reserve	Glucose reserve	Protein reserve	$E_a$	$E_c$
0.39 (Control)	1,653±35	1,298±62	1,137±43	4,087±90	292±113
3.03 (Low)	2,165±3***	789±33***	1,061±34*	4,015±40	1,042±242***
10.3 (Medium)	2,000±34***	1,040±28***	687±16***	3,728±32***	741±32*
30.1 (High)	2,409±30***	880±21***	547±10***	3,836±42**	846±89**

The asterisk (\*, \*\*, \*\*\*) denotes results are significantly different from the control at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , respectively.

**Table 4.** Change quantity of available and consumed energy of *P. aibuhitensis* exposed to CO<sub>2</sub> for 7 days (data are shown as mean ± standard deviation)

CO <sub>2</sub> Conc. (mM)	Energy contents, Unit: mJ/mg dry weight				
	ΔLipid reserve	ΔGlucose reserve	ΔProtein reserve	ΔE <sub>a</sub>	E <sub>c avg</sub>
0.39 (Control)	-870±35	434±62	311±43	-125±90	1,056±56
3.03 (Low)	-358±3***	-75±33***	236±34*	-198±40	1,431±121***
10.3 (Medium)	-523±34***	176±28***	-138±16***	-485±32***	1,281±16*
30.1 (High)	-114±30***	16±21***	-278±10***	-376±42***	1,334±44**

The asterisk (\*, \*\*, \*\*\*) denotes results are significantly different from the control at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , respectively.



**Fig. 2.** Comparison of (A) Difference in energy available, (B) Average energy consumption, and (C) ΔCellular energy allocation of *P. aibuhitensis* at the end of 7-d exposure to various concentration of CO<sub>2</sub>. The asterisk (\*, \*\*, \*\*\*) denotes results are significantly different from the control at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , respectively.

순이었다. 이는 앞의 결과와 유사한 경향이었다. 당질과 단백질에서도 모든 실험구가 대조구와 비교하였을 때 통계적으로 유의한 수준의 차이( $p < 0.05$ )를 보였다. 당질은 Low에서 가장 큰 차이를 보이고, Medium에서 가장 높은 값을 보였다. 단백질은 High에서 가

장 큰 차이를 보였고 그 다음으로 Medium Low 순으로 낮아졌다 (Table 4). 지질, 당질, 단백질 에너지양의 합으로 ΔE<sub>a</sub>를 산출한 결과 Low에서는 대조구와 차이가 없었으나 Medium에서 가장 큰 차이를 보였고 High에서는 Medium 보다는 낮았지만 대조구와 유의한 차이가 있었다(Fig. 2A). E<sub>c avg</sub>는 노출 전, 후 값의 평균을 이용하였으며 이산화탄소 노출 유무에 따른 에너지 소비율 변화가 나타났다(Table 4). 대조구를 제외한 전 실험구에서 통계적으로 유의한 수준으로 더 많은 에너지 소비를 보였다. 하지만 Low 실험구에서 소비량이 가장 높게 나타나 이산화탄소 농도와 에너지 소비율이 비례하는 경향은 나타나지 않았다(Fig. 2B). 산정된 에너지 변화량을 이용하여 ΔCEA를 계산한 결과 Medium과 High 실험구에서 ΔCEA가 대조구에 비해 유의하게 낮은 결과가 나타났다(Fig. 2C).

#### 4. 고찰

본 연구에서는 먹이공급이 없는 실험조건에서 시간이 지날수록 생물의 에너지 보유량은 점진적으로 낮아지고 이산화탄소에 의한 스트레스에 의해 가속될 것이라는 가설을 세웠다. 여기서 노출 과정 중 섭식하는 퇴적물에 의한 에너지 보유량은 고려되지 않았다. CEA가 낮아지는 것은 세포내 에너지 함량이 낮아지거나, 에너지 소비가 증가하는 현상에 기인한다. 먹이활동을 통하여 획득한 에너지를 기본적인 대사에 이용하고 남은 에너지가 저장물질로 변환되어 생물의 성장에 이용되는데, 스트레스가 체내 항상성 유지에 에너지 소비를 증가시켜 결과적으로 CEA가 낮아지는 현상은 물벼룩 (Soetaert *et al.*[2007]), 단각류(Olsen *et al.*[2007]; [2008]), 이매패류(Smolanders *et al.*[2004]; Olsen *et al.*[2007]), 복족류(Moolman *et al.*[2007]), 다모류(Macrae[2009]; Stomperudhaugen *et al.*[2009]), 어류(Smolanders *et al.*[2003]), 곤충류(Bagheri *et al.*[2010]), 해산 곤쟁이류(Verslycke and Janssen[2002]; Verslycke *et al.*[2003]; [2004a]; [2004b]) 등의 연구결과에서 나타나고 있다.

고농도의 이산화탄소에 청충을 7일간 노출한 결과 생존에는 영향이 없었으나, 농도가 증가 할수록 세포내 에너지 할당이 급격히 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 세포내 에너지 할당 변화에 미치는 주된 요인은 당질과 단백질 함량 감소였으며, 세포의 에너지 소비율(E<sub>c</sub>) 증가 또한 결과적으로 CEA 감소로 나타났다. 청충 체내의 에너지 조성 변화는 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 지질의 소비보다 단백질의 소비가 크게 늘어난 것이 원인으로 작용되었다. Vandembrouck[2009] 연구에서는 니켈(Ni)이온에 대한 물벼룩의

CEA 분석결과 단백질의 소비보다 지질의 소비가 크게 증가한 결과를 보고하였다. 이는 본 연구결과와 상반되는 결과이지만 생물의 영양단계, 즉 종에 따라 외부스트레스에 대응하는 전략 및 기전이 다르기 때문에 에너지 함량과 조성 또한 달라지는 것으로 판단된다. 청충은 하루에 체중 1 g 당 약 100 mg의 퇴적물을 섭취하는 것으로 보고된 바 있으며(MST[1991]) 노출기간 중 지질함량의 유지는 퇴적물에 포함된 유기물질 섭취로 인한 에너지로 추정할 수 있다. 퇴적물 내 유기물질 함량이 높거나 퇴적물 성상이 니질일 경우 갯지렁이의 체내 유기질함량은 증가한다(Longbottom[1970])는 연구결과를 볼 때 본 연구에서 나타난 결과가 같은 경향을 보임을 알 수 있다. 본 연구에서는 각 실험구별로 동일한 퇴적물을 사용하였기 때문에 퇴적물 성상 차이로 인한 청충 체내 에너지함량 증가 또는 감소 영향은 실험구별로 차이가 매우 적을 것으로 판단된다. 이산화탄소 농도별 청충 체내 지질함량은 Low부터 대조구 대비 유의한 수준의 증가가 나타났으며 Medium에서는 Low와 유사한 수준이었고, High에서는 다시 증가하였다. 이산화탄소로 인한 해수의 화학적 변화가 청충의 지질함량 변화에 미치는 영향연구는 국내·외적으로 없기 때문에 비교는 불가능 하였다.

당질, 단백질, 지질은 생물체를 구성하는 대표적인 저장물이며, ETS 활성은 세포내 미토콘드리아에서 산소를 소비하는(세포내 호흡) 시스템이다. 즉, 흡수된 에너지 중 여러 가지 대사를 통하여 소비되는 에너지의 양을 나타내는 지표이다. 본 연구에서도  $E_c$ 가 High에서 보다 Medium에서 더 높게 나타났다. ETS 활성은 아가미 혹은 폐 등의 호흡기관에서 산소교환율(호흡률)과 밀접한 상관관계가 있다(Packard *et al.*[1996]). 어류는 수온이 증가하거나 수중에 용해된 암모니아농도가 증가함에 따라 산소 소비율이 증가하는 것으로 보고되었다(Mitsunaga *et al.*[1999]; Smart[1978]). 또한 독성물질이 아치사의 농도로 노출되면 호흡률이 증가하는 현상이 나타나지만, 치사농도에 근접하는 농도에서는 오히려 호흡율이 감소하는 것이 실험적으로 밝혀진 바 있다(NRF[2004]).

물벼룩을 카드뮴에 48, 96시간 노출하였을 때 농도가 증가함에 따라 에너지 소비가 감소하는 영향이 나타났다(De Coen and Janssen[1997]; [2003]; Soetaert *et al.*[2007]). 반면, 해산 곤쟁이류가 유해화학물질에 일정기간 노출되었을 때 농도 증가에 따라 에너지 소비가 증가하는 것으로 보고되었다(Verslycke *et al.*[2004a]; [2004b]). 독성물질이 생물에게 노출되는 정도에 따라 에너지 소비율이 다르게 나타나는 것은 아직까지 독성 메커니즘이 명확히 규명되지 않았다. 하지만 생물의 ETS 활성을 이용한 세포 에너지 소비율 평가는 생물의 성장과 밀접한 관계가 있기 때문에 생물영향을 측정하기에 좋은 지표가 될 수 있을 것으로 판단된다.

스트레스로 인한 세포내 변화는 세포내로 유입된 이산화탄소로 인해 세포내부가 산성화되면서 효소활성을 저해시키고, 항상성기작에 의해 중탄산염 이온교환 등에 에너지를 사용함으로써 보유에너지 감소가 나타난 것으로 추정된다. 또한 생물노출 실험에서 이산화탄소를 주입한 후 평형상태에 도달하였을 때 생물을 노출하였기 때문에 급격한 pH 변화가 세포수준 또는 각 기관들까지 손상을 입혀 정상적인 대사과정이 이루어지지 않았거나 회복에 더 많은 에

너지를 할당 한 것으로 판단된다(Seibel and Walsh[2001]). Lee *et al.*[2006]에서는 이산화탄소로 산성화시킨 해수에 해양발광미생물과 단각류를 노출한 결과 해양발광미생물의 경우 pH 5.7 그리고 단각류는 pH 6.4 이하에서 영향이 관찰되었으며, Sung *et al.*[2010]에서는 해양발광미생물을 이산화탄소에 12시간 노출한 결과 3,000 ppmv (pH 7.4)부터 저해 영향이 나타난 것으로 보고하였고 Kurihara & Shirayama[2004]에서는 pH 7.6 수준에서의 성체 발생 영향을 보고한 바 있다. 그리고 Berge *et al.*[2006]에서는 이매패류의 성장 저해가 pH 7.1부터의 영향을 보고하였다. 이를 본 연구결과(pH 7.53)와 비교하면 CEA 평가기법이 매우 민감한 수준에서 반응이 나타남을 알 수 있다.

본 연구에서 이용한 CEA 평가기법은 분석시간이 비교적 짧으며 민감한 특징을 갖고 있어, 환경 스트레스로 인한 생리적 반응을 나타내는 지표로 지금까지 널리 사용되어왔던 성장잠재력(scope for growth)을 대신할 수 있는 지표(Smolters *et al.*[2004])로 이용될 수 있을 것이다. 하지만 현장 시료의 독성평가나 유해화학물질이 생물에게 미치는 영향 그리고 현장이식실험에 대한 연구사례는 아직 많지 않은 편이며, 평가방법이 아직까지 명확히 규명되지 않았다는 단점이 있다. 광 등[2008]에서는 CEA 시험법의 오차를 줄이기 위한 선행연구가 수행되었으며, 시험법에 관한 표준지침서가 제시되어 있다. CEA는 실험실 평가 또는 현장적용평가 모두 가능하며, *in vivo*, *in vitro* test 모두 가능하다는 장점이 있다. 또한 생물 노출기간이 짧고 생물 반응결과가 민감하기 때문에 향후 증가된 이산화탄소로 인한 해양 생태계의 변화와 피해를 예측하는 지표로서 활용 가능할 것으로 사료된다.

## 후 기

본 연구는 국토해양부 연구개발사업으로 한국해양과학기술원에 서 수행중인 “이산화탄소 해양지중저장 기술개발”사업 지원으로 연구된 결과 중 일부임을 밝히며, 연구지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- [1] 강성길(Seong-Gil Kang), 2006, “기후변화 대응을 위한 이산화탄소 해양처리기술 (Marine processing techniques of carbon dioxide for responding to climate change)”, News & Information for Chemical Engineers (NICE), Vol.24, No.5, 424-432 (in Korean).
- [2] Ministry of Science and Technology, 1991, “Studies on the resource assessment and rearing techniques of marine polychaetes in Korea”, BSPG 00122-366-3, 318 pp (in Korean).
- [3] 광인실, 이원철, 이창훈, 방현우, 원두희, 박기연, 박정안, 2008, “수서 지표동물의 생태독성 연구방법(Ecotoxicological research method using aquatic bioindicators)”, 정행사(Junghaengsa), 140 pp (in Korean).
- [4] National Research Foundation of Korea, 2004, “Effects of endocrine disruptors on marine organisms”, R01-2001-000-00251-0, 100 pp (in Korean).

- [5] Bagheri, F., Talebi, K. and Hosseinaveh, V., 2010, "Cellular energy allocation of pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kol. (Hemiptera: Pentatomidae) in relation to juvenoid pyriproxyfen", African Journal of Biotechnology, Vol.9, No.35, 5746-5753.
- [6] Bamber R.N., 1990, "The effects of acidic seawater on three species of lamellibranch mollusc", J. Exp. Mar. Biol. Ecol., Vol.143, 181-191.
- [7] Batten, S.D., and Bamber, R.N., 1996, "The effects of acidified seawater on the polychaete *Nereis virens* Sars, 1835", Marine Pollution Bulletin, Vol.32, No.3, 283-287.
- [8] Berge, J.A., Bjerkeng, B., Pettersen, O., Schaanning, M.T. and Øxnevad, S., 2006, "Effects of increased sea water concentration of CO<sub>2</sub> on growth of the bivalve *Mytilus edulis* L.", Chemosphere, Vol.62, No.4, 681-687.
- [9] Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959, "A rapid method of total lipid extraction and purification", Can. J. Biochem. Physiol., Vol.37, No.8, 911-917.
- [10] Bradford, M.M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding", Analytical Biochemistry, Vol.72, 248-254.
- [11] De Coen, W.M. and Janssen, C.R., 1997, "The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations", Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, Vol.6, 43-55.
- [12] De Coen, W.M. and Janssen, C.R., 2003, "The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics", Environ. Toxicol. Chem., Vol.22, 1632-1641.
- [13] Erk, M., Ivankovic, D. and Strižak Ž., 2011, "Cellular energy allocation in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the stratified estuary as a physiological biomarker", Marine Pollution Bulletin, Vol.62, 1124-1129.
- [14] Gentzis, T., 2000, "Subsurface sequestration of carbon dioxide - an overview from an Alberta (Canada) perspective", International Journal of Coal Geology, Vol.43, 287-305.
- [15] Gnaiger, E., 1983, "Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption", In: E. Gnaiger & H. Forstner (ed), Polarographic Oxygen Sensors, Springer-Verlag, Berlin, 337-345.
- [16] Herzog, H.J., 2001, "What Future for Carbon Capture and Sequestration?", Environmental Science and Technology, Vol.35, 148A-153A.
- [17] IPCC, 2001, "Climate Change 2001; Scientific Basis", Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 994 pp.
- [18] IPCC, 2005, "IPCC Special Report on Carbon Dioxide Capture and Storage", Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 431 pp.
- [19] Kita, J. and Ohsumi, T., 2004, "Perspectives on Biological Research for CO<sub>2</sub> Ocean Sequestration", Journal of Oceanography, Vol.60, No.4, 695-703.
- [20] Knutzen, J., 1981, "Effects of decreased pH on marine organisms", Marine Pollution Bulletin, Vol.12, 25-29.
- [21] Kurihara, H. and Shirayama, Y., 2004, "Effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub> on sea urchin early development", Marine Ecology Progress Series, Vol.274, 161-169.
- [22] Lee, J.S., Lee, K.T., Kim, C.K., Park, G.H., Lee, J.H., Park, Y.G. and Gang, S.G., 2006, "Influence of the increase of dissolved CO<sub>2</sub> Concentration on the marine organisms and ecosystems", Journal of the Korean Society for Marine Environmental Engineering, Vol.9, No.4, 243-252.
- [23] Longbottom, M.R., 1970, "The distribution of *Arenicola marina* (L.) with particular reference to the effects of the particle size and organic matter of the sediments", Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, Vol.5, 138-157.
- [24] Macrae, K.J., 2009, "Effects on cellular energy allocation and total oxyradical capacity in contamination exposed *Arenicola marina*", Master thesis, University of Oslo, Norway, 69 pp.
- [25] Mitsunaga, Y., Sakamoto, W., Arai N. and Kasai, A., 1999, "Estimation of the metabolic rate of wild red sea bream *Pagrus major* in different water temperature", Nippon Suisan Gakkaishi, Vol.65, No.1, 48-54.
- [26] Moolman, L., Van Vuren, J.H. and Wepener, V., 2007, "Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods", Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol.68, 443-450.
- [27] Olsen, G.H., Sva, E., Carroll, J., Camus, L., De Coen, W., Smolder, R., Øveraas, H. and Hylland, K., 2007, "Alterations in the energy budget of Arctic benthic species exposed to oil-related compounds", Aquatic Toxicology, Vol.83, 85-92.
- [28] Olsen, G.H., Carroll, J., Sva, E. and Camus, L., 2008, "Cellular energy allocation in the Arctic sea ice amphipod *Gammarus wilkitzkii* exposed to the water soluble fractions of oil", Marine Environmental Research, Vol.66, 213-214.
- [29] Owens, T.G. and King, F.D., 1975, "The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton", Marine Biology, Vol.30, 27-36.
- [30] Packard, T.T., Berdalet, E., Blasco, D., Roy, S.O., St-Amand, L., Lagacé, B., Lee K. and Gagnó, J.P., 1996, "Oxygen consumption in the marine bacterium *Pseudomonas nautica* Predicted from ETS activity and bisubstrate enzyme kinetics", Journal of Plankton Research, Vol.18, No.10, 1819-1835.
- [31] Pörtner, H.O., 2008, "Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view", Marine Ecology Progress Series, Vol.373, 203-217.
- [32] Roe, J.H. and Dailey, R.E., 1966, "Determination of glycogen with the anthrone reagent", Anal. Biochem., Vol.15, 245-250.
- [33] Seibel, B.A. and Walsh, P.J., 2001, "Potential impacts of CO<sub>2</sub> injection on deep-sea biota", Science, Vol.294, No.5541, 319-320.

- [34] Smart, G., 1978, "Investigation of the toxic mechanisms of ammonia to fish gas exchange in rainbow trout exposed to acutely lethal concentrations", *Journal of Fish Biology*, Vol.12, 93-104.
- [35] Smolders, R., Boeck, G.D. and Blust, R., 2003, "Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*)", *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.22, 890-899.
- [36] Smolders, R., Bervoets, L., De Coen W. and Blust, R., 2004, "Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization", *Environmental Pollution*, Vol.129, 99-112.
- [37] Soetaert, A., Vandenbrouck, T., van der Ven, K., Maras, M., van Remortel, P., Blust, R. and De Coen, W., 2007, "Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: Integration of differential gene expression with higher-level effects", *Aquatic Toxicology*, Vol.83, 212-222.
- [38] Stomperudhaugen, E.S., Øverås, N.H.H., Langford, K., De Coen, W., Smolders, R. and Hylland, K., 2009, "Cellular Energy Allocation in *Hediste diversicolor* Exposed to Sediment Contaminants", *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, Vol.72, 244-253.
- [39] Sung, C.G., Moon, S.D., Kim, H.J., Choi, T.S., Lee, K.T., Lee, J.S. and Kang, S.G., 2010, "Influence of increased carbon dioxide concentration on the bioluminescence and cell density of marine bacteria *Vibrio fischeri*", *The Sea Journal of the Korean Society of Oceanography*, Vol.15, No.1, 8-15.
- [40] U.S. EPA., 1990, "Protocol for juvenile *Neanthes* sediment bioassay", U.S. Environmental Protection Agency, Puget Sound Estuary Program, Seattle, WA., 24 pp.
- [41] Vandenbrouck, T., Soetaert, A., van der Ven, K., Blust, R. and De Coen, W., 2009, "Nickel and binary metal mixture responses in *Daphnia magna*: Molecular fingerprints and (sub)organismal effects", *Aquatic Toxicology*, Vol.92, 18-29.
- [42] Verslycke, T. and Janssen, C.R., 2002, "Effects of a changing abiotic environment on the energy metabolism in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea)", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol.279, 61-72.
- [43] Verslycke, T., Vercauteran, J., Devos, C., Moens, L., Sandra P. and Janssen, C.R., 2003, "Cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following tributyltin exposure", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol.288, 167-179.
- [44] Verslycke, T., Ghelkier, A. and Janssen, C.R., 2004a, "Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands)", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol.306, 245-267.
- [45] Verslycke, T., Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B. and Janssen, C.R., 2004b, "Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol.306, 1-16.

---

2012년 11월 23일 원고접수

2012년 12월 31일 심사수정일자

2013년 1월 11일 게재확정일자