



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

A DISSERTATION
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
SPATIAL VARIATION ON THE PHYSIOLOGICAL AND REPRODUCTIVE
PARAMETER OF THE WILD PACIFIC OYSTER, *Crassostrea gigas* IN SOUTHERN
COAST OF KOREA

HEE-DO JEUNG

Department of Marine Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February 2016



**Spatial Variation on the Physiological and Reproductive Parameter of the Wild Pacific
Oyster, *Crassostrea gigas* in Southern Coast of Korea**

Hee-Do Jeung

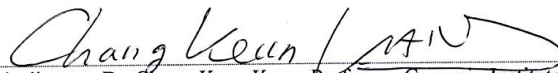
(Advised by Professor Kwang-Sik Choi)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

February 2016

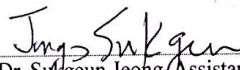
This dissertation has been examined and approved by



Thesis director, Dr. Chang-Keun Kang, Professor, Gwangju Institute of Science and Technology



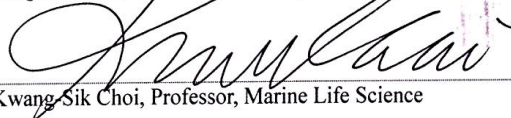
Dr. Jee-Hyun Jung, Principal Research Scientist, Korean Institute of Ocean Science & Technology



Dr. Sunggeun Jeong, Assistant Professor, Marine Life Science



Dr. Sang-Rul Park, Assistant Professor, Marine Life Science



Dr. Kwang-Sik Choi, Professor, Marine Life Science

2016.02

Date

Department of Marine Life Science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

CONTENTS

국문요약.....	1
List of figures.....	6
List of tables.....	10
Part 1. Background;Coastal environment assessment program, bioindicator and biomarker.	12
Abstract.....	13
1. Trends of coastal monitoring program.....	14
2. Biomarkers in monitoring program.....	18
Part 2. Reproductive effort of the wild Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> in Gwangyang bay and Jinhae bay off the southern coast of Korea associated with their habitat.	26
Abstract.....	27
1. Introduction.....	28
2. Materials and Methods.....	31
2.1. Sampling effort and condition index.....	31
2.2. Biochemical composition.....	35
2.3. Reproduction effort.....	36
2.4. Standard animal.....	37
2.5. Histological preparation.....	37
2.6. Gametogenesis and digestive gland atrophy.....	38
2.7. Environmental factor.....	38

51	2.8. Statistics analysis.....	41
52	3. Result.....	41
53	3.1. Condition index.....	41
54	3.2. Tissue dry weight and gross biochemical compositions of standard animal.....	45
55	3.3. Gonad development and reproductive effort.....	50
56	3.4. Digestive gland atrophy.....	53
57	3.5. Principal coordinates (PCO) analysis.....	55
58	4. Discussion.....	65
59		
60	Part 3. Physiological variations of the wild Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> in Gwangyang	
61	bay off the southern coast of Korea influenced by geographical differences.....	71
62		
63	Abstract.....	72
64	1. Introduction.....	73
65	2. Materials and methods.....	76
66	2.1. Sampling effort.....	76
67	2.2. Individual level analysis.....	82
68	2.2.1. Condition index and physiological index.....	82
69	2.2.2. Tissue dry weight of standard animal.....	82
70	2.3. Tissue level analysis.....	82
71	2.3.1. Biochemical composition of standard animal.....	82
72	2.3.2. Histopathological observation and digestive gland atrophy.....	83
73	2.4. Cellular level analysis.....	84
74	2.4.1. Cytochemical responses.....	84
75	2.4.1.1. Neutral lipids (NL).....	84

76	2.4.1.2. Lipofuscin (LF).....	85
77	2.4.1.3. Lysosomal membrane stability (LMS).....	85
78	2.4.1.4. Image analysis.....	86
79	2.4.2. Hemocyte parameter.....	87
80	2.4.2.1. Cell count.....	87
81	2.4.2.2. Cell mortality and DNA damage.....	88
82	2.4.2.3. Phagocytosis ability.....	89
83	2.4.2.4. Neutral red retention time.....	89
84	2.5. Pollutant deposition in the oyster tissue.....	90
85	2.5.1. PAHs concentration in oyster tissue.....	90
86	2.5.2. Heavy metals concentration in oyster tissue.....	95
87	2.6. Environmental factor.....	97
88	2.7. Statistics analysis.....	99
89	3. Results.....	99
90	3.1. Individual levels.....	99
91	3.1.1. Condition index and physiological index.....	99
92	3.1.2. Tissue dry weight of standard animal.....	103
93	3.2. Tissue levels.....	105
94	3.2.1. Biochemical composition of standard animal.....	105
95	3.2.2. Gametogenic stage and histopathological observation.....	107
96	3.2.3. Digestive gland atrophy (DGA).....	110
97	3.3. Cellular levels.....	112
98	3.3.1. Cytochemical responses.....	112
99	3.3.1.1. Lipofuscin (NF) and neutral lipid (NL) in digestive gland cells of oyster.....	112
100	3.3.1.2. Lysosomal membrane stability (LMS) of digestive gland cells.....	115

101	3.3.2. Hemocyte parameter.....	117
102	3.3.2.1. Cell count.....	117
103	3.3.2.2. Cell mortality.....	119
104	3.3.2.3. DNA damage.....	121
105	3.3.2.4. Phagocytosis capacity.....	122
106	3.3.2.5. Neutral red retention time (NRR time).....	124
107	3.4. Pollutant deposition in oyster tissue.....	125
108	3.4.1. PAHs concentrations.....	125
109	3.4.2. Heavy metal concentration.....	129
110	3.5. Principal coordinates (PCO) analysis.....	131
111	4. Discussion.....	137
112	4.1. Study area.....	137
113	4.2. Individual level.....	138
114	4.3. Tissue level.....	139
115	4.4. Cellular level.....	142
116	4.5. Contaminant deposition in the oyster tissue.....	146
117		
118	Reference.....	149
119	Acknowledgements.....	163
120		

121
122

국문요약

123 **Part 1.** Background; Coastal environment assessment program, bioindicator and biomarker.

124

125 연안지역은 산업활동에 따른 다양한 종류의 오염물질이 끊임없이 유입되
126 며, 이는 연안에 서식하는 생물체의 성장 및 번식, 면역체계 등에 유해한 영향을
127 끼친다. 따라서 세계 여러 나라에서는 약 40여년 전부터 연안의 생태학적 위험성
128 평가를 위해 다양한 모니터링 프로그램을 수행하고 있으며, 수질변화 및 퇴적물,
129 생물체에 잔류하는 오염물질 측정과 함께 최근에는 생체지표 (biomarker)를 이용
130 한 연안환경 평가를 수행하고 있다. 우리나라의 경우에는 해양환경기준설정 및
131 개선방안 연구, 해양생태계기본조사, 남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발 등
132 다수의 프로그램이 수행되고 있다. 그러나 대부분의 연구에서 수질 및 퇴적물의
133 오염도를 평가하고 있으며, 일부 연구에서 생물체에 미치는 영향에 대한 연구가
134 진행되고는 있지만 아직까지는 제한적으로 이루어지고 있는 실정이다. 생체지표
135 는 체내 측정가능한 기질, 구조 혹은 일련의 과정으로 그 다음 단계에 발생할 수
136 있는 영향을 예측할 수 있는 지표로, 연안환경의 감시 수단으로 활용되고 있으며,
137 다양한 생체지표 개발이 되어왔다. 그러나 생물체는 항상성 (homeostasis) 유지를
138 위한 방어 (defense) 및 해독작용 (detoxification)을 통해 일정 수준 이하의 외부 오

139 염물질을 극복 할 수 있고, 번식주기 및 연령에 따라 스트레스에 대한 생리적 반
140 응이 다르게 작용할 수 있기 때문에, 생체지표 선택은 종합적이고 신중하게 이루
141 어져야 한다. 이 연구에서는 향후 연안환경 모니터링 프로그램에 적합한 생체지
142 표 개발의 기초자료를 제공하고자, 서식지의 환경에 따른 굴의 번식생리학적 요
143 인 변화 및 번식생리 요인 외 생리학적 요인의 변화를 조사하였다.

144

145

146 **Part 2.** Reproductive effort of the wild Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in Gwangyang bay
147 and Jinhae bay off the southern coast of Korea associated with their habitat.

148

149 우리나라 남해안은 반 폐쇄성 (semi-closed) 작은 만 (bay) 들로 구성되어
150 있으며, 그 주변은 대규모의 항구 및 산업단지와 도시들로 둘러싸여있다. 따라서
151 이곳에 서식하는 고착성 이매패류들은 주변 환경에 민감하게 반응을 한다. 이 연
152 구에서는 서식지에 따른 굴의 번식생리 변화관찰을 위해, 2010년 10월 우리나라
153 남해안에 위치한 광양만과 진해만 15지역 조간대에 서식하는 굴을 채집하여 번식
154 생리학적 분석을 실시하였다. 채집된 굴은 실험실로 옮겨와 비만도 (condition
155 index) 및 생화학조성분 (총단백질, 총탄수화물), 생식소 발달 단계 (gonad
156 developmental stage)와 소화맹낭 위축도 (digestive gland atrophy) 지수와 같은 생리학

157 적 요인을 분석하였다. 굴의 번식량 (reproductive effort)은 indirect enzyme-linked
158 immunosorbent assay를 통해 산출하였다. 분석된 각 항목의 결과값과 환경자료를
159 수합하여 주좌표분석 (principal coordinates analysis, PCO)을 실시하여 번식생리학적
160 결과와의 상관관계를 분석하였다. 그 결과, 광양만의 경우, 내만의 초남대교와, 섬
161 진강유역의 2지역 (섬진대교와 차면리), 광양만 외만의 5지역으로 3개의 지역 그
162 룩으로 구분할 수 있었다. PCO 분석 결과, 내만의 초남대교는 환경인자 중
163 PBDEs, DDT, Chl-a 및 Silicates가 외만과 차이가 나는 것으로 조사되었고, 이때, 번
164 식생리학적 요인인 egg mass 및 total carbohydrates가 다른 지역에 비해 낮아지고
165 DGA가 높아지는 것으로 조사되었다. 특히, 초남대교에 서식하는 굴의 번식량의
166 경우, 외만의 장항 굴에 비해 5.2배 적은 알을 생산하였다. 진해만의 경우, 마산만
167 의 3개 지역이 독립적인 환경으로 평가되었으며, 진해만 내만의 4지역이 하나의
168 유사한 지역 그룹으로 구분되었다. PCO 분석 결과, 진해만 내만과 마산만의 지역
169 그룹 구분에 영향을 미치는 환경인자는 Nitrate, DIN, DO 및 pH 인 것으로 조사되
170 었으며, 이 때, egg mass 및 total carbohydrates와 같은 번식생리학적 요인들이 영향
171 을 받는 것으로 조사되었다. 종합하여 보았을 때, 광양만의 경우, PBDEs 및 DDT
172 와 같은 유기오염물질의 유입이 굴의 번식생리에 부정적인 영향을 미치는 것을

173 사료되며, 진해만의 경우, 내만에서 낮은 번식량이 Nitrate, DIN과 같은 수질 내 유
174 기영양물의 부족에 기인하는 것으로 사료된다. 즉, 굴의 체내 탄수화물 함량 및
175 번식량과 같은 번식생리학적 요인은 주변환경의 오염 혹은 결핍현상 발생 시 부
176 정적인 결과를 초래하는 것으로 사료되며, 이와 같은 연구 결과는 향후 연안환경
177 평가를 위한 모니터링 프로그램에 좋은 지표로 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

178

179

180 **Part 3. Physiological variations of the wild Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in Gwangyang**
181 **bay off the southern coast of Korea influenced by the geographical differences.**

182

183 서식지에 따른 굴의 번식 외 생리학적 지표의 변화를 조사하기 위해, 광양
184 만 조간대에 서식하는 굴의 세포수준 (cellular level)부터 개체수준 (individual level)
185 까지의 생리학적 변화를 연구하였다. 굴은 2012년 10월 광양만 내만으로부터 외
186 만으로 10개의 지역을 선정하여 조간대에 서식하는 굴을 채집하였으며, 세포수준
187 부터 조직수준 (tissue level), 세포수준의 생리지표를 분석 및 굴 체내에 잔류하는
188 PAHs 함량과 중금속 농도를 조사하였다. 서식지별 굴의 생리학적 지표와 환경인
189 자 및 굴 체내에 잔류하는 오염물질과의 상관관계를 분석하기 위해 주좌표분석
190 (PCO)을 실시하였다. 그 결과, 내만의 울촌면, 초남대교와 월내동의 한 그룹과 만

191 중부의 중동, 신덕리와 만성리, 외만의 무슬목, 방죽포, 계동과 울림리의 3개의 지
192 역 그룹으로 구분할 수 있었다. PCO 분석 결과, 내만과 외만의 지역 그룹 구분은
193 환경인자 중 As와 Cr과 같은 중금속 농도 및 수질요인 중 POC, Chl-a, pH, DO,
194 phosphate와 nitrate의 차이에 기인된 것으로 조사되었다. 이와 같은 환경요인의 차
195 이는 굴의 생리학적 인자 중 조직수준의 세포화학적 반응 (lysosomal response) 및
196 총탄수화물 함량, 세포수준의 혈구사망률 등에 영향을 미치는 것으로 조사되었다.
197 이 연구 결과, 광양만 내만의 환경이 굴 대부분의 생리학적 요인에 부정적인 영
198 향을 끼치는 것으로 조사되었으며, 개체수준 및 조직수준에서의 생리인자들이 뚜
199 렷한 상관관계를 보였다. 따라서 연안환경 모니터링에 있어 만성적인 스트레스를
200 파악하기 위한 생체지표로는 세포수준의 분석보다는 개체수준과 조직수준에서의
201 지표를 활용하는 것이 적합하다고 사료된다. 이 연구는 국내 최초로 이매패류의
202 생리지표와 연안환경의 상관관계를 조사한 결과로, 향후 연안환경 평가에 중요한
203 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

204

205

206 **List of Figures**

207

208 **Fig. 1-1.** Biomarkers linked to energy metabolism and bioenergetics to the level of biological
209 organization. After Amiard-Triquet et al. (2013).....20

210 **Fig. 1-2.** Pros and cons of biological responses at different levels of organization as
211 biomarker/bioindicators of the presence and/or effects of environmental stress
212 including chemical contaminants. After Amiard-Triquet et al. (2013).....22

213

214 **Fig. 2-1.** Location of the sampling sites. Wild oysters were collected from 8 sites in
215 Gwangyang bay and 7 sites in Jinhae bay.....33

216 **Fig. 2-2.** Condition index of the oysters collected from Gwangyang (A) and Jinhae (B) bay.
217 Data expressed as mean \pm standard error, ANOVA; $p < 0.05$44

218 **Fig. 2-3.** Tissue dry weight of the standard animal (60.9 mm SH) examined in this study. Data
219 expressed as mean \pm 95% confidence interval.....47

220 **Fig. 2-4.** Total protein content of the standard animal (60.9 mm SH) measured in this study.
221 Data expressed as mean \pm 95% confidence interval.....48

222 **Fig. 2-5.** Total carbohydrate composition of standard animal (60.9 mm SH) assessed in this
223 study. Data expressed as mean \pm 95% confidence interval.....49

224 **Fig. 2-6.** Frequency distribution of gonad developmental stages of oysters examined in this
225 study.....51

226 **Fig. 2-7.** Egg mass of the standard animal (60.9 mm SH) assessed in this study. Data
227 expressed as mean \pm 95% confidence interval.....52

228 **Fig. 2-8.** Digestive gland atrophy of the oysters collected from Gwangyang and Jinhae bay in

229	June 2010. Data expressed as mean \pm standard error, ANOVA, $p < 0.05$	54
230	Fig. 2-9. Map showing groups of locations clustered by the Euclidean distance.....	57
231	Fig. 2-10. Dendrogram of the hierarchical clustering of sampling sites of Gwangyang bay	
232	based on Euclidean distance.....	58
233	Fig. 2-11. Dendrogram of the hierarchical clustering of sampling sites of Jinhae bay	
234	generated by the Euclidean distance.....	59
235	Fig. 2-12. Principal coordinate analysis of the 8 sampling sites in Gwangyang bay. Euclidean	
236	distance values (up) and Bray-Curtis similarity values (down) were calculated on	
237	standardized $\log(X+1)$ transformed abundances of reads grouped to classes.	
238	Percentages of the total variation that explained by the first two axes are indicated.	
239	Vectors represent the direction of the relationships between the classes and the	
240	ordination axes.....	63
241	Fig. 2-13. Principal coordinate analysis of the 7 sampling sites located in Jinhae bay.	
242	Euclidean distance values (up) and Bray-Curtis similarity values (down) were	
243	calculated based on standardized $\log(X+1)$ transformed abundances of reads	
244	grouped to classes. The percentages of the total variation that explained by the first	
245	two axes are indicated. Vectors represent the direction of the relationships between	
246	the classes and the ordination axes.....	64
247		
248	Fig. 3-1. Map showing the sampling sites. <i>Crassostrea gigas</i> collected from ten sampling	
249	sites in Gwangyang bay, off the southern coast of Korea. YC: Yulchon-nyeon, CN:	
250	Chonam bridge, JD: Jung-dong, WL: Wollae-dong, SD: Sinkeok-ri, MS1:	
251	Manseong-ri, MS2: Mooseulmok, GD: Gye-dong, BJ: Bangjukpo, YL: Yullim..	78
252	Fig. 3-2. Flow chart showing the experimental procedure.....	81

253	Fig. 3-3. Schematic diagram of PAHs analysis of the oyster tissues.....	92
254	Fig. 3-4. Condition index of <i>C. gigas</i> collected form Gwangyang bay in 2012. Data expressed	
255	as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$	101
256	Fig. 3-5. Physiological index of <i>C. gigas</i> sampled from Gwangyang bay in 2012. Data	
257	expressed as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$	102
258	Fig. 3-6. Tissue dry weight of the standard animal (60.3 mm SH) examined in this study. Data	
259	expressed as mean \pm 95% confidence interval.....	104
260	Fig. 3-7. Total protein (A) and total carbohydrate (B) of the standard animal (60.3 mm SH)	
261	measured in this study. Data expressed as mean \pm 95% confidence interval.....	106
262	Fig. 3-8. Frequency distribution of gonad developmental stages of <i>C. gigas</i> collected from	
263	Gwangyang bay in 2012.....	108
264	Fig. 3-9. Digestive gland atrophy of <i>C. gigas</i> collected from Gwangyang bay in 2012. Data	
265	expressed as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$	111
266	Fig. 3-10. Lipofusin contents in the digestive gland cells of oyster tissue section examined in	
267	this study. Data expressed as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$	113
268	Fig. 3-11. Neutral lipid contents in the digestive gland cells of oyster tissue section measured	
269	in this study. Data expressed as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$	114
270	Fig. 3-12. Labilization period of oysters estimated by NAH activity. Data expressed as mean	
271	\pm SE, ANOVA, $p < 0.05$	116
272	Fig. 3-13. Hemocyte counts of <i>C. gigas</i> collected from Gwangyang bay in 2012. Three	
273	populations of hemocytes were distinguished. Data expressed as mean \pm SE,	

274	ANOVA, $p < 0.05$	118
275	Fig. 3-14. Hemocyte mortality of <i>C. gigas</i> sampled from Gwangyang bay in 2012. Data	
276	expressed as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$	120
277	Fig. 3-15. Hemocyte DNA damage of <i>C. gigas</i> collected from Gwangyang bay in 2012. Data	
278	expressed as mean \pm SE.....	121
279	Fig. 3-16. Phagocytosis capacity of <i>C. gigas</i> hemocyte populations. Data expressed as mean	
280	\pm SE.....	123
281	Fig. 3-17. Neutral red retention time of <i>C. gigas</i> examined in this study. Data expressed as	
282	mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$	124
283	Fig. 3-18. Distribution of PAHs concentration in oyster tissues collected from Gwangyang	
284	bay in 2012.....	127
285	Fig. 3-19. Composition profile of PAHs concentration in oyster tissues collected from	
286	Gwangyang bay in 2012; (A) oysters from Wollae-Dong, (B) oysters from	
287	Bangjukpo.....	128
288	Fig. 3-20. Concentration of each heavy metal in oyster tissue collected from Gwangyang bay	
289	in 2012.....	130
290	Fig. 3-21. Map showing groups of locations clustered by Euclidean distance.....	132
291	Fig. 3-22. Dendrogram of the hierarchical clustering of sampling sites of Gwangyang bay	
292	based on Euclidean distance.....	133
293	Fig. 3-23. Principal coordinate analysis of the 10 sampling sites in Gwangyang bay.	
294	Euclidean distance values (up) and Bray-Curtis similarity values (down) were	
295	calculated from the standardized $\log(X+1)$ transformed abundances of reads	
296	grouped to classes. Percentages of the total variation explained by the first two	

297 axes are indicated. Vectors represent the direction of the relationships between
298 classes and ordination axes.....136
299

300	List of Tables	
301		
302	Table 1-1. Summary of the biomarkers used in various monitoring program.....	24
303		
304	Table 2-1. Description of geography of the sampling sites.....	34
305	Table 2-2. Environmental parameters of the seawater and sediment measured by MEHI	
306	report (2010).....	40
307	Table 2-3. Shell height and tissue dry weight of the oysters examined in this study. N:	
308	number of oysters, SE: standard error.....	43
309	Table 2-4. Results of SIMPER test showing the main contribution factors within a location	
310	groups in Gwangyang bay.....	60
311	Table 2-5. Results of SIMPER test showing the main contribution factors within a location	
312	groups in Jinhae bay.....	61
313		
314	Table 3-1. Description of habitat characteristics.....	79
315	Table 3-2. Biometric information of <i>C. gigas</i> collected from Gwangyang Bay in 2012. N:	
316	number of specimen, SH: shell height, TDWT: tissue dry weight, SE: standard	
317	error, ANOVA, $p < 0.05$	80
318	Table 3-3. Surrogate internal standards and GC internal standard for the analysis of PAHs of	
319	oyster tissue.....	93
320	Table 3-4. Analytical conditions of GC/MS for PAHs.....	94
321	Table 3-5. Analytical conditions of ICP-MS for heavy metals.....	96
322	Table 3-6. Seawater parameters measured by MEHI (2012) and heavy metal concentration	
323	and PAHs in oyster tissue measured in this study.....	98
324	Table 3-7. The prevalence of parasitic infection in oyster surveyed in 2012.....	109

325 **Table 3-8.** Results of SIMPER test showing the main contribution factors within the location
326 groups in Gwangyang bay..... 134
327

328

329 **Part 1**

330 **Background; Coastal environment assessment program, bioindicator and**

331 **biomarker**

332

333 **Abstract**

334 Coastal area is affected by various types of contaminants accompanied by
335 anthropogenic activities. These contaminants could be negatively influenced on the growth,
336 reproduction and immunity of animals. Consequently numerous countries have been
337 conducted monitoring programs for assessment of environmental risk. In these monitoring
338 programs includes the survey alteration of water quality, contaminant concentration in the
339 sediments and assessment of coastal environment using specific bioindicators and biomarkers.
340 Marine bivalves such as oysters are sessile, filter feeder animal, which are often used as a
341 sentinel species in coastal environmental monitoring since changes in the environmental
342 quality are often well preserved in their tissue and shells. In case of Korea, several programs
343 have been conducted as a Study of Standard Utilizing and Improvement of the Marine
344 Environment, National Investigation of Marine Ecosystem, Development of Marine
345 Ecosystem Health Index (MEHI) in the Special Management Areas of the South Sea and so
346 on. However, almost all of studies were assessed the water and sediment quality, few studies
347 were surveyed the effect of environment on the living organisms. Also, living animals has a
348 defense and detoxification mechanisms to maintain a homeostasis, and the response of
349 physiological indices could varied according to their reproductive cycle and age. Therefore,
350 development of suitable biomarkers in monitoring program should be carefully approached.
351 In this dissertation, to provide basic information for developing suitable biomarkers in
352 assessment program of coastal environment, variations of physiology and reproduction of
353 Pacific oysters depending on their habitat were investigated.

354

355 **Key words:** Coastal Monitoring program, Bioindicator, Biomarker, Bivalve

356

357 **1. Trends of coastal monitoring program**

358 연안지역은 산업활동에 따른 다양한 종류의 오염물질 (i.e. 공장폐수 및 농
359 업용수, 생활하수, 산업쓰레기, 연안부두 부산물, 관광활동 등)이 끊임없이 유입된
360 다 (Amiard-Triquet et al., 2013; 2015). 해양으로 유입되는 오염물질은 유기물
361 (organic materials; i.e. pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH), persistence
362 organic pollutants (POPs) and ect.)과 무기물 (inorganic materials; i.e. heavy metal)로 구
363 분될 수 있으며, 이들 오염물질은 생물체의 성장 및 번식, 면역체계 등에 유해한
364 영향을 끼친다 (Gosling, 2004; Livingstone and Pipe, 1992; Livingstone et al., 2000). 따
365 라서 세계 여러 나라에서는 약 40여년 전부터 생태학적 위험성 평가(ecological
366 risk assessment, ERA)를 하기 위해 다양한 시도를 하여 왔다 (Amiard-Triquet et al.,
367 2013; 2015).

368 연안환경평가 프로그램의 가장 대표적인 케이스는 미국의 해양대기청
369 (National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA)에서 수행하는 “Mussel Watch”
370 프로그램이다. Mussel Watch의 전신은 National Pesticide Monitoring Program을 통해
371 1965-1972년 7년에 걸쳐 조개류 (clam), 굴 (oyster) 및 담치 (mussel)에 축적된 농
372 약의 양을 측정하는 것으로부터 시작되었으며, 1976-1978년 미국 환경보호국 (U.S.
373 Environmental Protection Agency, US EPA)에서 U.S. Mussel Watch라는 명목 하에 100
374 여개 지점의 미국 연안에 존재하는 Polychlorinated biphenyls (PCBs)와

375 Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE)의 오염 정도를 파악하기 위해 수질 및 퇴적
376 물, 생물체에 축적된 양을 측정하였다. 이후, 1984년부터 NOAA에서 Mussel Watch
377 를 수행하다가 1990년부터는 NOAA와 US EPA 공동으로 현재까지 연안 퇴적물
378 및 연안에 서식하는 굴과 담치를 이용하여 연안환경을 모니터링 해 오고 있다
379 (Amiard-Triquet et al., 2013; O'Connor, 2002). 유럽의 경우, 범유럽 해양오염 규제기
380 구 (OSPAR)에서 수행하는 Joint Assessment and Monitoring Programmes (JAMP)와 Co-
381 ordinated Environmental Monitoring Programme (CEMP)이 대표적인 케이스 이며, 그
382 외 Biological Effects of Environmental Pollution Program (BEEP), 호주의 Ecosystem
383 Health Monitoring Program (EHMP), 홍콩의 Environmental Protection Department (EPD)
384 에서 수행하고 있는 Water monitoring program 등 여러 국가에서 연안환경의 위험
385 성을 모니터링하기 위해 노력하고 있다 (한국해양과학기술원, 2013; Amiard-Triquet
386 et al., 2013; Guéguen et al., 2013; Viarengo et al., 2007).

387 세계 여러 나라에서 수행되고 있는 연안환경의 위험성 평가 모니터링 프
388 로그램에서는 주로 수질 및 퇴적물, 생물체에 존재하는 오염물질의 양을 측정하
389 여 왔다. 그러나 수질 측정 방법은 오염물질이 유입되며 확산되기 때문에 그 농
390 도가 희석되어 시간과 공간에 따른 차이가 발생하는 단점이 있고, 퇴적물 분석
391 방법은 수질 측정에 비해 장기간 축적 되어 높은 농도로 측정되지만, 지역별 퇴

392 적물의 입도 특성에 따라 농축 정도가 다른 것이 일반적이며 그 농도가 실제 생
393 물체에 영향을 끼치는지 알 수 없는 단점이 있다 (Hamza-Chaffai, 2014). 따라서 연
394 안환경의 “건강함”을 평가하기 위해서는 생물체의 반응을 이용한 오염물질의 독
395 성/위험성을 측정해야 할 필요가 있다. 굴 (oyster)과 담치 (mussel)와 같은 해산 이
396 매패류는 다음과 같은 장점; 1. 고착성이며, 2. 전세계적으로 고르게 분포하며, 3.
397 채집 지역 내 풍부한 서식밀도 보이며, 4. 채집이 용이하고, 5. 여과섭식으로 인해
398 오염물질을 체내에 축적하기 때문에 연안환경의 오염정도를 나타내는 지표종
399 (bioindicator)로 사용되고 있다 (Amiard-Triquet et al., 2013; 2015; Dailianis, 2010;
400 Vasanthi et al., 2012; Viarengo et al., 2007). 지표종을 이용한 연안환경의 오염정도 평
401 가는 외부 오염물질의 농도 혹은 이매패류 내 오염물질 축적량과 이매패류의 치
402 사량의 상관관계 구명에 주된 초점을 두고 연구가 되었으나, 현재에는 이매패류
403 내 오염물질이 축적된 농도 구배에 따른 생물체의 반응 정도를 특정화 시킬 수
404 있는 다양한 생체지표 (biomarker)가 개발되어 왔다 (Schulte and Waters, 1999). 그러
405 나 이매패류는 일정 수준 이하의 외부 오염물질 혹은 질병의 경우에는 방어
406 (defense) 및 해독작용 (detoxification)을 통해 이를 극복 할 수 있고, 이매패류의
407 체내 오염물질의 잔류 기간은 다르기 때문에 (구리 (Cu)와 농약은 몇일, 카드뮴

408 (Cd)은 몇 달~일년), 자연에 서식하는 이매패류의 생리적 반응과 환경오염의 상관
409 관계 구명은 쉽지 않다. 또한 오염물질이 수질 및 퇴적물에 축적되며 산화, 환원
410 되어 무독성 형태로 변화할 수 있고, 이매패류의 번식주기에 따라 스트레스에 대
411 한 생리적 반응이 다르게 작용할 수 있기 때문에 자연에 서식하는 이매패류를 이
412 용한 모니터링에서는 연령과 번식주기를 잘 고려하여야 한다 (Amiard-Triquet et al.,
413 2013; 2015; Dailianis, 2010; Viarengo et al., 2007).

414 우리나라는 국토해양부에서 해양생태계 및 국민건강 보호를 고려한 해양
415 환경기준을 재설정하여 해역의 과학적 평가 및 관리를 하기 위해 2007년부터 “해
416 양환경기준설정 및 개선방안 연구”를 수행하고 있다. 이 연구에서는 해수의 수질
417 과 퇴적물에 존재하는 유해물질을 파악하고 그 기준을 제시하고 있다 (국토해양
418 부, 2013). 또한 해양환경관리공단에서는 “해양생태계기본조사”를 통해 2006년부
419 터 우리나라 전 연안해역의 해양생태계 현황과 생물 종 다양성을 10년주기로 반
420 복하여 조사하는 법정 조사를 실시하고 있다. 이 조사에서는 부유생태 (수온, 염
421 분, 투명도, 수소이온농도, 용존산소, 부유물질, 입자성 유기탄소/질소, 영양염류,
422 미량금속), 저서생태 (퇴적물의 입도, 영양염류, 중금속, 저서생물 다양성), 유영생
423 태 (난자치어, 어류, 갑각류, 두족류의 다양성 조사)로 나누어 조사하고 있다 (해
424 양수산부, 2012). 한국해양과학기술원에서 수행하고 있는 “남해 특별관리해역 생태

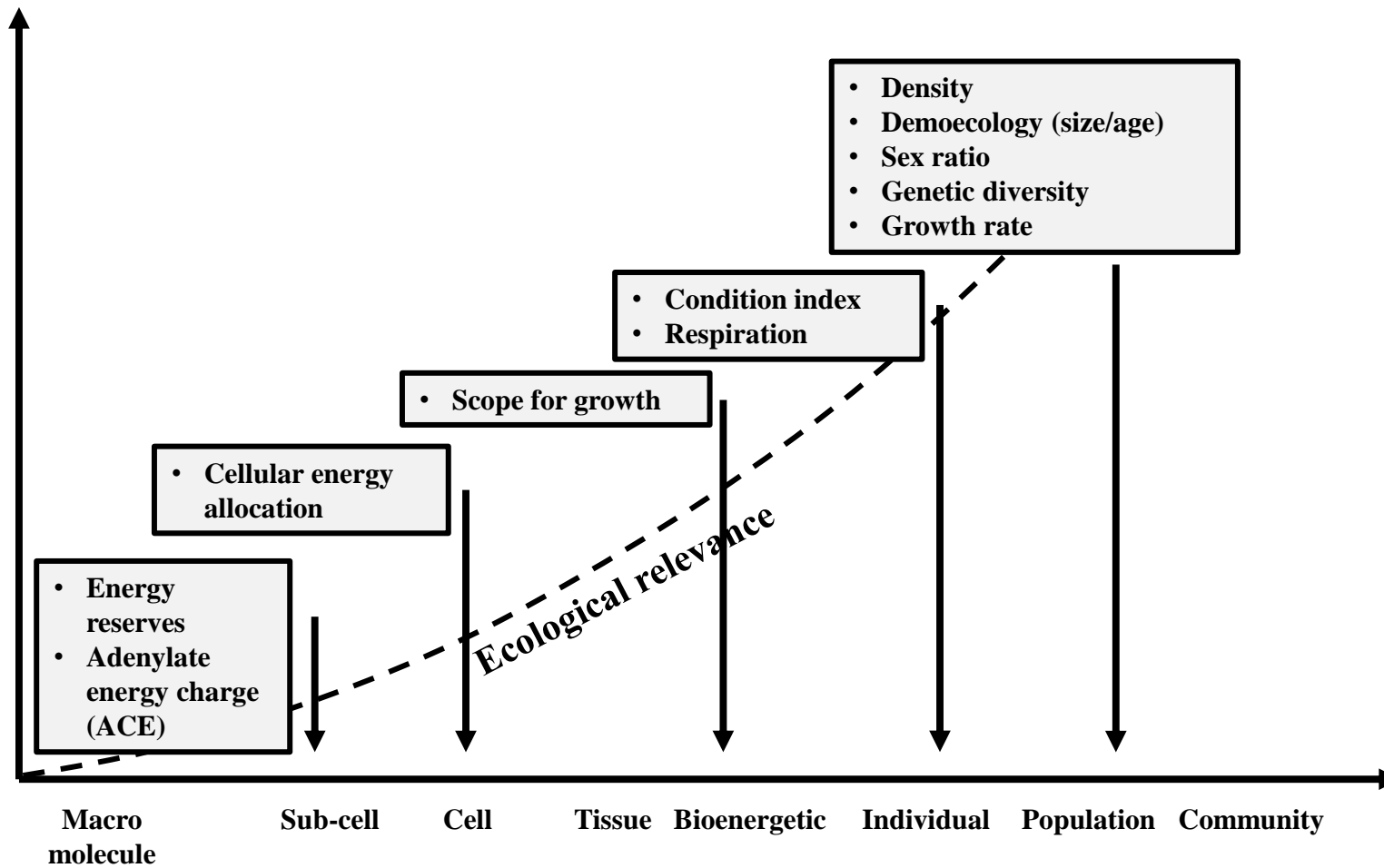
425 계 건강지수 개발” 사업은 광양만과 마산만 생태계의 상태를 생물, 화학, 물리,
426 지리적 요인의 종합적 평가를 통해 해양생태계의 안정적 존속을 위협하는 다양한
427 오염원에 대응하는 종합적 평가법 개발을 추진하고 있다(한국해양과학기술원,
428 2013). 그러나 대부분의 연구사업이 연안의 수질 및 퇴적물 오염도를 평가하여 왔
429 으며, 한국해양과학기술원 (2013)에서 어류대사 및 패류질병에 관한 연안 오염 정
430 도가 생물체에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되고는 있지만 아직까지는 제한적
431 으로 이루어 지고 있는 실정이다.

432

433 **2. Biomarkers in monitoring program**

434 세계보건기구 (World Health Organization)에서는 생체지표 (biomarker)를 체
435 내의 측정 가능한 기질, 구조 혹은 일련의 과정으로 그 다음 단계에 발생할 수
436 있는 영향을 예측할 수 있는 지표라 정의 하고 있다 (Bartell, 2006). 해산 이매패
437 류는 고착성의 여과섭식자로, 외부로부터 전달되는 스트레스에 대하여 이를 극복
438 하고 생리적 안정상태 (homeostasis)를 유지하기 위한 다양한 생물학적, 생리학적
439 변화를 나타내기 때문에 일정지역의 환경 오염원 등의 감시 수단으로 널리 사용
440 되어 왔다 (Chrousos and Gold, 1992; Choi et al., 2010; Galgani et al., 2009; Guéguen et al.,
441 2013; Huanxin et al., 2000; Moschino et al., 2011; Viarengo et al., 2007). 특히 이매패류의

442 아가미와 소화맹낭은 먹이의 수집, 소화 및 흡수의 역할을 하기 때문에, 이들의
443 조직병리학적, 세포화학적, 생화학적 및 유전학적 생리 반응은 연안환경의 오염도
444 를 평가하는데 있어 생체지표 (biomarker)로 활용되고 있다 (Au, 2004; Dailianis,
445 2010; Viarengo et al., 2007). 모니터링 프로그램에 활용되고 있는 생체지표는 Fig. 1-
446 1과 Fig. 1-2와 같이 측정 지표에 따라 생태학적으로 반영하고 있는 수준이 달라
447 지기 때문에 그 목적에 맞게 사용하여야 한다 (Amiard-Triquet et al., 2013).

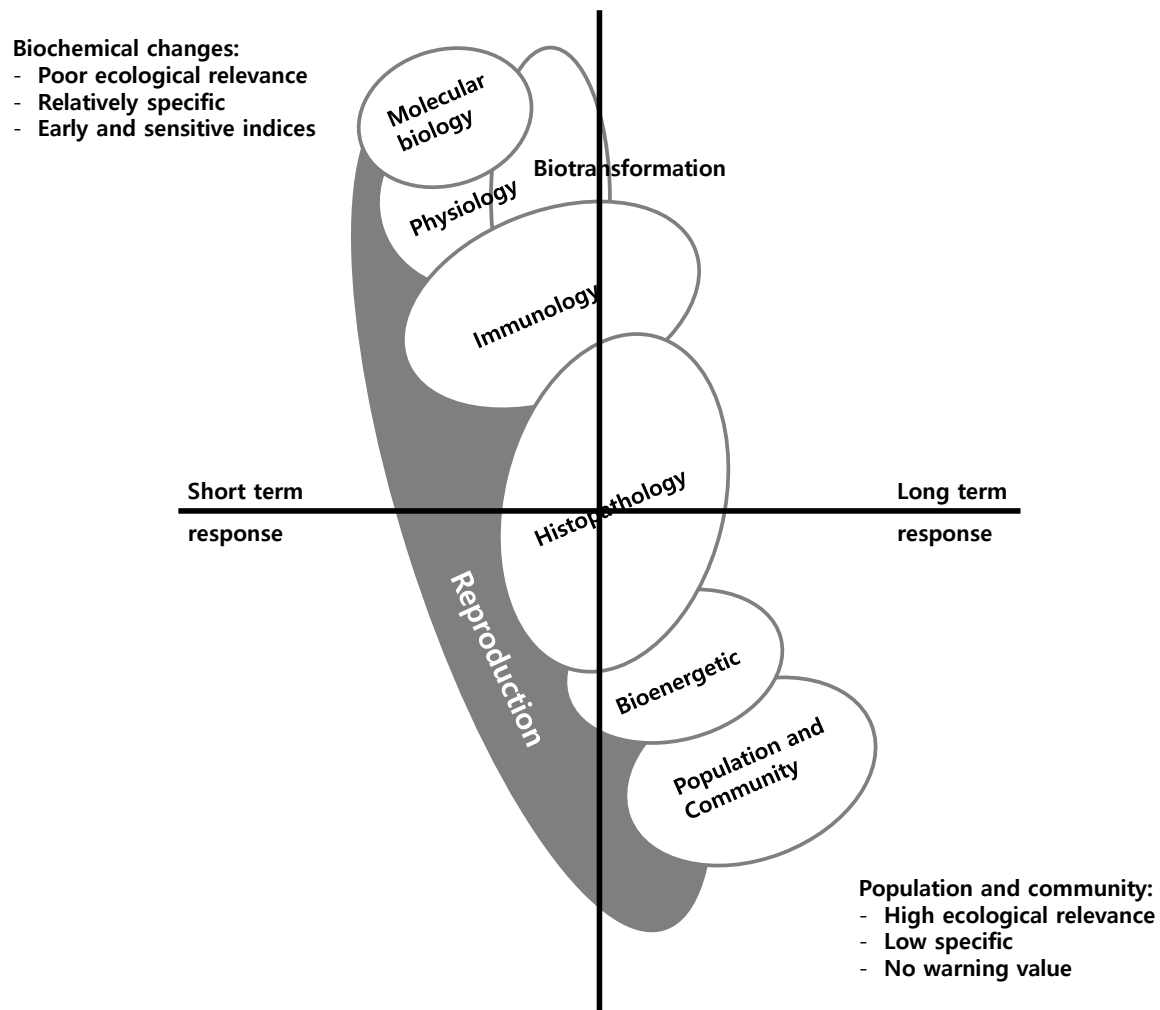


448

449 **Fig. 1-1.** Biomarkers linked to energy metabolism and bioenergetics to the level of biological organization. After Amiard-Triquet et al. (2013).

450

451 그러나 분자생물학적 혹은 생화학적 반응과 같은 낮은 수준의 생체지표는
452 특이적이고 민감하게 반응하며, 진단이 쉬우나 생태학적 변화와 접목하기 어려운
453 단점이 있으며, 개체군 수준 혹은 군집 반응과 같은 높은 수준의 생체지표는 생
454 태계의 건강도를 직접적으로 평가할 수 있으나, 그 효과가 가장 마지막에 나타나
455 기 때문에 초기 진단이 어려운 단점이 있다 (Fig. 1-2) (Amiard-Triquet et al., 2013; Au,
456 2004; Connell et al., 1999). 반면, 조직-세포학적 수준에서의 지표들은 비교적 진단이
457 쉽고, 개체의 건강도를 잘 반영하며 개체군 및 집단 수준의 변화를 예측하기 쉬
458 운 장점이 있어 USA (NOAA's National Status and Trends Program)와 유럽 (ICES,
459 NSTFMMP) 등 여러 나라에서 활용하고 있다 (Au, 2004).



460

461 **Fig. 1-2.** Pros and cons of biological responses at different levels of organization as biomarker/bioindicators of the presence and/or effects of

462 environmental stress including chemical contaminants. After Amiard-Triquet et al. (2013).

463 현재까지 세계 여러 나라에서 연안환경을 평가하기 위해 다양한 생체지표
464 를 발굴하여 왔다 (Table 1-1). 그러나 Session 1.1에서 설명한 바와 같이 생물은
465 일정 수준 이하의 외부 오염물질에 대한 방어 (defense) 및 해독작용 (detoxification)
466 을 통해 이를 극복 할 수 있고, 체내 오염물질의 잔류 기간은 각기 다르며, 오염
467 물질이 무독성 형태로 변화하거나, 번식주기에 따라 스트레스에 대한 생리적 반
468 응이 다르게 작용할 수 있기 때문에 (Amiard-Triquet et al., 2013; 2015; Dailianis, 2010;
469 Viarengo et al., 2007), 생체지표 (biomarker) 선택에 있어 다음과 같은 3가지 사항
470 을 반드시 고려해야 한다 (Dailianis, 2010; Viarengo et al., 2007).

- 471 1. 분자생물학적 혹은 세포학적 수준의 생체지표 사용한다. 즉각적인 세포
472 반응으로 독성에 대한 생물의 초기 반응을 관찰할 수 있다.
 - 473 2. 조직 혹은 개체 내 잔류하는 오염물질의 농축 정도를 파악하여야 한다.
 - 474 3. 조직수준의 생체지표를 사용한다. 생존, 번식의 변화와의 영향을 살핀다.
- 475 도출된 결과를 이용하여 개체수준 혹은 군집수준의 변화 예측이 가능하다.

476 **Table 1-1.** Summary of the biomarkers used in various monitoring program.

Levels		Biomarker	Reference
Molecular and cellular levels	Genotoxicity	Micronuclei DNA damage	Viarengo et al. (2007)
	Biochemical	MFO enzymes, Bile metabolites, DNA integrity, Stress proteins, Antioxidant enzymes	Bartell (2006)
	Cytochemical	CaATPase activity, Metallothionins, reactive oxygen species, Catalase, AChE activity, Vitellogenin	Amiard-Triquet et al. (2013), Viarengo et al. (2007)
	Immunological	Hemocytes counts, Phagocytosis, Oxidative burst, Lysozymes, Endocrine disruption (xenoestrogen)	Amiard-Triquet et al. (2013)
	Physiological	Creatinine, Transaminase enzymes, Cortisol, Triglycerides, Steroid hormones	Bartell (2006)
Tissue level	Histopathological	Necrosis, Macrophage aggregates, Parasitic lesions, Functional parenchyma, Carcinomas	Bartell (2006)
	Histo-cytochemical	Lysosome integrity (lipofuscin, neutral lipid, membrane stability), Lipopigment content, Peroxisome proliferation	Au (2004)
	Tissue	Lysosome/cytoplasm ratio, Glycogen, Lipids, Protein	Amiard-Triquet et al. (2013), Viarengo et al. (2007)
	Organism	Stress on stress, Scope for growth, Mortality	Viarengo et al. (2007)
Individual level	Individual	Growth, Total body lipid, Organo-indices, Condition factor, Gross anomalies	Bartell (2006)
Population level	Behavioral ecotoxicology	Avoidance, Burrowing, Feeding,	Amiard-Triquet et al. (2013)
	Population	Abundance, Size and age distribution, Sex ratio, imposex and intersex, Bioenergetics, Reproductive integrity	Amiard-Triquet et al. (2013), Bartell (2006)
Community level	Community	Species richness, Index of biotic integrity, Intolerant species, Feeding guilds	Bartell (2006)

477 우리나라의 경우에는 Session 1.1에서 기술한 바와 같이 연안환경을 평가하
478 기 위해 주로 연안의 수질 및 퇴적물, 생물체 내 오염물질 축적 정도를 평가하여
479 왔다. 최근 어류의 생체지표를 이용한 연안환경평가 (Jung et al., 2008; 2009; 2011)가
480 시도 된 바 있으나, 고착성의 해산 이매패류의 생체지표를 이용한 연안환경 평가
481 는 아직 제한적인 실정이다.

482 따라서 이 연구에서는 향후 연안환경 모니터링 프로그램에 적합한 생체지
483 표 개발의 기초자료를 제공하고자, 조간대에 서식하는 굴의 생리학적 요인의 변
484 화를 조사하였다. 이때, 굴과 같은 이매패류는 번식주기에 따른 생리반응이 다르
485 기 때문에, Part 2에서는 우선 서식지 환경이 굴의 번식생리학적 요인의 변화에 어
486 떠한 영향을 끼치는지 조사하였다. Part 3에서는 번식생리학적 요인을 배제하기 위
487 해, 산란이 완료되는 시기에 굴의 생리학적 요인 변화를 조사함으로써, 서식지의
488 환경이 굴의 생리학적 요인 변화에 어떠한 영향을 끼치는지 조사하였다.

489

490 **Part 2**

491 **Reproductive effort of the wild Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in**

492 **Gwangyang bay and Jinhae bay off the southern coast of Korea associated**

493 **with their habitat**

494

495 **Abstract**

496 Southern coast of Korea is composed by a lot of the typical semi-closed bay. These
497 small bays are surrounded by large scale of harbor, industrial complex and big cities.
498 Therefore, sessile benthic animals are continuously exposed by anthropogenic activities. In
499 this study, to investigate the reproductive variations of wild Pacific oyster, *Crassostrea gigas*
500 according to the habitat, we selected 15 sites from inner to outer bay of Gwangyang and
501 Jinhae bay in southern coast of Korea in June 2010. Thirty oysters from each site were
502 analyzed physiological parameters as condition index, proximate biochemical composition,
503 gonad developmental stages and digestive gland atrophy. Reproductive effort of the oysters
504 was estimated using indirect enzyme-linked immunosorbent assay. To survey the correlation
505 between environmental factors and reproductive variations, principal coordinates (PCO)
506 analysis was conducted. From the results, there could be separate into 3 groups from inner to
507 outer bay of Gwangyang bay. Particularly, from the PCO analysis, environmental factors of
508 Chonam Bridge in inner bay as PBDEs, DDT, Chl-a and Silicates were negatively affected to
509 their environment. At that time, reproductive indices as egg mass and total carbohydrates
510 contents were lower than outer bay. Especially, the oysters from Chonam bridge produced 5.2
511 times lower eggs than the oysters collected from Janghang in outer bay. In case of Jinhae bay,
512 there also could be divided as 4 groups from inner to outer bay. From the PCO analysis, the
513 environmental factors such as Nitrate, DIN, DO and pH affect to the egg mass and total
514 carbohydrates contents. Our results indicated that inner bay environment as persistent organic
515 pollutants and poorer water quality could affect negatively to the oyster physiology and
516 reproductive biology. Consequently, the physiological and reproductive biological parameters
517 of oysters could be used as useful biomarker in monitoring program to assess the coastal
518 environment.

519 **Key words:** Coastal environment, Wild Pacific oyster, Reproductive effort, Helth status

520 **1. Introduction**

521 굴 (*Crassostrea gigas*)은 한국 및 중국, 일본 등 아시아 지역에서부터 1920
522 년대 북아메리카로, 1960년대 유럽으로 이식되는 등, 아열대부터 아한대 지역까지
523 전세계 해역에 고루 분포하는 종이다 (FAO, 2015; Kennedy et al., 1996; Ruesink et al.,
524 2005). 또한, 빠른 성장과 넓은 범위의 환경 내성을 갖는 장점이 있어 전세계적으
525 로 양식이 활발히 진행 되고 있으며, 연간 양식굴의 생산량은 약 460만톤 (FAO,
526 2013)에 육박하는 중요 단백질원이다. 우리나라는 동, 서, 남해 전 연안에 굴이 고
527 루 분포하고 있으며 (Min et al., 2004), 양식으로 생산하는 굴 생산량은 2014년 현
528 재 약 28만 3천톤으로 중국에 이어 세계 두 번째로 많은 양을 생산하고 있다
529 (KOSIS, 2014).

530 굴은 바지락, 담치 등 다른 주요 해산이매패류와 같이 고착성의 여과섭식
531 자로 수온, 먹이 및 서식장소와 같은 주변 환경 변화에 민감하게 반응한다
532 (Kennedy et al., 1996). 굴의 분포 범위가 넓은 만큼, 위도에 따른 굴의 번식생리 또
533 한 지역에 따라 다르게 관찰된 바 있다 (Cardoso et al., 2007; Hofmann et al., 1992;
534 Kennedy et al., 1996). 예를 들어 Cardoso et al. (2007)의 연구에 따르면, 프랑스 La
535 Rochelle에 서식하는 굴의 경우, 7~8월 산란활동이 관찰된 반면, 네덜란드 Texel에
536 서식하는 굴의 경우 6~7월, Yerseke에 서식하는 굴은 6~9월에 산란한다고 보고한

537 바 있다. 또한 대서양굴 (*C. virginica*)의 경우에도 미국의 Gulf 연안부터 Virginia
538 연안에 서식하는 대서양굴은 봄과 가을에 주 산란이 일어나고 여름철에 약한 산
539 란이 지속되는 지속산란 (continuous spawning)의 패턴을 갖고 있었다. 반면, 대서
540 양굴 서식의 북방 한계선에서는 여름철 일회 제한적으로 산란하였다 (Kennedy et
541 al., 1996). 해산이매패류의 번식생리는 수온뿐만 아니라 먹이량 및 질병, 오염 스
542 트레스 등에 따라 영향을 받는다 (Baek et al., 2014; Hofmann et al., 1992; Kang et al.,
543 2015; Mann, 1979). Baek et al. (2013)은 우리나라 곰소만 내만 (곰소항)과 외만 (하전)
544 의 두 지점에 서식하는 바지락을 조사한 결과, 클로로필 a 및 seston 등의 먹이환
545 경이 외만에서 더 높게 관찰되었고, 이때 하전에 서식하는 바지락이 배우체 생산
546 에 있어 한달 더 빨리 완숙하고, 산란활동이 일어나는 기간이 더 길었다고 보고
547 한 바 있다. 또한, Kang et al. (2015)은 동일 시기에 우리나라 위도가 다른 3지역의
548 바지락을 채집하였을 때, 그들의 생식소 발달 단계는 남쪽에 서식하는 바지락이
549 더 빨리 이뤄지는 것을 관찰 할 수 있었다. 주목할만한 점은 3지역에서 채집된
550 개체 중, 완숙기 (ripe stage)의 바지락 개체가 포란하는 양은 기생생물 (*Perkinsus*
551 *olseni*)의 감염이 높은 지역에서 더 적은 알을 생산하는 것을 관찰 할 수 있었다.
552 Chu et al. (2003)은 76일 동안 PCBs에 노출시킨 대서양굴 (*Crassostrea virginica*)의

553 번식생리를 조사한 결과, 높은 농도의 PCBs에 노출된 굴이 완숙란의 비율이 적어
554 지는 것을 관찰하였고, PCBs의 농도와는 상관없이 대조구에 비해 낮은 산란량을
555 보고한 바 있다.

556 우리나라 남해안은 리아스식 해안으로 많은 반폐쇄성 만으로 구성되어 있
557 으며, 이 만 주변으로 1960년대부터 중화학공업의 육성과 경제성장에 따른 제반
558 산업의 발전하면서 매립으로 인한 연안 변화, 대규모의 항구, 산업단지, 도시 등
559 이 연안환경에 영향을 끼치고 있다 (Cho et al., 2000; Jang et al., 2005; Kwak et al.,
560 2001; Lim et al., 2007). 광양만과 진해만은 남해안의 대표적인 반폐쇄성 만으로 예
561 로부터 굴, 홍합 등의 패류양식이 활발하게 이루어 지고 있으나, 주변에 대도시
562 및 제철소 및 국가산업단지, 대규모 항구 등이 있어 각종 가정 하수 및 공장폐수
563 등이 대량 유입되어 매년 적조가 발생하고 유기물 오염 및 빈산소수괴가 형성되
564 어 수산생물이 대량 폐사하는 사례가 종종 있다 (Hong, 1987; Kang and Lee, 1996;
565 Lee 1993; Yang et al., 1995). 특히, 광양만의 경우, 각종 산업시설에서 배출되는 폐기
566 물 양이 급증하여 해저 퇴적상 변화와 함께 저서환경의 생태계 변화를 초래하여
567 지난 1982년부터 “특별관리해역”으로 지정되어, 수질 및 퇴적물의 오염도를 평가
568 해 오고 있다 (Jang et al., 2005; Kang and Lee, 1996; Lim et al., 2007). 그러나 대부분의

569 연구가 수질 변화 및 퇴적물 내 유기화합물 혹은 중금속 오염도를 평가하였고
570 (Cho et al., 2000; Kang and Lee, 1996; Lee and Lee, 1983; Lim et al., 2007; Yang et al.,
571 1995), 연안환경에 따른 서식생물의 생리변화에 관한 연구는 아직 미진한 실정이
572 다.

573 이 연구에서는 광양만과 진해만 15개 지역 조간대에 서식하는 굴의 번식
574 생리학적 변화에 관한 연구를 수행하여, 내만에서 외만으로 굴의 서식지역이 번
575 식생리에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 수행되었다.

576

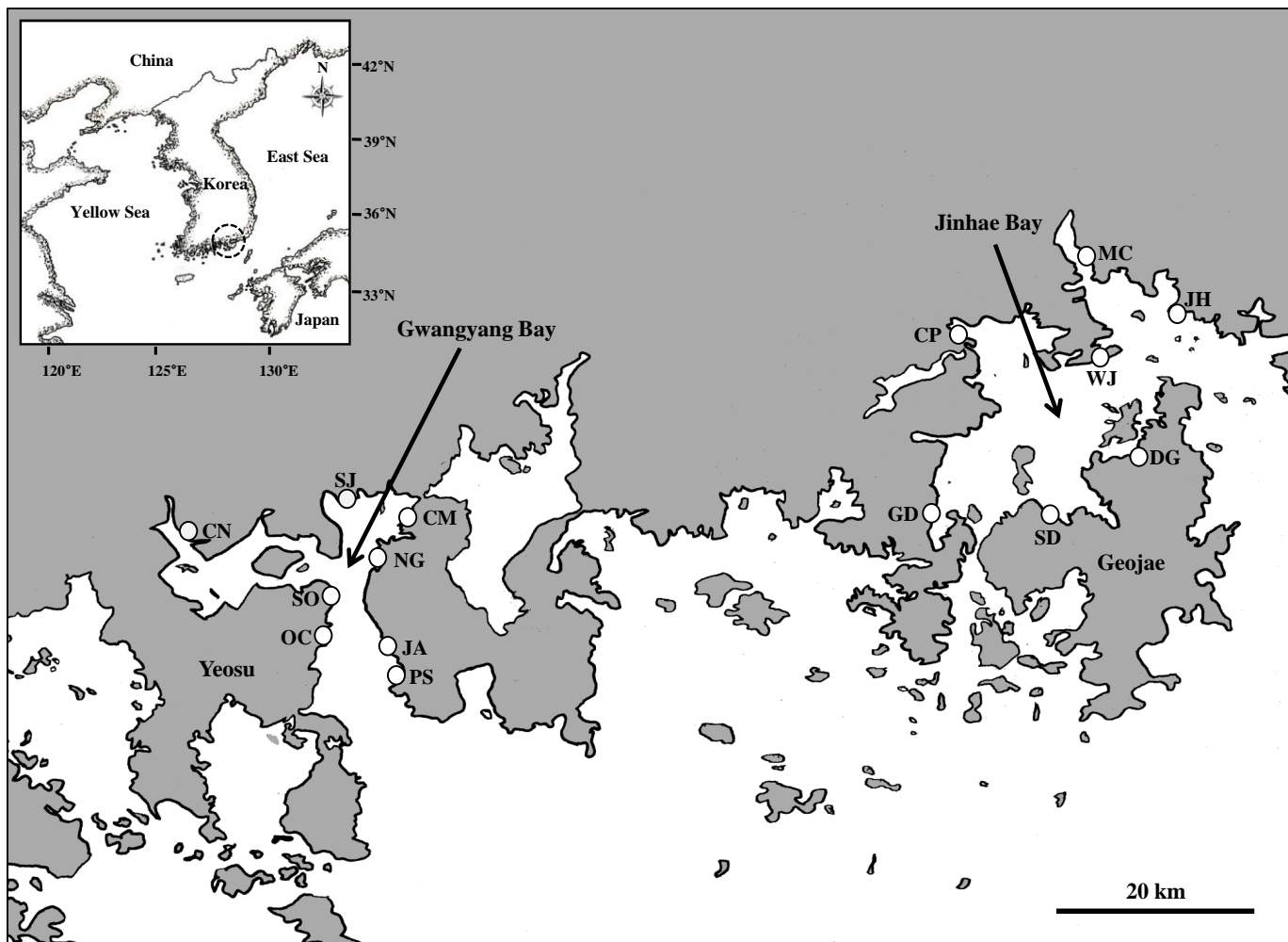
577 **2. Materials and methods**

578 **2.1. Sampling effort and condition index**

579 서식지에 따른 굴의 번식생리학적 변화를 알아보기 위해, 2010년 6월 광양
580 만과 진해만의 내만에서 외만까지 총 15개 정점 (Fig. 2-1 and Table 2-1) 조간대에
581 서식하는 굴을 채집하였다. 채집된 굴은 실험실로 옮겨와 30개체씩 무작위로 선
582 별하여 각고 (shell height, mm)와 총부피 (total volume, ml)를 측정된 후, 개각하여
583 습중량과 패각부피를 측정하였다. 이후, 조직학적 관찰을 위해, 생식소와 아가미,
584 소화맹낭을 포함하는 굴의 육질부 중앙부위 5 mm 두께의 조직을 절취하였고, 남
585 은 잔여조직을 -75°C에 동결 후, 동결건조하여 건중량을 측정하였다. 비만도는 다
586 음과 같은 식에 의해 구하였다.

587 비만도 = 건중량 (g)/패각내부피 (ml)*

588 *패각내부피 = 총부피 (ml) - 패각부피 (ml)



589

590 **Fig. 2-1.** Location of the sampling sites. Wild oysters were collected from 8 sites in Gwangyang bay and 7 sites in Jinhae bay.

591

592 **Table 2-1.** Description of geography of the sampling sites.

Site	Description	
Gwangyang Bay	Pyeongsan-ri (PS)	Inside of harbor, mud and cobblestone bottom
	Janghang (JA)	Cobblestones beach
	Nogoo-ri (NG)	Near harbor, muddy bottom
	Chamyeon-ri (CM)	Inside of small bay, mud and cobblestone bottom
	Seomjin bridge (SJ)	Estuary of Seomjin river, rocky bottom, near the industrial complex
	Chonam bridge (CN)	Estuary of Gwangyang west stream, mud and rocky bottom, surrounded by industrial complex
	Sindeok-ri (SO)	Near harbor, mud and cobblestone bottom
Jinhae Bay	Ohcheon-dong (OC)	Cobblestones beach
	Jinhae harbor (JH)	Inside of small harbor, near the industrial harbor, rocky and cobblestones bottom
	Machang bridge (MC)	Surrounded by industrial complex, rocky bottom
	Wonjeon harbor (WJ)	Outside of small bay, sand and cobblestones beach
	Changpo-ri (CP)	Near the small harbor, rocky shore
	Gwangdo-myeon (GD)	Outside of small bay, rocky and cobblestones bottom
	Sadeung-myeon (SD)	Inside of small harbor, sandy mud and cobblestones bottom
Deokgok-ri (DG)	Inside of small bay, sandy mud and cobblestones bottom	

593 2.2. Biochemical composition

594 체조직 조성분 분석은 총단백질 함량과 총탄수화물 함량을 분석하였다. 총
595 단백질 함량 분석은 Ojea et al. (2004)와 Park et al. (2006)의 방법을 응용하여 분석하
596 였다. 동결건조 된 굴 분말 시료에 0.1 M NaOH를 혼합하여 37°C에서 2시간 동안
597 반응시켰다. 반응이 완료된 혼합액은 원심분리하여 상등액을 취한 후, BCA protein
598 assay kit (Pierce)를 이용해 562 nm에서 단백질의 흡광도를 측정하였다. 이때, Bovine
599 serum albumin (BSA)를 표준시료로 사용하여 표준시료의 농도와 흡광도의 상관관
600 계식을 산출한 후, 각 개체의 총 단백질 함량을 산출하였고, 이후 표준동물의 총
601 단백질 함량 계산에 사용되었다. 총탄수화물 분석은 Dubois et al. (1956)의 방법을
602 응용하여 실시하였다. 동결건조된 굴 분말 시료에 15% trichloroacetic acid를 혼합하
603 여 4 °C에서 1시간 동안 반응시켜 탄수화물을 추출하였다. 추출액은 원심분리하
604 여 상등액을 취한 후, 페놀과 황산 용액을 첨가하여 반응 시킨 후, 490 nm에서 흡
605 광도를 측정하였다. 표준물질은 dextrose anhydrate를 사용하였고, 표준물질의 농도
606 와 흡광도와의 상관관계식으로부터 각 개체의 총 탄수화물 함량을 산출하고, 이
607 를 표준동물의 총 탄수화물 함량 계산에 이용하였다.

608

609

610 **2.3. Reproductive effort**

611 굴의 포란량 조사는 Kang et al. (2003)이 개발한 참굴 난단백질 특이적인
612 항체를 이용하여, Kang et al. (2003)과 Mondol et al. (2012)의 방법에 따라 indirect
613 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용하여 측정하였다. 광양만과 진해
614 만 15 지역에서 채집된 굴 중, 조직학적 관찰을 통해 암컷으로 판별된 개체만 분
615 석에 사용하였다. 100 mg의 조직 분말을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액
616 과 혼합하고 초음파 파쇄기로 균질화 하여 항원 단백질을 준비하였다. 포란량 조
617 사를 위한 표준시료는 굴 알 단백질을 0.01–5.8 µg의 농도 구배로 준비하였다. 준
618 비된 각 시료 항원 단백질과 표준물질을 96 well ELISA plate에 분주하고 4 °C에서
619 12시간 동안 반응시켜 plate에 코팅하였다. 이 plate에 참굴 난단백질 특이적인 항
620 체 (Kang et al., 2003, 6.0 µg/ml)를 1차항체로 반응시키고, 1차 항체를 인지하는 2차
621 항체로 goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated (1 µg/ml)를 사용하였다. 이
622 후, 발색기질로 p-nitrophenylphosphate를 반응시켜 405 nm에서 발색된 정도를 측정
623 하였다. 굴의 생식소중량지수 (gonad somatic index, GSI,%)는 indirect-ELISA로 측정
624 된 난 단백질 농도와 흡광도의 log 상관관계식을 이용하여 암컷 개체 시료 내 난
625 단백질 량을 계산하고, 단백질 상수 2.2 (Kang et al., 2003)를 곱하여 개체 내 알의
626 무게를 산정하였다. 각 개체의 알 무게는 표준 동물의 알 무게로 환산하여 나타

627 내었다.

628

629 **2.4. Standard animal**

630 광양만과 진해만 15개 지역에서 채집된 굴의 크기 차이에 따른 오차를 최
631 소화하기 위해, 전체 굴 시료의 평균 각고 60.9 mm에 대한 건중량을 표준화 하였
632 고, 이 건중량 값에 독립적으로 굴 체내 단백질과 탄수화물 및 알 무게의 값 변
633 화를 평가하였다. 굴 채집 지역별 각고에 대한 건중량의 상대 측정식은 로그 변
634 형 (\log_{10} 건중량에 대한 \log_{10} 각고)를 실시하여 일반성장식인 직선회귀분석식
635 $Y=aX^b$ (X: 분석시료의 평균 각고, a: 상관관계상수, b: 상관관계식 기울기)를 이용
636 하여 산출하였다. 산출된 건중량의 절대값은 동일 일반성장식에 대입하여 총단백
637 질, 총탄수화물 및 알 무게 산출에 이용되었다. 산출된 총단백질, 총탄수화물 및
638 알 무게는 $\text{mg/standard animal(STD animal)} \pm 95\% \text{ confidence index}$ 로 표기하였다.

639

640 **2.5. Histological preparation**

641 배우자 형성 과정 및 소화맹낭 위축도, 질병 관찰을 위해 Howard and
642 Smith (1983) 의 방법에 따라 조직 슬라이드를 제작하였다. 굴의 소화맹낭, 생식소
643 를 포함하는 육질 중앙부위 5 mm 두께로 절취된 조직은 Davidson's solution에 24
644 시간 동안 고정 후, 70% 알코올에 24시간 동안 치환하였다. 이후, 단계별 알코올

645 탈수 과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 조직 블록을 제작하였고, 마이크로톰을 이
646 용하여 6 μm 두께로 절삭하여 조직 슬라이드를 제작하였다. 제작된 조직슬라이
647 드는 Hematoxyline 과 Eosin Y로 비교 염색 후 광학현미경 하에서 검경하였다.

648

649 **2.6. Gametogenesis and digestive gland atrophy**

650 굴의 생식소 발달 단계 판정은 Kennedy et al. (1996)와 Mondol et al. (2012)의
651 방법에 따랐다. 굴 생식소의 임의의 5 지점을 선정하여, 여포 내 배우자의 성숙정
652 도에 따라 미성숙기, 초기발달기, 후기발달기, 완숙기, 부분산란기, 산란후기의 6
653 단계로 나누어 판단하였고, 5 지점의 평균값을 그 개체의 생식소 발달 단계로 결
654 정하였다. 소화맹낭 위축도는 Kang et al. (2010)와 Jeung et al. (2012)의 방법에 따라
655 판정하였다. 소화맹낭 내 임의의 5 지점을 선정하여, 소화맹낭이 팽 찬 상태
656 (score 0)부터 소화맹낭의 빈 공간이 최대인 상태 (score 4)로 나누어 판단하였고, 5
657 지점의 평균값을 그 개체의 위축도 지수로 결정하였다.

658

659 **2.7. Environmental factor**

660 이 연구에서는 굴의 채집 현장에서 수질 및 퇴적물의 환경요인 조사가 동
661 시에 수행되지 못하였다. 따라서 조사된 번식생리학적 연구 결과와 환경요인과의
662 상관관계를 분석하기 위해, 한국해양과학기술원의 “남해 특별관리해역 생태계 건

663 강지수 개발” 연구 보고서 (한국해양연구원, 2010)에 수록된 수질 및 퇴적물 분석
664 결과를 인용하였다. 굴의 채집시기와 가장 근접한 시기에 분석된 2010년 5월에
665 조사된 결과를 인용하였으며 (Table 2-2), 굴 채집 장소와 가장 가까운 지점의 환
666 경요인 분석 데이터를 이용하였다. 광양만의 경우, 수질 및 퇴적물 분석 자료를
667 환경요인으로 인용하였으며, 진해만의 경우에는 수질 분석 자료를 인용하였다.
668

669 **Table 2-2.** Environmental parameters of the seawater and sediment measured by MEHI report (2010).

Sampling site	Site No. from MEHI report (2010)	Nitrate μ mol/L	DIN μ mol/L	Silicate μ mol/L	Chl-a μg/L	TOC mg/L	DO mg/L	pH	16 PAHs ng/g dw	Alkyl PAHs ng/g dw	PCBs ng/g dw	DDT ng/g dw	HCHs ng/g dw	PBDEs ng/g dw	NPs ng/g dw	BT Sn/g dw	TOC %
<i>Gwangyang Bay</i>																	
PS	19	0.5	5	6	2	1.8	8.5	8.1	35	230	0.22	0.12	0	0.2	2	120	0.85
JA	18	0.5	5	5	2	1.8	8.5	8.1	50	50	0.14	0.09	0.16	0.1	20.5	105	0.7
NG	14	10	10	10	3	1.8	8.5	7.8	20	20	0.03	0.06	0.08	0.1	3.8	85	0.7
CM	12	20	15	20	4.6	1.6	8.5	7	50	35	0.16	0.1	0	0.2	8	100	1.4
SJ	10	41.5	25	59.5	3	1.4	8.5	7.56	60	30	0.08	0.04	0.01	0.3	1.2	160	1.2
CN	1	0.5	0.5	3	4	1.8	8.5	8	45	50	0.06	0.37	0	1.7	8.2	105	1.25
SO	15	5	0.5	6	3	2	8.5	8.1	50	30	0.04	0.07	0.01	0.4	3	180	1.2
OC	17	5	0.5	6	3	2	9.6	8.1	20	20	0.03	0.05	0	0.1	5	90	1.25
<i>Jinhae Bay</i>																	
JH	6	10	10	5	10	3	11.8	7.6									
MC	2	1.5	1.5	25	10	3	9	7.6									
WJ	9	1.5	1.5	3.5	3	1.9	6	7.8									
CP	11	1.5	1.5	3	3	1.7	8	7.7									
GD	16	1.5	1.5	3	3	1.7	8.5	7.7									
SD	18	1.5	1.5	3	3	1.5	8.5	7.8									
DG	23	1.5	1.5	3	3	1.6	8.5	7.8									

670

671

672 **2.8. Statistics analysis**

673 각 지역별 굴의 번식생리 분석 항목은 one-way ANOVA 분석을 통해 유의
674 성 검정을 하였고, Duncan test를 통해 $p < 0.05$ 수준에서 유의차를 나타내었다. 이후,
675 환경요인과 굴의 번식생리 변화와의 상관관계를 분석하기 위해 주좌표분석
676 (Principal coordinates analysis, PCO)을 PRIMER software (version 6.1)을 이용하여 다음
677 과 같이 수행하였다. 우선, 광양만과 진해만의 환경요인 데이터를 $\log(X+1)$ 형태
678 로 변환하여주고, 정규화 (normalization) 한 후 Euclidean distance 분석을 통해 지역
679 간 유사성 (resemblance) 및 군집분석 (clustering)을 실시하고, SIMPER 검정을 통해
680 지역간 유사도를 평가하였다. 환경요인의 지역간 유사성 분석 결과 묶인 지역그
681 룹을 기준으로 번식생리학적 분석 결과의 PCO 분석을 실시하였다. 번식생리학적
682 데이터의 경우에는 $\log(X+1)$ 변환 후 Bray-Curtis similarity 분석을 통해 지역간 유
683 사성 및 군집분석을 실시하였다. 이후, 번식생리학적 데이터의 군집 분석 결과에
684 환경요인 데이터를 병합하여 PCO 분석을 실시하였고, PCO 분석 결과에 영향을
685 미치는 요인의 방향성 (vector)을 표기하였다.

686

687 **3. Results**

688 **3.1. Condition index**

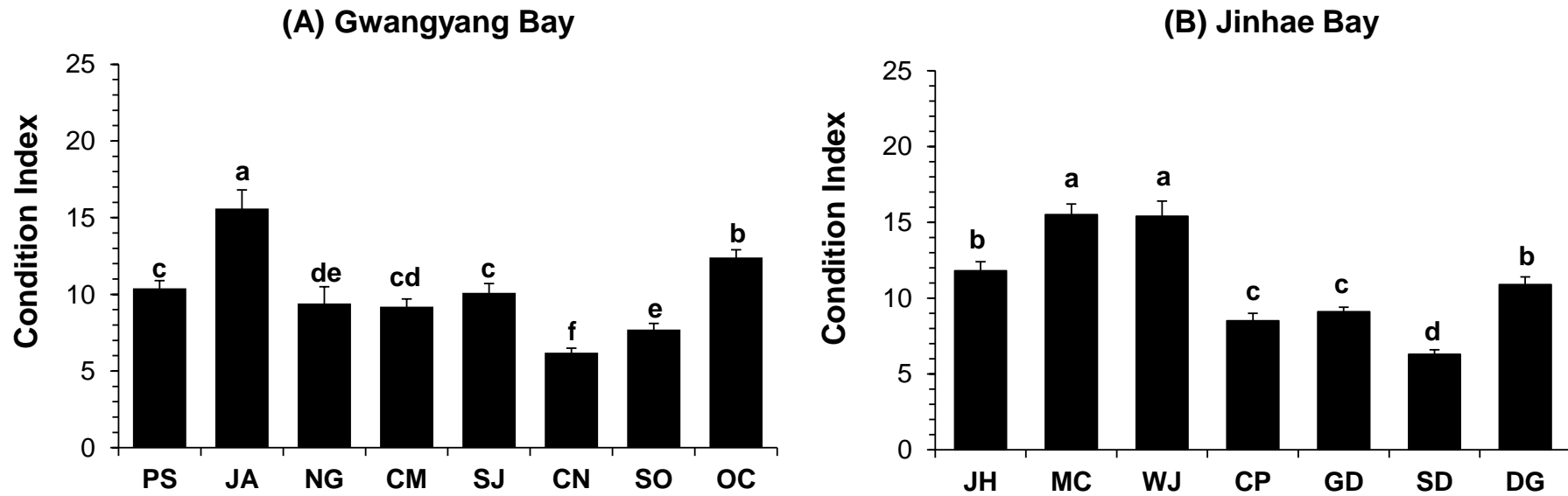
689 2015년 6월 광양만과 진해만 조간대에서 채집된 굴 중 가장 큰 개체를 선

690 별하였을때, 그 크기는 Table 2-3에서 보는 바와 같다. 광양만에 서식하는 굴의 경
691 우, 각고의 범위가 53.6 ± 0.9 (섬진대교)- 73.0 ± 1.6 (평산리) mm, 건중량의 범위가
692 0.5206 ± 0.030 (초남대교)- 1.6757 ± 0.135 (평산리) g 으로 지역별 그 크기가 달랐으며
693 내만이 외만에 비해 크기와 무게가 적었다. 진해만의 경우에도 각고의 범위가
694 54.4 ± 1.3 (진해항)- 69.5 ± 1.6 (광도면) mm, 건중량의 범위가 0.4710 ± 0.058 (사등면)-
695 1.8087 ± 0.205 (원전항) g 으로 조사되었으며 내만이 외만에 비해 무게가 작은 경
696 향을 관찰 할 수 있었다. 굴의 생리학적 상태를 나타내는 비만도는 Fig. 2-2에서
697 보는 바와 같이, 광양만 제일 내만에 있는 초남대교 (6.2 ± 0.3)와 진해만 내만의
698 창포리 (8.5 ± 0.5), 광도면 (9.1 ± 0.3), 사등면 (6.3 ± 0.3)에 서식하는 굴의 비만도가
699 외만에 위치한 굴에 비해 유의적으로 낮게 조사되었다.

700 **Table 2-3.** Shell height and tissue dry weight of the oysters examined in this study. N: number of oysters, SE: standard error.

Site	N	Shell Height (mm)	Tissue Dry Weight (g)	
		Mean \pm SE	Mean \pm SE	
Gwangyang Bay	Pyeongsan-ri (PS)	30	73.0 \pm 1.6	1.6757 \pm 0.135
	Janghang (JA)	30	58.7 \pm 1.2	1.3472 \pm 0.088
	Nogoo-ri (NG)	30	54.0 \pm 1.3	0.8933 \pm 0.040
	Chamyeon-ri (CM)	30	69.7 \pm 1.4	0.9007 \pm 0.060
	Seomjin bridge (SJ)	30	53.6 \pm 0.9	0.7695 \pm 0.040
	Chonam bridge (CN)	30	58.7 \pm 1.4	0.5206 \pm 0.030
	Sindeok-ri (SO)	30	67.5 \pm 1.5	0.9872 \pm 0.060
	Ohcheon-dong (OC)	30	53.9 \pm 1.4	1.2145 \pm 0.071
Jinhae Bay	Jinhae harbor (JH)	30	54.4 \pm 1.3	1.1810 \pm 0.076
	Machang bridge (MC)	30	58.2 \pm 1.2	1.7645 \pm 0.118
	Wonjeon harbor (WJ)	30	56.7 \pm 1.0	1.8087 \pm 0.205
	Changpo-ri (CP)	30	57.3 \pm 1.3	0.7571 \pm 0.047
	Gwangdo-myeon (GD)	30	69.5 \pm 1.6	1.3426 \pm 0.083
	Sadeung-myeon (SD)	30	62.6 \pm 1.5	0.7410 \pm 0.058
	Deokgok-ri (DG)	30	65.2 \pm 1.4	1.3755 \pm 0.095

701



702

703 **Fig. 2-2.** Condition index of the oysters collected from Gwangyang (A) and Jinhae (B) bay. Data expressed as mean ± standard error, ANOVA;

704

$p < 0.05$.

705

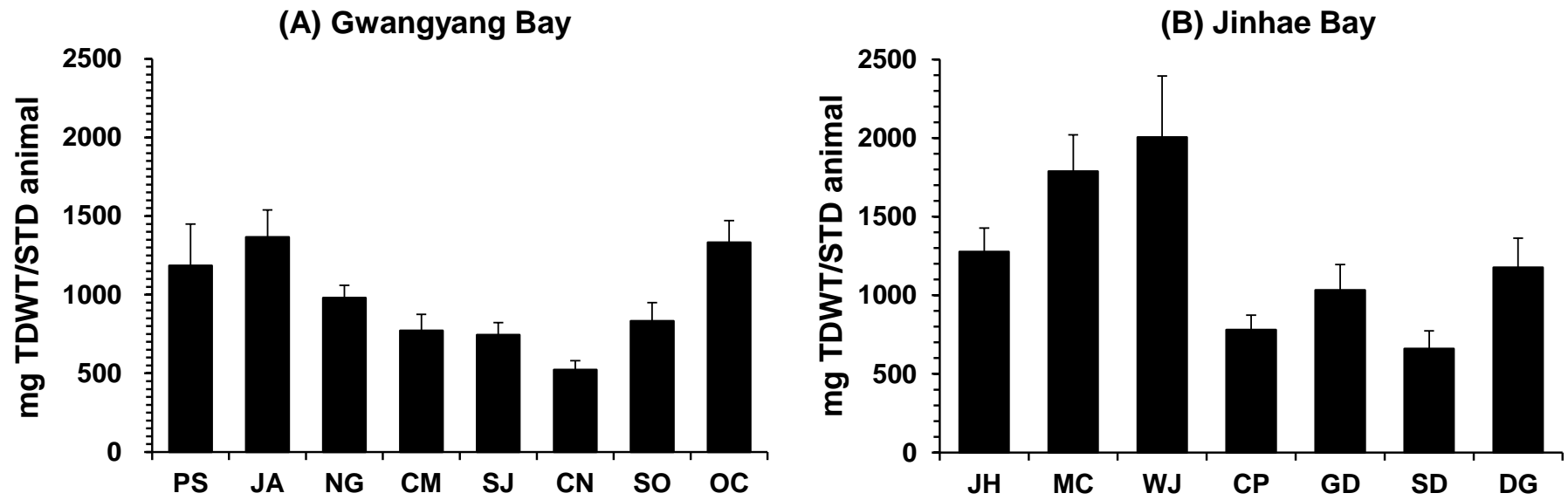
706 **3.2. Tissue dry weight and gross biochemical compositions of standard animal**

707 크기에 따른 생리학적 차이를 최소화하기 위해, 표준동물 (각고 60.9 mm)
708 에 대한 각 지역별 건중량을 측정하였다 (Fig. 2-3). 광양만의 경우, 0.5221 ± 0.103
709 (초남대교)- 1.3664 ± 0.173 (장항) g 범위로 내만에 위치한 초남대교에서 가장 낮은
710 무게를 보였다 (Fig. 2-3A). 진해만의 경우에도 0.6605 ± 0.114 (사등면)- $2.0050 \pm$
711 0.390 (원전항) g 의 범위로 내만의 사등면, 창포리 (0.7803 ± 0.093 g) 굴의 무게가
712 낮게 조사되었다 (Fig. 2-3B).

713 내만이 외만에 비해 분석항목의 값이 낮게 조사되는 현상은 총단백질과
714 탄수화물량에서도 동일하게 조사되었다. 광양만 굴의 체내 총단백질 함량은 $179 \pm$
715 15.0 (초남대교)- 441.1 ± 10.0 (평산리) mg/STD animal의 범위로 (Fig. 2-4A), 내만의 초
716 남대교에서 가장 낮게 조사되었다. 진해만 굴 체내 총단백질 함량은 216.7 ± 13.9
717 (사등면)- 708.7 ± 25.8 (원전항) mg/STD animal의 범위로 (Fig. 2-4B), 내만의 사등면과
718 창포리 (281.6 ± 11.2 mg/STD animal)에서 낮게 조사되었다.

719 체내 탄수화물량 또한 총단백질 함량과 같이 내만에서 낮은 탄수화물 함
720 량을 보였다 (Fig. 2-5). 광양만의 경우, 내만의 초남대교에 서식하는 굴이 $61.1 \pm$
721 15.6 mg/STD animal로 가장 낮은 탄수화물 함량을 갖는 것으로 조사되었고, 장항
722 에 서식하는 굴의 체내 탄수화물 함량이 241 ± 16.1 mg/STD animal로 가장 높았다

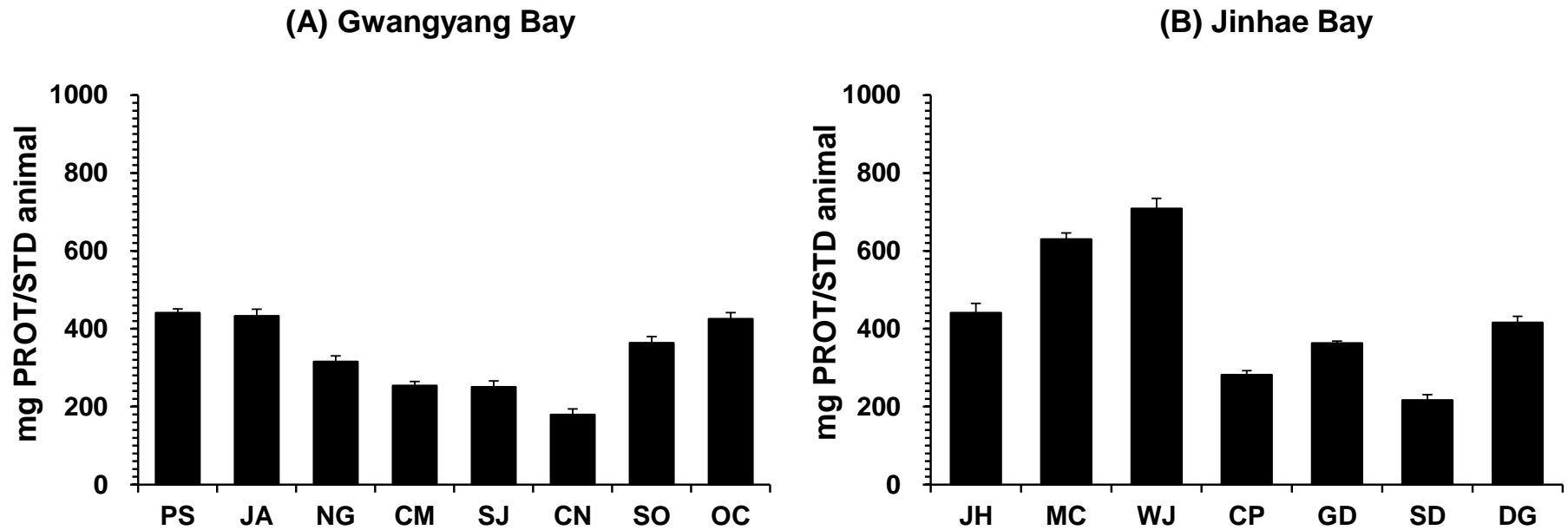
723 (Fig. 2-5A). 진해만의 경우에도 내만에 위치한 창포리 (76.3 ± 15.2 mg/STD animal)
724 와 사등면 (81.1 ± 17.8 mg/STD animal)에서 낮은 체내 탄수화물 함량을 보였고, 마
725 창대교 (265.3 ± 20.6 mg/STD animal)에서 가장 높은 체내 탄수화물 함량을 보였다
726 (Fig. 2-5B).



727

728 **Fig. 2-3.** Tissue dry weight of the standard animal (60.9 mm SH) examined in this study. Data expressed as mean ± 95% confidence interval.

729

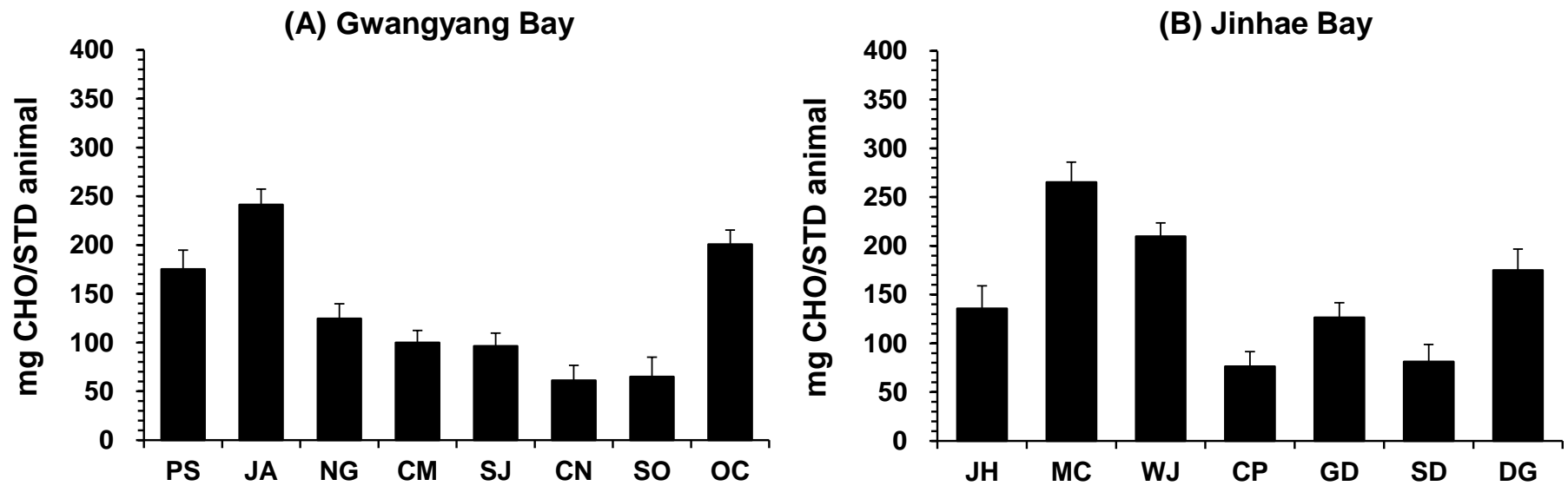


730

731 **Fig. 2-4.** Total protein content of the standard animal (60.9 mm SH) measured in this study. Data expressed as mean \pm 95% confidence

732 interval.

733



734

735 **Fig. 2-5.** Total carbohydrate composition of standard animal (60.9 mm SH) assessed in this study. Data expressed as mean \pm 95% confidence

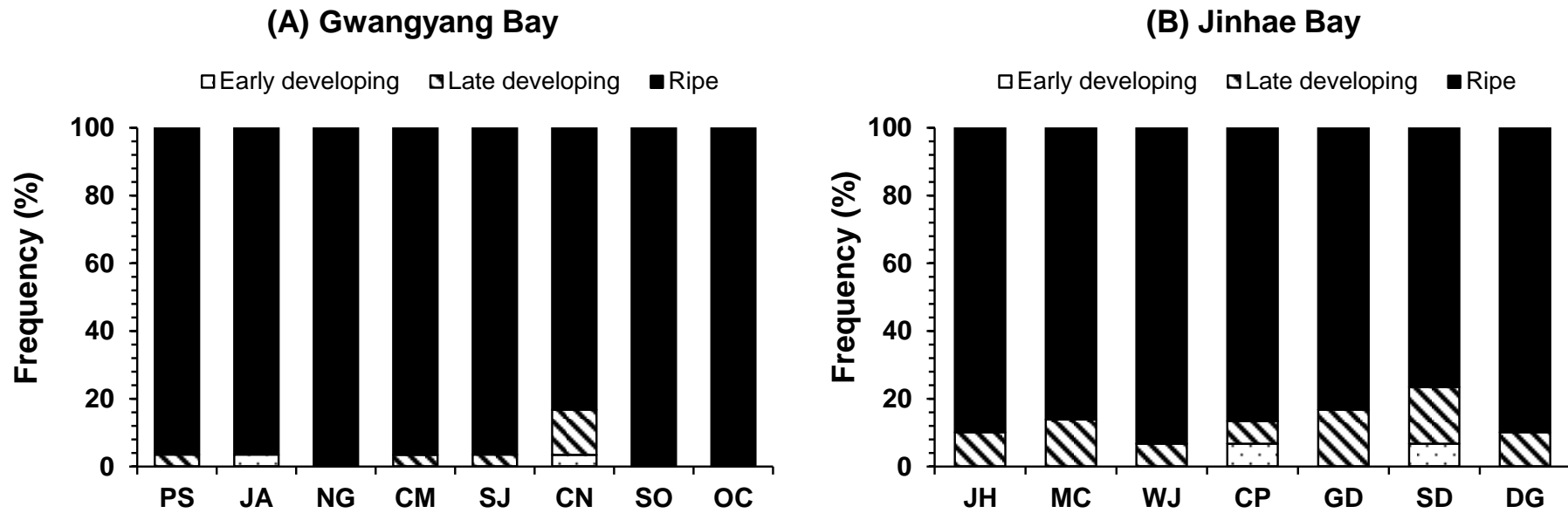
736

interval.

737 **3.3. Gonad development and reproductive effort**

738 조직학적 관찰 결과, 2010년 6월 광양만과 진해만에 서식하는 굴의 생식소
739 발달단계는 Fig. 2-6에서 보는 바와 같다. Figure 2-6A에서 보는 바와 같이 광양만의
740 경우, 초남대교를 제외한 지역의 굴이 대부분 완숙기 상태임을 알 수 있다. 진해
741 만에 서식하는 굴의 경우에는 광양만에 서식하는 굴에 비해 다소 늦은 생식소 발
742 달단계를 보였지만 80%이상의 굴이 완숙기 상태였다 (Fig. 2-6B).

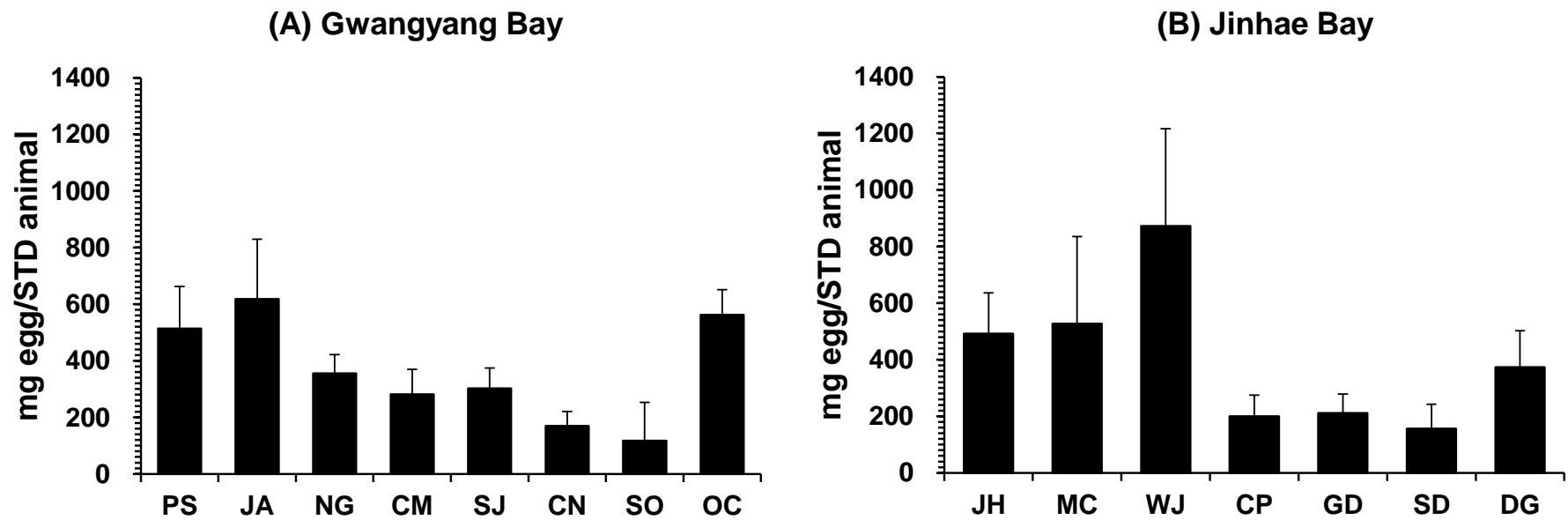
743 조직학적 관찰에서 대부분의 굴이 동일하게 완숙기였음에도, 실제 포란하
744 는 양은 지역별로 다른 것으로 조사되었다 (Fig. 2-7). 각 지역별 표준동물 (각고
745 60.9 mm)에 대한 알의 무게를 산출하였을 때, 광양만의 경우, 신덕리에 서식하는
746 굴이 117.3 ± 135.3 mg/STD animal로 가장 적게 알을 생산하였다 (Fig. 2-7A). 광양만
747 내만에 위치한 초남대교에 서식하는 굴의 경우에는 신덕리 다음으로 적은 $169.3 \pm$
748 50.9 mg/STD animal을 생산하였고, 외만의 장항에 서식하는 굴은 617.9 ± 211.3
749 mg/STD animal을 생산하여 가장 많은 알을 생산하는 것으로 조사되었다. 진해만
750 의 경우에도, 내만의 사등면 (156.6 ± 86.0 mg/STD animal)과 창포리 (199.8 ± 74.7
751 mg/STD animal)에 서식하는 굴이 알을 적게 생산하였고, 외만의 원전항에 서식하
752 는 굴이 872.1 ± 344.5 mg/STD animal로 가장 많은 알을 생산하였다 (Fig. 2-7B).



753

754 **Fig. 2-6.** Frequency distribution of gonad developmental stages of oysters examined in this study.

755



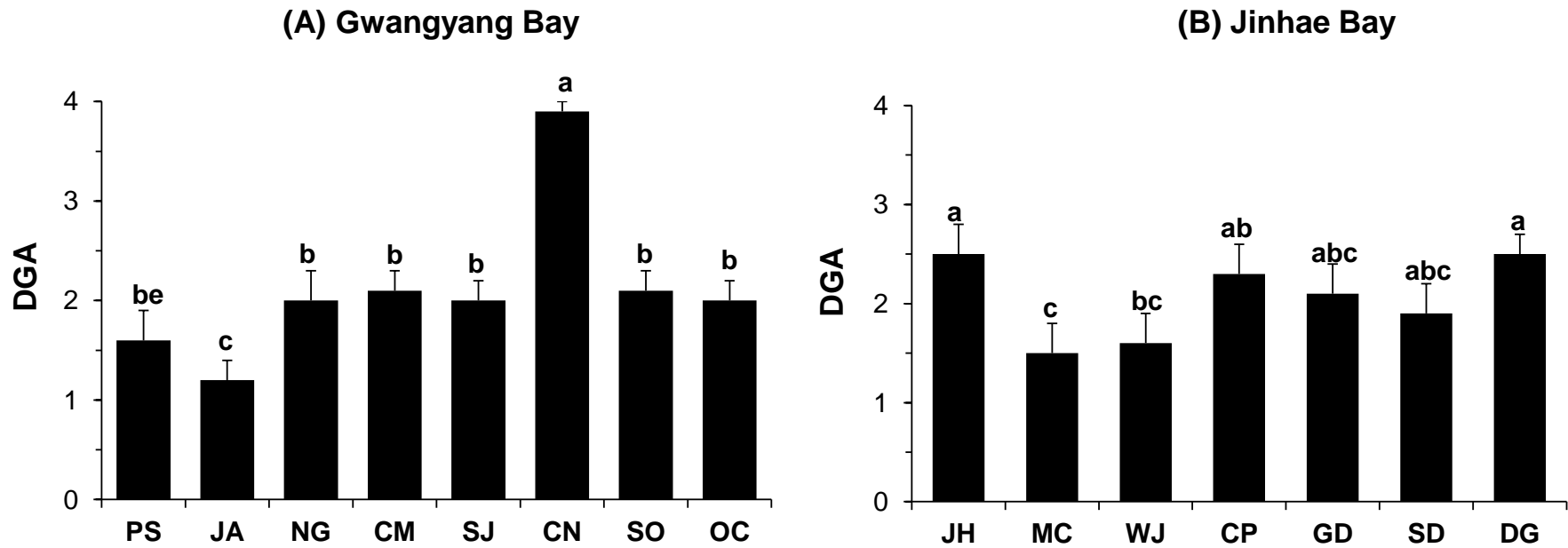
756

757 **Fig. 2-7.** Egg mass of the standard animal (60.9 mm SH) assessed in this study. Data expressed as mean \pm 95% confidence interval.

758

759 **3.4. Digestive gland atrophy**

760 소화맹낭 위축도는 해산이매패류의 먹이섭취 상태 혹은 환경적 요소의 영
761 향에 의해, 조직 시료 내 소화선의 두께, 소화선내의 공간을 0 에서 4 단계로 나
762 늘 수 있다. 이때, 0단계에 가까울수록 영양상태가 좋은 것이고, 4단계에 가까울수
763 록 영양결핍 혹은 스트레스를 받은 상태이다. 2015년 6월 채집된 광양만, 진해만
764 에 서식하는 굴의 조직학적 관찰 결과, 광양만 내만의 초남대교에서 3.9 ± 0.1 의
765 높은 위축도 상태를 관찰 할 수 있었고, 나머지 지역에서는 평균 1.2-2.5의 위축도
766 지수로 관찰되었다 (Fig. 2-8).



767

768 **Fig. 2-8.** Digestive gland atrophy of the oysters collected from Gwangyang and Jinhae bay in June 2010. Data expressed as mean ± standard

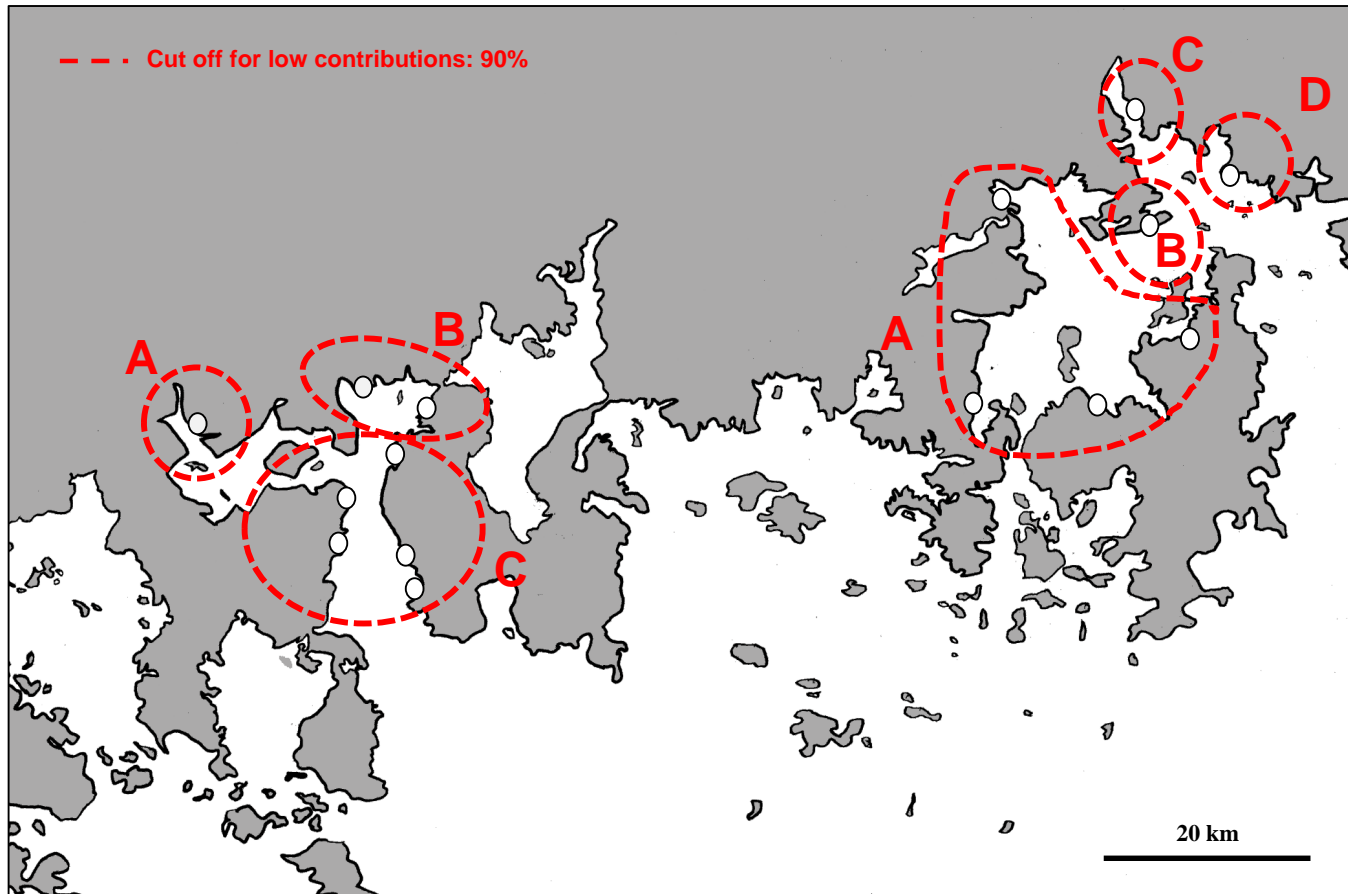
769 error, ANOVA, $p < 0.05$.

770

771 **3.5. Principal coordinates (PCO) analysis**

772 광양만과 진해만의 서식지역의 유사성을 확인하기 위해, 한국해양과학기술
773 원의 남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발 연구보고서 (한국해양연구원, 2010)
774 에서 인용한 환경 자료를 기준으로, D1 Euclidean distance 분석을 실시한 결과, Fig.
775 2-9와 Fig. 2-10, Fig. 2-11에서와 같은 지역그룹으로 구분할 수 있었다. 번식생리학
776 적 분석 결과를 기준으로 Bray-Curtis similarity 분석 결과, 환경 자료를 기준으로
777 Euclidean distance 분석 결과와 다소 차이가 있었으나, 지역그룹의 구분은 동일하
778 였다 (data not shown). 광양만의 경우, 내만의 초남대교와 섬진강 주변의 섬진대교
779 와 차면리, 광양만 외만의 5개 조사 지역의 3개 지역그룹으로 구분할 수 있었다
780 (Fig. 2-9와 Fig. 2-10). 이와 같은 지역그룹 구분에 기여하는 상위 3개 요인을 확인
781 하기 위해 SIMPER test를 통해 확인하였고, 그 결과는 Table 2-4에 정리하였다. 광
782 양만 내만 해역과 외만 해역의 환경요인의 차이는 PBDEs 및 DDT와 같은 유기오
783 염물질과 Chl-a 및 Silicate와 같은 영양염류의 차이에 기인한 것으로 확인되었다.
784 또한 내만과 외만의 번식생리학적 차이는 Egg mass, 총탄수화물, 총단백질 및
785 DGA의 차이에 기인된 것으로 확인되었다. 진해만의 경우에는 마산만 주변의 진
786 해항, 마창대교와 원전항이 독립적인 지역그룹으로 구분되었고, 나머지 진해만 내
787 만의 4개 지역이 하나의 그룹으로 구분되었다 (Fig. 2-9와 Fig. 2-11). 진해만의 지

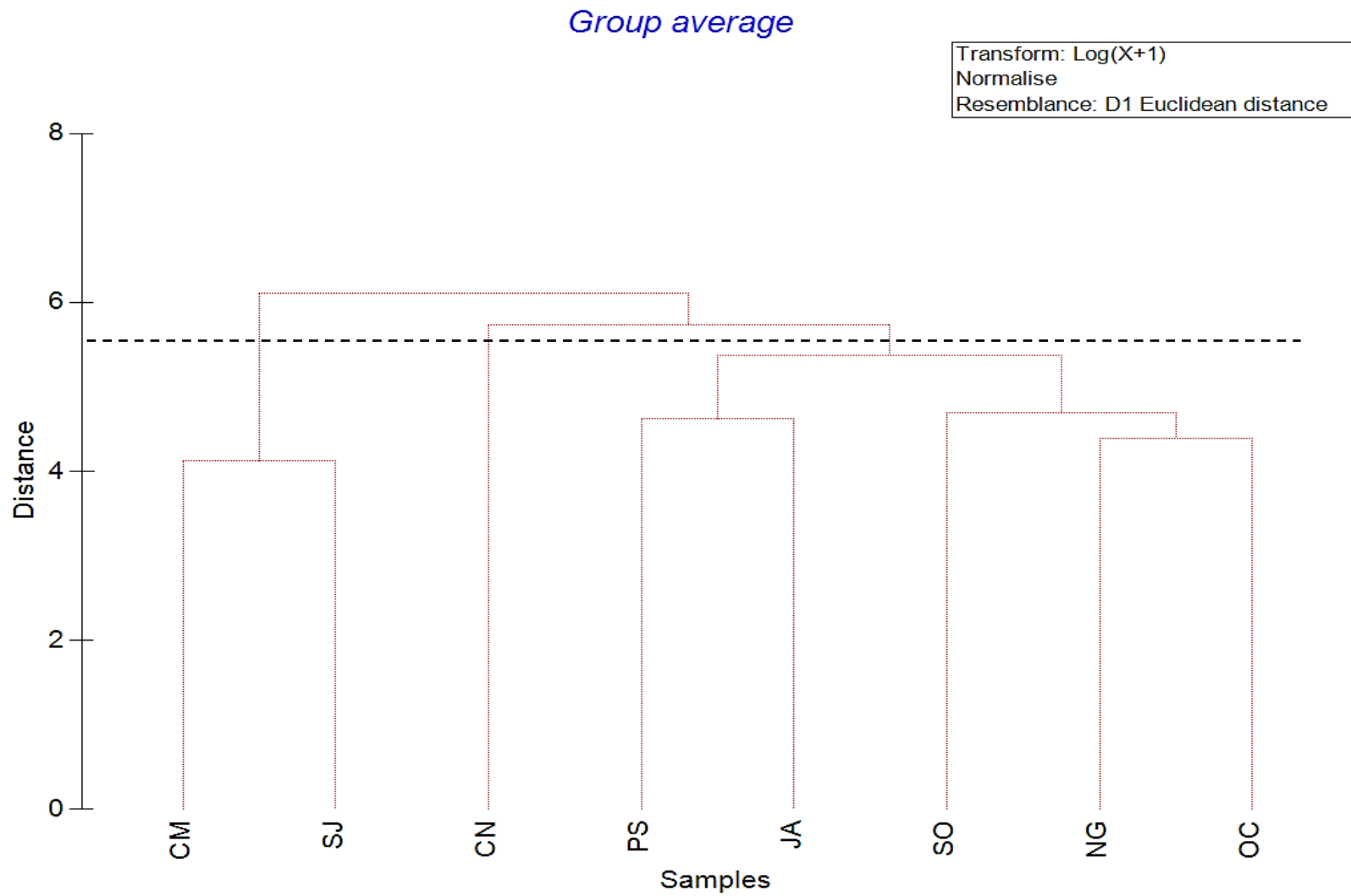
788 역그룹 구분에 기여하는 상위 3개 요인은 Table 2-5에 정리하였다. 진해만 내만과
789 마산만 해역의 수질 환경요인 차이는 Nitrate, Silicate, DIN, TOC 및 Chl-a와 같은
790 영양염류와 DO 및 pH와 같은 요인의 차이에 기인된 것으로 확인되었다. 또한 진
791 해만 내만과 마산만 해역의 번식생리학적 차이는 Egg mass, TDWT, 총탄수화물과
792 총단백질의 차이에 기인된 것으로 확인되었다.
793



794

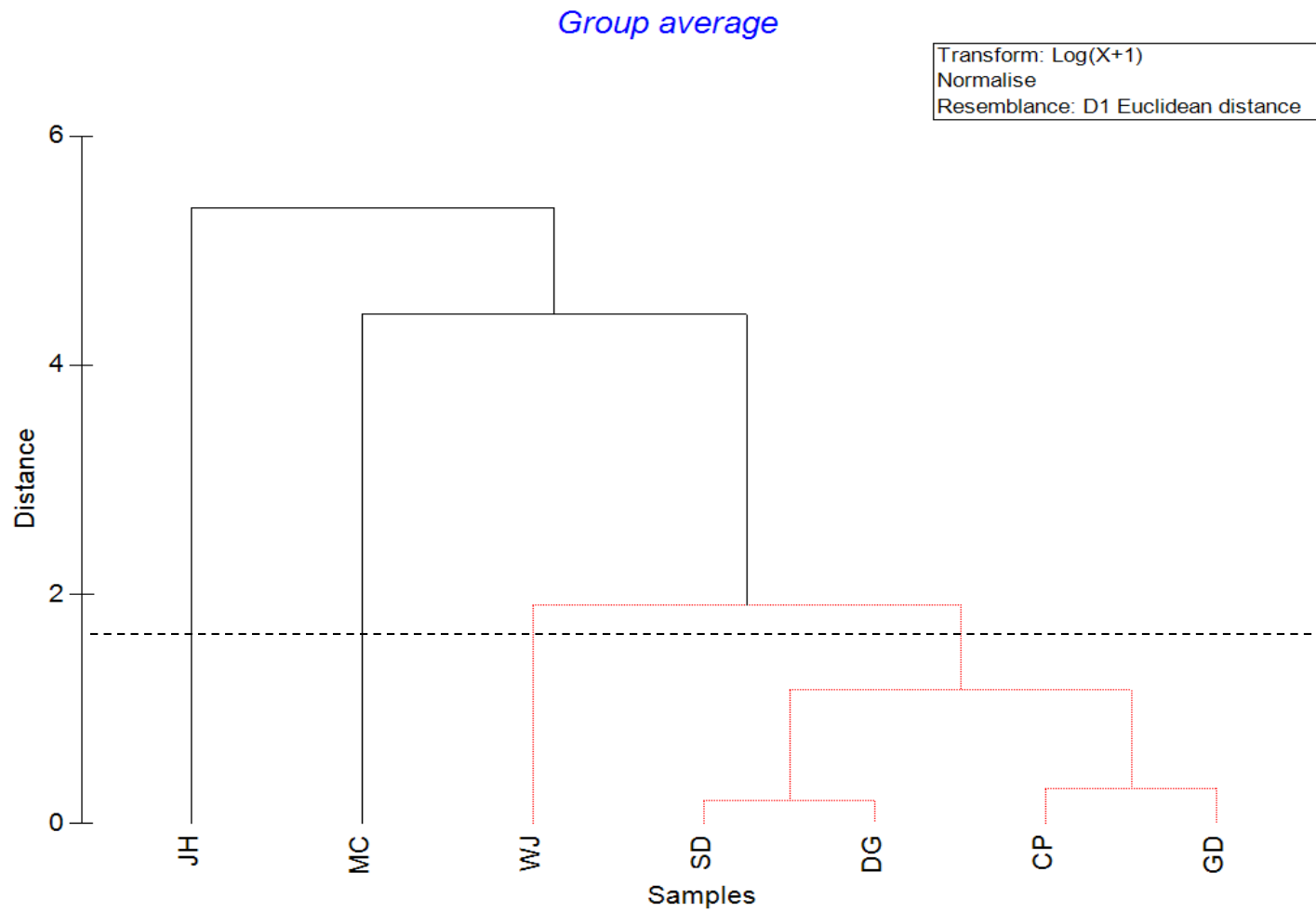
795 **Fig. 2-9.** Map showing groups of locations clustered by the Euclidean distance.

796



797

798 **Fig. 2-10.** Dendrogram of the hierarchical clustering of sampling sites of Gwangyang bay based on Euclidean distance.



799

800 **Fig. 2-11.** Dendrogram of the hierarchical clustering of sampling sites of Jinhae bay generated by the Euclidean distance.

801

802 **Table 2-4.** Results of SIMPER test showing the main contribution factors within a location groups in Gwangyang bay.

Gwangyang Bay (Environmental factor)			Gwangyang Bay (Biological factor)		
Variable	Average squared distance	Contribution (%)	Variable	Average dissimilarity	Contribution (%)
<i>Group C & B</i>			<i>Group C & B</i>		
pH	4.34	11.89	Egg mass	1.15	26.74
TOC	4.23	11.6	C	1.05	24.35
Silicate	3.69	10.1	P	0.82	19.10
<i>Group C & A</i>			<i>Group C & A</i>		
PBEDs	7.75	23.33	Egg mass	1.80	21.20
DDT	7.32	22.03	C	1.66	19.52
Chl-a	2.86	8.61	P	1.51	17.79
<i>Group B & A</i>			<i>Group B & A</i>		
DDT	7.82	17.7	Egg mass	1.08	20.93
Silicates	6.71	15.2	DGA	0.94	18.34
PBDEs	6.58	14.9	C	0.93	18.08

803

804

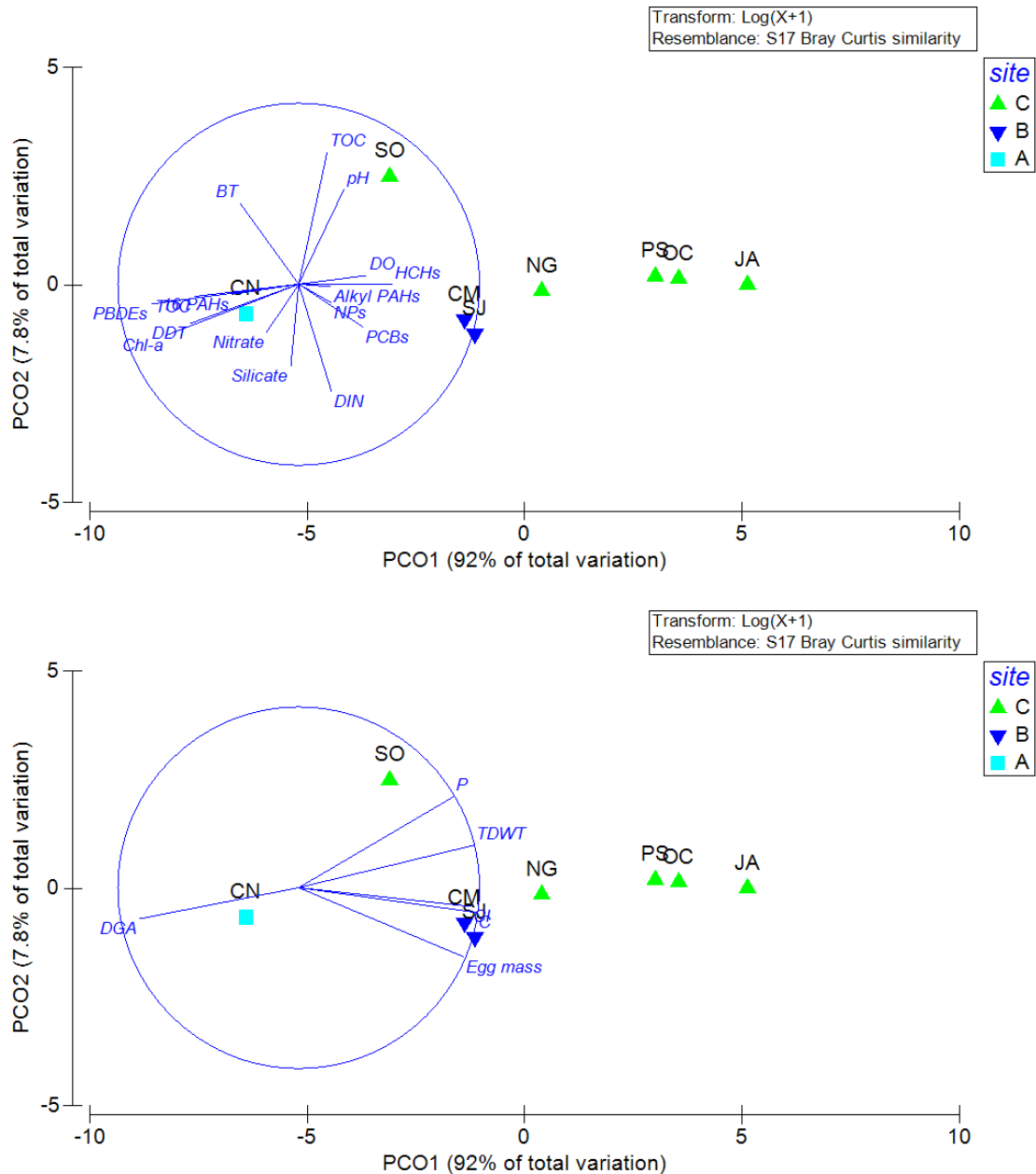
805 **Table 2-5.** Results of SIMPER test showing the main contribution factors within a location groups in Jinhae bay.

Jinhae Bay (Environmental factor)			Jinhae Bay (Biological factor)		
Variable	Average squared distance	Contribution (%)	Variable	Average dissimilarity	Contribution (%)
Group D & C			Group D & C		
Nitrate	7	34.22	C	1.16	33.02
DIN	7	34.22	P	0.62	17.64
Silicate	4.51	22.03	DGA	0.58	16.68
Group D & B			Group D & B		
DO	11.6	31.03	Egg mass	0.98	23.14
Nitrate	7	18.66	P	0.81	19.14
DIN	7	18.66	TDWT	0.77	18.22
Group C & B			Group C & B		
Silicate	6.45	29.03	Egg mass	0.85	49.60
pH	4.94	22.25	C	0.39	23.08
Chl-a	4.2	18.9	P	0.20	11.58
Group D & A			Group D & A		
Nitrate	7	23.98	Egg mass	1.47	35.15
DIN	7	23.98	TDWT	0.68	16.20
TOC	4.42	15.16	P	0.66	15.82
Group C & A			Group C & A		
Silicate	7.34	38.22	C	1.62	22.61
TOC	4.42	23.02	Egg mass	1.56	21.77
Chl-a	4.2	21.86	P	1.29	17.97
Group B & A			Group B & A		
DO	2.74	75.01	Egg mass	2.44	30.89
pH	0.61	16.72	P	1.48	18.77
			TDWT	1.46	18.45

806

807 굴 서식지역의 환경과 번식생리학적 요인의 상관관계를 분석하기 위해
808 PCO 분석을 실시하였고, 그 결과는 Fig. 2-12 와 Fig. 2-13 과 같다. 광양만의 경우
809 (Fig. 2-12), 수평적인 변화요인 (PCO1)에 의해, 환경변화 및 굴의 번식생리학적
810 변화의 92%를 설명할 수 있는 것으로 조사되었다. 이 결과에 의하면, 내만의
811 초남대교는 PBEDs, DDT, 16 PAHs 와 같은 유기오염물질과 TOC, Chl-a 와 같은
812 영양염류의 영향을 강하게 받고 있는 것으로 조사되었으며, 이때 굴의 DGA 에
813 부정적인 영향을 받는 것으로 확인되었다. 또한 광양만 외만의 경우에는
814 TDWT 를 비롯한 CI, Egg mass 총탄수화물과 총단백질이 DGA 와는 상반된 작용을
815 하는 것으로 확인되었다. 진해만의 경우에는 Fig. 2-13 에서 보는 바와 같이,
816 수평적 변화요인 (PCO1)에 의해, 환경변화 및 굴의 번식생리학적 변화의 95.1%를
817 설명할 수 있는 것으로 조사되었다. 이 결과에 따르면, 진해만은 마산만 주변의
818 해역이 Chl-a 와 TOC 와 같은 영양염류의 영향을 강하게 받고 있는 것으로
819 조사되었으며, 이때 굴의 TDWT 및 Egg mass, CI, 총단백질과 총탄수화물이
820 긍정적인 영향을 받고 있는 것으로 확인되었다.

821



822

823 **Fig. 2-12.** Principal coordinate analysis of the 8 sampling sites in Gwangyang bay. Euclidean

824 distance values (up) and Bray-Curtis similarity values (down) were calculated on

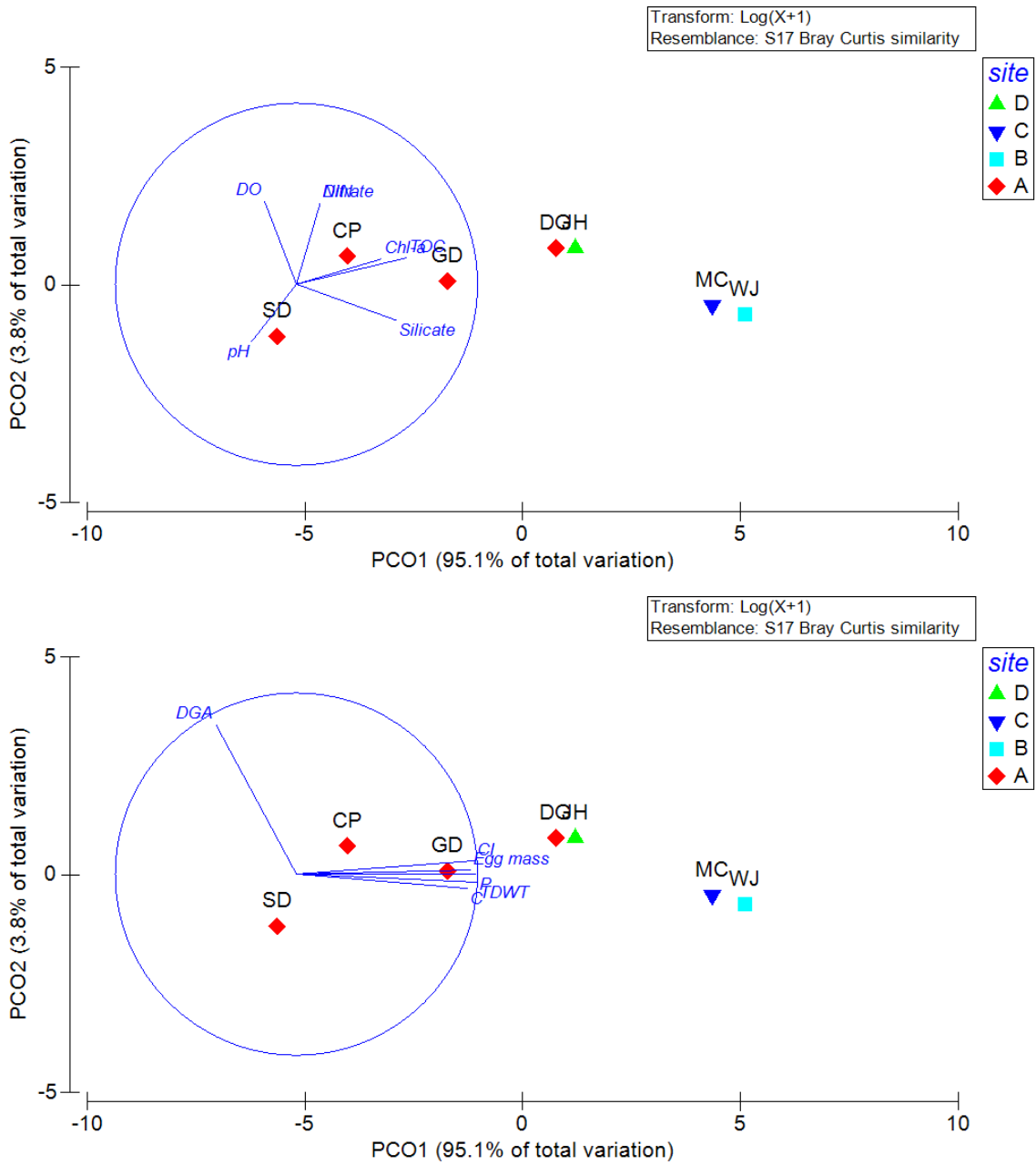
825 standardized log(X+1) transformed abundances of reads grouped to classes.

826 Percentages of the total variation that explained by the first two axes are indicated.

827 Vectors represent the direction of the relationships between the classes and the

828 ordination axes.

829



830

831 **Fig. 2-13.** Principal coordinate analysis of the 7 sampling sites located in Jinhae bay.

832

Euclidean distance values (up) and Bray-Curtis similarity values (down) were

833

calculated based on standardized log(X+1) transformed abundances of reads

834

grouped to classes. The percentages of the total variation that explained by the

835

first two axes are indicated. Vectors represent the direction of the relationships

836

between the classes and the ordination axes.

837 **4. Discussion**

838 이 연구에서는 광양만 내만에서 외만으로 8개 지역, 진해만 내만에서 외만
839 으로 7개 지역에 서식하는 굴의 번식생리학적 요인들을 분석하였다. Euclidian
840 distance 와 Bray-Curtis similiarity 분석을 통해 광양만과 진해만 조사 정점을 각각
841 3개와 4개의 지역그룹으로 구분할 수 있었다 (Fig. 2-10와 Fig. 2-11). 이때, 광양만
842 과 진해만 내만에 서식하는 굴이 외만에 비해 CI 및 TDWT, Egg mass, 총탄수화물
843 함량이 낮은 것으로 조사되었고, 이와 같은 결과는 유기오염물질 농도가 높거나
844 수질 내 영양염류가 낮을 때 발생하는 것으로 조사되었다 (Fig. 2-12와 Fig. 2-13).

845 건중량의 차이는 비만도의 변화를 불러일으키는 중요한 요인으로 작용한
846 다. 해산 이매패류의 비만도 측정법은 일반적으로 패각건중량 혹은 패각내부피에
847 대한 건중량의 비율로 표현하기 때문이다 (Crosby and Gale, 1990). 예로부터 비만
848 도는 에너지 저장 정도나 생식소의 발달과 밀접한 연관이 있기 때문에 (Costil et
849 al., 2005; Gosling, 2004) 해양 이매패류의 영양상태 또는 일반적인 건강도를 나타내
850 는 지표로 사용되어 왔다 (Cardoso et al., 2007; Crosby and Gale, 1990; Rainer and Mann,
851 1992). 이 연구에서는 동일한 시기에 채집을 하였음에도 불구하고, 광양만과 진해
852 만 내만에 위치한 초남대교, 사등면에 서식하는 굴이 외만의 장항, 마창대교, 원
853 전항에 서식하는 굴에 비해 약 2.5배 낮은 비만도를 갖는 것으로 조사되었다 (see

854 Fig. 2-2). 또한 표준동물의 건중량 (Fig. 2-3)도 비만도와 동일한 결과를 도출할 수
855 있었다. Costil et al. (2005)은 프랑스 노르망디 연안 Bay of Veys 내 내만에서 외만으
856 로의 6개 정점에 대한 굴 (*C. gigas*)의 생물학적 변화를 시-공간적으로 조사하였다.
857 이들의 연구 결과, 내만에 위치한 굴의 성장, 육중량 및 생화학성분에 있어서 외
858 만에 비해 유의적으로 낮은 결과를 얻었다. 그들은 이와 같은 연구 결과의 원인
859 이 조석리듬에 따른 노출시간의 차이로 내만에 위치한 굴의 섭이활동 시간이 외
860 만에 비해 짧아 충분한 먹이섭취를 못하였을 것이라고 고찰하였다. 또한 충분하
861 지 못한 먹이 섭취의 근거로 체내 탄수화물 함량이 외만에 비해 유의적으로 낮은
862 것을 지목한 바 있다. Baek et al. (2014)은 우리나라 곰소만 내만의 곰소항의 개간
863 지역과 외만의 하전리 자연 양식장에 서식하는 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)의
864 생리학적 변화를 조사한 바 있다. 이들은 조사지점 간 해수 중 클로로필 a와
865 seston의 농도 차이를 관찰 할 수 있었고, 그 결과 비만도, 체내 생화학조성분, 건
866 중량 및 성장이 곰소항에서 유의적으로 낮게 관찰되었다. 우리의 연구 결과에서
867 도, 비만도와 건중량 뿐만 아니라 생화학조성분 및 소화맹낭위축도 지수가 내만
868 에 서식하는 굴이 낮은 것으로 조사되었으며, 이때, 외인적 환경요인인 유기오염
869 물질 혹은 영양염류가 영향을 미치는 것으로 조사되었다. 따라서 유기오염물질

870 혹은 영양염류의 부족과 같은 외인적 환경요인이 굴의 먹이 섭이 활동을 방해하
871 였고, 중국에는 성장 및 번식 등에 이용할 체내 에너지 저장물질이 부족해 진 것
872 으로 사료된다.

873 해산이매패류의 연중 번식주기 조사 연구는 정확한 산란시기 파악과 산란
874 량을 조사함으로써 자원관리 및 종묘생산에 필수적 정보로 사용이 되기 때문에
875 예로부터 많은 연구자들에 의해 연구되어 왔다 (Drummond et al., 2006; Gosling,
876 2004; Jeung et al., 2014; Park and Choi, 2004; Toba and Miyama, 1991; 1994; Uddin et al.,
877 2013). 이번 연구 결과에서는 광양만과 진해만 15개 지역에 서식하는 굴의 조직학
878 적 생식소 발달단계 관찰 결과, 대부분이 완숙기 (ripe stage)로 발달단계의 차이는
879 관찰되지 않았다 (see Fig. 2-6). 또한 ELISA를 통한 생식소중량지수 (gonad somatic
880 index, GSI, %)는 대부분의 지역에서 35~50% 사이로 지역별 차이가 관찰되지 않았
881 다 (data not shown). 그러나 표준동물의 건중량에 대한 실질적 알 무게를 산출한
882 결과, 내만에 위치한 초남대교 및 사등면에 서식하는 굴이 외만에 서식하는 굴에
883 비해 최대 5.5배 적은 알을 생산하는 것을 알 수 있었다 (see Fig. 2-7). 해산이매패
884 류의 연중 번식 주기에 있어 수온과 먹이는 배우자 형성을 조절하는 가장 영향력
885 있는 환경요인으로 알려져 있다 (Hofmann et al., 1992; Kennedy et al., 1996; Cardoso et
886 al., 2007). 수온은 일반적으로 지리학적 위도의 차이와 상관관계가 높으며, 배우자

887 형성 시기 및 산란시기 변화에 주요한 요인이다. 예를 들어 저위도의 열대지방에
888 서식하는 패류는 연중산란의 양상을 주로 보이는 반면 (Kang et al., 2005; Kennedy
889 et al., 1996; Pouvreau et al., 2000), 상대적으로 고위도인 온대지방에 서식하는 패류는
890 연중 1~2차례 산란하는 뚜렷한 번식주기를 갖고 있는 것이 대부분이다 (Camacho
891 et al., 2003; Cárdenas and Aranda, 2000; Limpanont et al., 2010; MacDonald and Thompson,
892 1985; Ren et al., 2012; Uddin et al., 2013; Yang et al., 2011). 그러나 동일지역에 서식하
893 더라도 종 (species)의 번식 특성 차이로 인해 산란시기 및 횟수가 다를 수 있으며,
894 동일 종 (species)이 서로 다른 지역에 서식하더라도 그 번식 패턴은 주변 환경 요
895 인에 의해 변화 할 수 있다 (Cárdenas and Aranda, 2000). 우리의 연구에서는 비록
896 지역별 생식소 발달단계의 차이를 관찰하지는 못하였지만, 단발성 채집으로 인해
897 번식생리 (배우자 형성 시기 및 산란시기, 회수 등)의 지역적 변화는 좀 더 긴 기
898 간 동안 비교를 한 후에야 가능 할 것으로 사료된다.

899 해산이매패류의 번식생리는 수온뿐만 아니라 먹이량 및 질병, 오염 스트레
900 스 등에 따라 영향을 받는다 (Baek et al., 2014; Hofmann et al., 1992; Kang et al., 2015;
901 Mann, 1979;). Newell et al. (1982)은 미국 동부해안의 위도별 7개 지역에 서식하는
902 담치 (*Mytilus edulis*)의 번식주기를 조사한 결과, 수온에 따른 번식 패턴 차이는 관
903 찰하지 못하였으며, 동일 위도에 있더라도 산란량이 다를 수 있음을 보고하였다.

904 Newell et al. (1982)은 그들의 연구 결과가 서식지 간의 먹이공급 차이로 인해 체내
905 에너지 저장량이 달라져 산란시기 및 포란량이 차이가 날 수 있다고 고찰하였다.
906 Chu et al. (2003)은 PCBs에 노출시킨 대서양굴 (*C. virginica*)의 번식주기와 산란량을
907 비교하였다. 그들의 연구 결과 PCBs는 주로 생식소에 축적되며, PCBs의 농도가
908 높을수록 알의 발달이 저해되었고, 중국에는 PCBs의 농축정도와 상관없이 대조구
909 에 비해 산란량이 적어지는 것을 보고하였다. 또한 Costil et al. (2005)은 그들의 연
910 구에서 내만에서 외만으로의 서식지역 차이에 의해 크기 및 육질성장, 비만도의
911 차이뿐만 아니라, 외만에 서식하는 굴이 내만에 비해 산란횟수가 더 많은 것을
912 관찰하였다. 이들은 내만과 외만의 산란 패턴이 차이를 보이는 원인에 대해서 내
913 만에 서식하는 굴이 먹이 섭이를 할 수 있는 시간이 상대적으로 적기 때문에, 체
914 내에 저장할 수 있는 에너지가 적고, 따라서 이를 이용한 배우자를 형성에 한계
915 가 있기 때문에 굴의 번식량은 낮아질 것이라고 고찰하였다. 체내에 저장된 에너
916 지를 이용하여 배우체를 형성하는 해산이매패류의 번식 패턴은 많은 연구에서 밝
917 혀진바 있다 (Camacho et al., 2003; Delgado and Camacho, 2007; Deslous-Paoli and Héral,
918 1988; Dridi et al., 2007; MacDonald and Thompson, 1985; Mondol et al., 2012; Ren et al.,
919 2012; Uddin et al., 2013). 이와 같은 관점에서 보았을 때, 우리의 연구 결과에서 관
920 찰된 광양만과 진해만 내만에 서식하는 굴의 낮은 번식량은, 높은 PBDEs 및

- 921 DDT와 같은 유기오염물질, 낮은 TOC 및 Chl-a와 같은 영양염류가 먹이 섭이 활
- 922 동을 방해하여 충분한 에너지를 저장하지 못함에 따라 알 생산에 부정적인 영향
- 923 을 끼쳤을 것으로 사료된다.
- 924

925 **Part 3**

926 **Physiological variations of the wild Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in**
927 **Gwangyang bay off the southern coast of Korea depending on the**
928 **geographical differences**

929

930 **Abstract**

931 In order to survey the physiological variations exclusion the reproductive effects of
932 the wild Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in Gwangyang bay, we investigated from
933 individual level to cellular level indices of the oysters. The wild oysters were collected from
934 10 different sites from inner to outer bay of the Gwangyang bay in October 2012. Collected
935 oysters were transferred directly to laboratory and investigated from individual level to
936 cellular level parameters, and also analyzed heavy metal concentration and poly-aromatic
937 hydrocarbons deposition in oyster tissues. To survey the correlation between environmental
938 factors and physiological variations, principal coordinates (PCO) analysis was conducted. As
939 a result, it could be separate into 3 groups from inner bay to outer bay. This separation caused
940 by heavy metal concentration (As and Cr) and water quality (POC, Chl-a, pH, DO, Phosphate
941 and Nitrate). These environmental factors influenced to individual level and tissue level
942 indices variations. However, although in case of cellular level parameter, LF and LMS and
943 hemocyte mortality was well correlated with environmental factors, but some of results as NL,
944 hemocyte count, DNA damage, phagocytosis capacity and NRR time were showed no
945 significantly different. Conclusively, our results indicated that individual level and tissue
946 level indices are seems to be more suitable indicator in monitoring program to assess the
947 chronic stress on benthic animals than cellular level parameter.

948

949 **Key words:** Wild Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Biomarker, Monitoring program,
950 Gwangyang bay

951

952 **1. Introduction**

953 생물체는 외부로부터 전달되는 스트레스에 대하여 이를 극복하고 생리적
954 안정상태 (homeostasis)를 유지하기 위한 다양한 생물학적, 생리학적 변화를 나타
955 낸다 (Chrousos and Gold, 1992). 특히 해산이매패류는 어류나 무척추동물에 비해
956 활동범위가 제한적일 뿐만 아니라 환경오염물질에 노출된 정도를 이들의 조직세
957 포나 생리에 잘 반영하기 때문에 일정지역의 환경 오염원 등의 감시 수단으로 널
958 리 사용된다 (Choi et al., 2010; Galgani et al., 2009; Guéguen et al., 2013; Huanxin et al.,
959 2000; Moschino et al., 2011; Viarengo et al., 2007). 이매패류의 아가미와 소화맹낭은
960 먹이의 수집, 소화 및 흡수의 역할을 하기 때문에, 이들의 조직병리학적, 세포화
961 학적, 생화학적 및 유전학적 생리 반응은 연안환경의 오염도를 평가하는데 있어
962 생체지표 (biomarker)로 활용되고 있다 (Au, 2004; Dailianis, 2010; Viarengo et al.,
963 2007).

964 국외 연안환경 위험성 평가 프로그램 수행 동향 및 모니터링 프로그램에
965 사용되는 생체지표의 선택 시 고려해야 할 사항 및 생체지표의 장, 단점, 종류는
966 part 1에서 기술 한 바 있다. 이 연구에서는 part 2에서 조사된 개체수준 (individual
967 level)의 생리학적 요인 뿐만 아니라, 세포수준 (cellular level)과 조직수준 (tissue
968 level)의 생리학적 요인을 포함하여, 굴의 서식지의 환경에 따른 생리학적 요인의

969 변화를 조사하고자 수행되었다. 이를 위해, 세포수준의 생체지표로 굴의 혈구
970 (hemocyte) 면역능을 조사하였고, 세포화학적 변화를 알아보하고자 소화맹낭 내 리
971 소솜 활동 (lysosomal response)을 측정하였다. 해산 이매패류는 체액성 인자
972 (humoral effectors)들과 혈구 (hemocyte)로 구성된 선천 면역 시스템 (innate immune
973 system)을 보유하고 있으며, 면역 외에도 소화, 조직의 수선, 분비 등에 관여를 하
974 며 생리적 안정상태를 유지하기 위해 다양한 변화를 나타낸다 (Cheng, 2000; Chu,
975 2000). 또한 오염물질 (중금속, 생체이물질 (xenobiotics), PCB 및 TBT)에 노출된 해
976 산이매패류 (*Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica*, *Chlamys farreri*) 혈구의 총혈구수 변
977 화, 식세포능 (phagocytosis)이 저하된다는 여러 연구 결과가 보고 된 바 있다
978 (Auffert et al., 2002; Brousseau et al., 2000; Fisher et al., 1990; Liu et al., 2009; Matozzo et
979 al., 2001; Pipe and Coles, 1995; Sauvé et al., 2002). 리소솜 (lysosome)은 효모에서 인간
980 까지 모든 진핵생물 세포에 존재하며, 세포 외부 및 내부로부터 생성되는 물질의
981 소화 및 해독, 배출 기능의 주된 역할을 수행한다 (Moore, 1985; Viarengo et al.,
982 1987). 리소솜은 생체이물질 혹은 환경오염 등의 스트레스에 의해 리소솜 막 안정
983 성이 저하된다. 이에 따라 리소솜 내 가수분해 효소가 세포질로 확산되거나,
984 neutral lipid 혹은 lipofuscin과 같은 세포내에서 분해되지 않는 물질이 비정상적으
985 로 축적되어 세포에 해로운 영향을 미친다 (Chung, 2003; Cuervo, 2004; Moore et al,

986 2006; Petrović et al., 2001).

987 우리나라의 경우, 국토해양부에서 해양환경상태 조사 및 평가기술을 개발
988 하고 제도화하여 체계적이며 과학적인 해양환경기준을 마련하고자 “해양환경기준
989 설정 및 개선방안 연구”를 수행하고 있다 (국토해양부, 2013). 또한 해양환경관리
990 공단에서 수행하고 있는 “해양생태계기본조사” (해양수산부, 2012)와 한국해양과학
991 기술원에서 수행하고 있는 “남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발” 사업 (한
992 국해양과학기술원, 2013)을 통해 생태계의 상태를 지수를 나누어 생태계지수 개발
993 을 추진하고 있다.

994 광양만은 우리나라 남해연안에 위치하고 있는 대표적 반폐쇄성 만으로
995 광양시, 순천시 및 여수시가 주변에 위치하고 있다. 또한 산업시설로 광양제철소
996 및 울촌공단, 초남공단, 여천 국가산업단지가 위치해 있으며, 30년이라는 짧은 기
997 간 동안 집중적인 산업시설과 부두확장 등으로 인한 해안선 변경, 공단으로부터
998 의 다양한 오폐수 유입으로 연안환경에 심각한 훼손우려가 있는 지역이다 (Cho et
999 al., 2000; Jang et al., 2005; Kwak et al., 2001). 이에 따라 광양만 퇴적물 내 중금속 함
1000 량에 관한 연구 (Cho et al., 2000; Joo et al., 2000; Kang and Lee, 1996) 및 퇴적물 특성
1001 (Hyun et al., 2004), 무기영양염 분포 조절 요인 (Jang et al., 2005), 유기화합물 함량
1002 (Kim et al., 2008)과 연간 수질 변동 (Cho et al., 2013)에 관한 다양한 연구가 진행

1003 되어 왔다. 그러나 광양만 연안의 생태계 건강성을 평가하기 위한 대부분의 연구
1004 사업이 연안의 수질 및 퇴적물 오염도를 중심으로 평가하여 왔으며, 연안 오염
1005 정도가 생물체에 미치는 생리학적 영향에 대한 연구는 제한적으로 이루어 지고
1006 있는 실정이다.

1007 따라서 이 연구에서는 광양만 내만에서 외만으로의 10개 지역을 선정하여,
1008 조간대에 서식하는 굴의 세포수준 (cellular level)부터 조직수준 (tissue level) 및 개
1009 체수준 (individual level)까지 생리학적 반응이 서식 환경에 따라 어떻게 변하는지
1010 조사하고자 수행되었다. Part 2의 연구 결과에서 광양만의 내만에서 외만으로 굴
1011 (*Crassostrea gigas*)의 서식 지역에 따른 번식생리의 차이가 관찰된 바 있다. 따라
1012 서 이 연구에서는 번식주기에 따른 생리학적 반응의 오차를 줄이기 위해, 2012년
1013 11월 굴의 산란 후 회복 시기에 굴을 채집하여 생리학적 요인 변화를 분석하였다.

1014

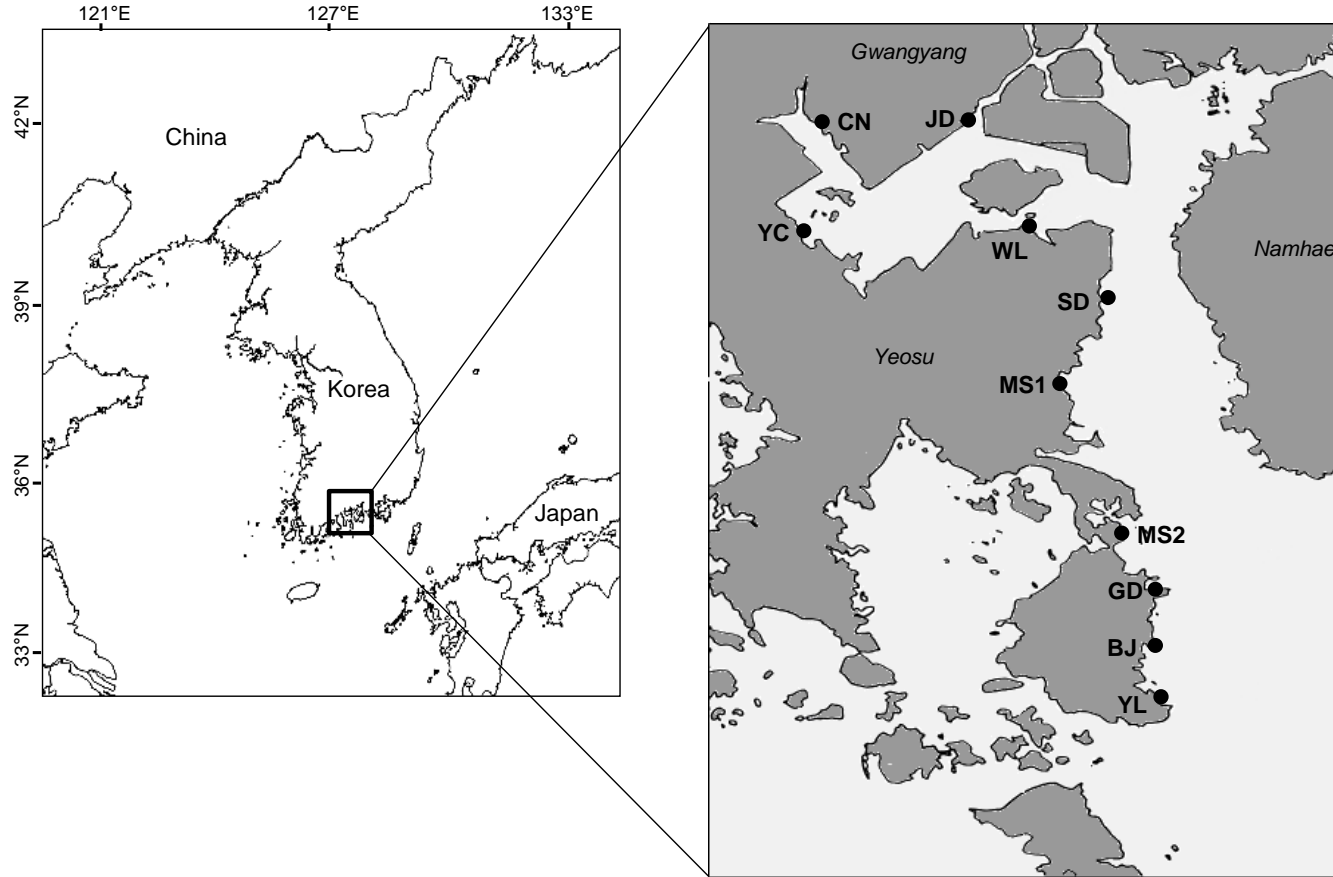
1015

1016 **2. Materials and methods**

1017 **2.1. Sampling effort**

1018 이 연구는 광양만 내만에서 외만으로의 서식환경 변화에 따른 굴의 생리
1019 학적 변화를 조사하기 위해, Fig. 3-1과 같이 10개의 지점을 선택하여 조간대 굴을
1020 채집하였다. 굴의 생리학적 지표는 번식주기에 민감함 영향을 받기 때문에, 번식

1021 에 의한 영향을 최소화하기 위해, 산란 이후 회복하는 시기인 2012년 10월에 시
1022 료 채집을 수행하였다. 광양만 내만에서 외만으로의 10개 지점에 대한 site
1023 description은 Table 3-1에서와 같다. 광양만 10개 지점에 서식하는 조간대 굴 중 크
1024 기가 큰 30개체를 무작위로 선별하여 채집을 하였고, 채집된 굴은 실험실로 옮겨
1025 와 3일간 해수에 순치하여 채집 및 이동에 따른 스트레스를 최소화 한 후 분석에
1026 이용하였다 (Table 3-2). 채집된 굴의 생리학적 지표는 다음과 같이 개체수준
1027 (Individual level), 조직수준 (Tissue level), 세포수준 (Cellular level)에서의 생리요인을
1028 분석하였고, 체내 오염물질 축적을 분석하였다 (Fig. 3-2). 세포수준의 생리요인은
1029 각 지역에서 채집된 굴 중 10개체를 선별하여 분석에 이용하였다 (Fig. 3-2).



1030

1031 **Fig. 3-1.** Map showing the sampling sites. *Crassostrea gigas* collected from ten sampling sites in Gwangyang bay, off the southern coast of
 1032 Korea. YC: Yulchon-nyeon, CN: Chonam bridge, JD: Jung-dong, WL: Wollae-dong, SD: Sinkeok-ri, MS1: Manseong-ri, MS2:
 1033 Mooseulmok, GD: Gye-dong, BJ: Bangjukpo, YL: Yullim.

1034

1035

1036 **Table 3-1.** Description of habitat characteristics.

Site	Description
Yulchon-myeon (YC)	Near small harbor, mud, cobblestone and rocky shore
Chonam bridge(CN)	Estuary of Gwangyang west stream, mud and rocky bottom, surrounded by industrial complex
Jung-dong (JD)	Near large scale harbor, mud and cobblestone bottom
Wollae-dong (WL)	Near dock, mud and cobblestone bottom
Gwangyang Bay Sindeok-ri (SD)	Rocky shore
Manseong-ri (MS1)	Cobblestone beach, Rocky shore
Mooseulmok (MS2)	Cobblestone beach, Rocky shore
Gye-dong (GD)	Inside of small bay, cobblestone and rocky shore
Bangjukpo (BJ)	Outside of small harbor, rocky shore
Yullim-ri (YL)	Outside of small harbor, rocky shore

1037

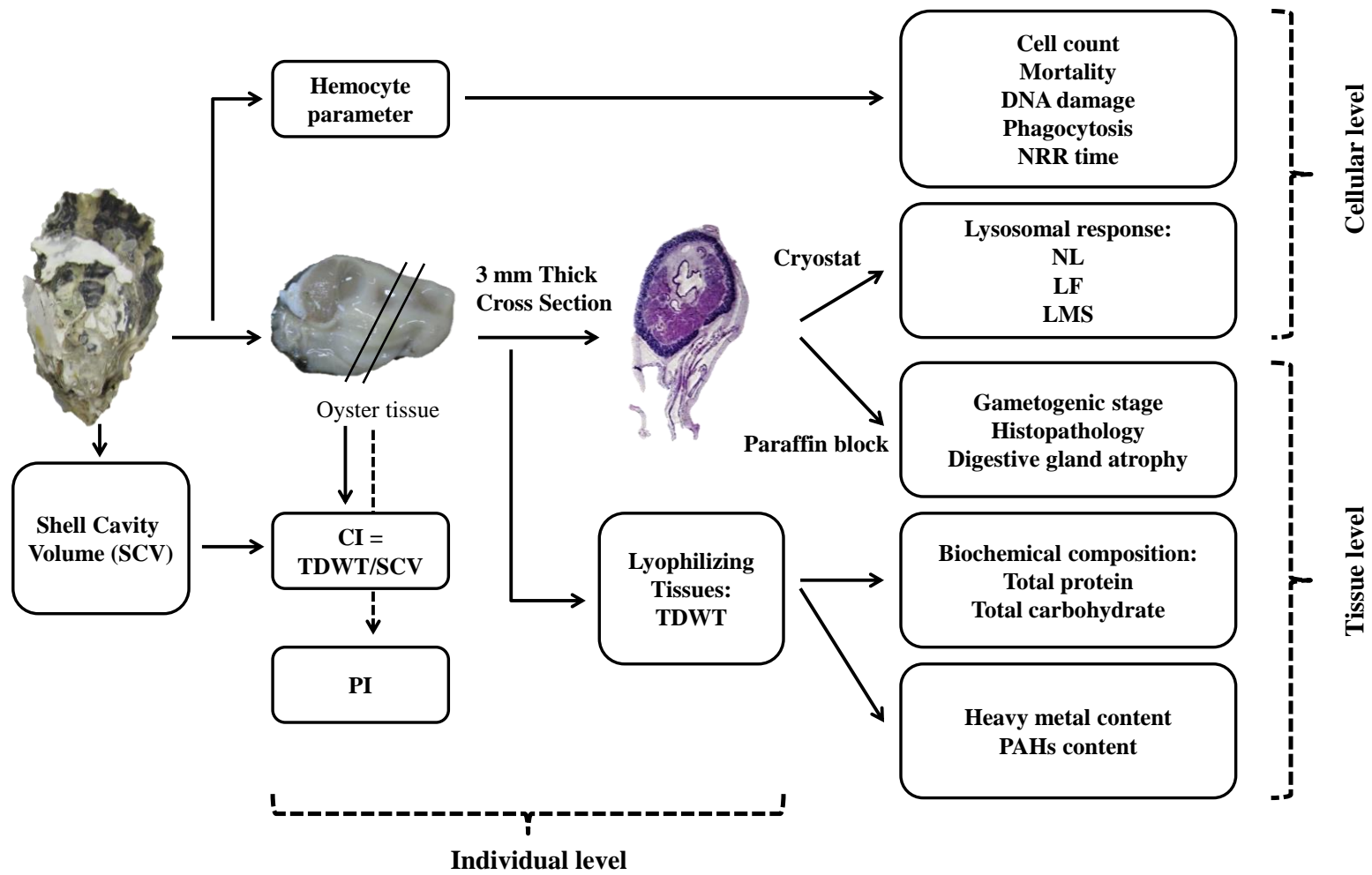
1038

1039 **Table 3-2.** Biometric information of *C. gigas* collected from Gwangyang Bay in 2012. N: number of specimen, SH: shell height, TDWT:
 1040 tissue dry weight, SE: standard error, ANOVA, p<0.05.

Site	N	SH (mm)	TDWT (g)
		mean ± SE	mean ± SE
Yulchon-myeon (YC)	30	71.8 ± 2.0 ^d	0.6429 ± 0.05 ^b
Chonam bridge(CN)	30	60.2 ± 1.2 ^c	0.4727 ± 0.04 ^a
Jung-dong (JD)	30	72.0 ± 1.1 ^d	0.9102 ± 0.05 ^d
Wollae-dong (WL)	30	74.2 ± 1.4 ^d	1.2531 ± 0.08 ^e
Sindeok-ri (SD)	30	56.2 ± 1.4 ^b	1.1706 ± 0.07 ^e
Manseong-ri (MS1)	30	53.3 ± 1.0 ^{ab}	0.7333 ± 0.05 ^{bc}
Mooseulmok (MS2)	30	55.6 ± 1.1 ^b	1.1354 ± 0.06 ^c
Gye-dong (GD)	30	52.5 ± 1.4 ^{ab}	0.8425 ± 0.05 ^{cd}
Bangjukpo (BJ)	30	51.4 ± 1.2 ^a	0.9224 ± 0.05 ^d
Yullim-ri (YL)	30	55.9 ± 1.4 ^b	0.8429 ± 0.04 ^{cd}

1041

1042



1043

1044 **Fig. 3-2.** Flow chart showing the experimental procedure.

1045

1046 **2.2. Individual level analysis**

1047 **2.2.1. Condition index and physiological index**

1048 2012년 10월 광양만 10개 지역에서 채집된 굴의 비만도는 Part 2에서 측정
1049 한 방법과 동일한 방법에 의해 산출되었다 (Part 2, Materials and methods 참조).
1050 Physiological index는 Howard and Smith (1983)에 기술되어 있는 것과 같이, 개각 후
1051 굴의 육질을 score 1 (watery), score 2 (medium), and score 3 (fat)의 3 단계로 나누어 육
1052 안으로 관찰 후 기록하였다.

1053

1054 **2.2.2. Tissue dry weight of standard animal**

1055 Table 2에서 보는 바와 같이, 2012년 10월 광양만 10개 지역에서 채집된 굴
1056 의 크기와 무게는 지역에 따라 차이가 있었다. 이와 같이 크기에 따른 굴의 건중
1057 량 및 생화학적 성분함량의 차이를 최소화 하기 위해, 채집된 전체 굴의 평균 크
1058 기인 각고 60.3 mm를 기준으로 표준동물의 건중량 (mg/standard animal (STD animal),
1059 mean \pm 95% confidence interval)을 산출하였다. 표준동물의 건중량 산출 방법은
1060 Part 2에 기술한 방법과 동일한 방법을 이용하였다.

1061

1062 **2.3. Tissue level analysis**

1063 **2.3.1. Biochemical composition of standard animal**

1064 광양만 10개 지역에서 채집된 굴의 생화학적 성분은 총탄수화물 함량과

1065 총단백질 함량을 분석하였다. 총탄수화물 함량과 총단백질 함량 분석 방법은 Part
1066 2에 기술한 방법과 동일한 방법으로 분석을 하였고, 분석값은 60.3 mm 크기의 표
1067 준동물에 대한 함량 (mg/standard animal (STD animal), mean \pm 95% confidence
1068 interval)을 산출하여 표기하였다.

1069

1070 **2.3.2. Histopathological observation and digestive gland atrophy**

1071 2012년 10월 광양만 10개 지역에서 채집된 30개체의 굴은 비만도와 습중
1072 량 측정 후, Howard and Smith (1983)의 방법에 따라 소화맹낭을 포함되도록 5 mm
1073 두께의 중앙부위를 절취하였다. 절취된 조직 중 20개체는 Davidson's solution에 24
1074 시간 고정 후 탈수하여 일반적인 paraffin block 제작을 하였고, 10개체는 O.C.T.
1075 compound (Tissue Tek)로 포매 후 동결절편 제작 및 세포화학적 반응 분석에 이용
1076 하였다. Paraffin block 및 조직 슬라이드 제작, 번식주기, 소화맹낭 위축도 지수 판
1077 정은 Chapter 2에 기술한 방법과 동일한 방법에 의해 수행되었다. 동결절편의 제
1078 작은 다음과 같다. Five mm thickness로 절취된 조직 시료는 동결절편용 몰드에 놓
1079 고 O.C.T. compound로 포매하였다. 포매된 시료는 액체질소로 냉각된 butanol 용액
1080 으로 급속 동결시켰다. 이후, -70°C에 동결 보존된 동결절편 시료는 cryostat
1081 (LEICA CM1850)을 이용하여 6 μ m 두께로 절편 후, Hematoxylin and Eosin Y 염색하

1082 여 번식주기 및 소화맹낭 위축도 지수 판정을 하였고, neutral lipid, lipofuscin, N-
1083 acetyl beta-hexosaminidase (NAH) activity 염색을 실시하여 세포화학적 반응 분석을
1084 실시 하였다. 또한 H&E 염색된 슬라이드는 조직시료내 기생 생물 (Rickettsia like
1085 organisms (RLOs), Copepod, *Marteilioides* sp., and Metacestode etc.)의 유무를 관찰하여
1086 기록하였다.

1087

1088 **2.4. Cellular level analysis**

1089 **2.4.1. Cytochemical responses**

1090 **2.4.1.1. Neutral lipids (NL)**

1091 굴 소화맹낭 내 NL의 축적은 Krishnikumar et al. (1994)와 Moore (1988)의
1092 Oil Red O 염색법을 이용하여 분석하였다. 동결절편 된 슬라이드를 Baker's
1093 calcium-formol 용액 (4% formalin, 1% calcium chloride)에 4℃에서 10분간 고정하였
1094 다. 고정된 슬라이드는 증류수를 이용해 세척한 후, 60% triethyl phosphate에 3분간
1095 반응시켰다. 1% oil red O 용액 (1% oil red O in 60% triethyl phosphate)에 15분 동안 염
1096 색한 후, 60% triethyl phosphate 용액으로 30초간 세척 및 증류수로 세척하여
1097 glycerol gelatin을 이용해 봉입하였다. NL의 축적정도는 임의로 선정된 소화맹낭 4
1098 개 영역을 400배 배율의 동일한 조건에서 촬영하여 화상분석 소프트웨어 (Image
1099 Analyzing Software)를 이용하여 분석하였다.

1100

1101 **2.4.1.2. Lipofuscin (LF)**

1102 굴 소화맹낭 내 LF의 축적은 Krishnikumar et al. (1994)와 Moore (1988)의
1103 Schmorl's 염색법에 따라 분석하였다. 동결절편된 슬라이드를 Baker's calcium
1104 formal 용액에 4°C에서 10분간 고정하였다. 고정된 슬라이드는 증류수로 수세한
1105 후 Schmorl's 용액 (1% ferric chloride:1% potassium ferricyanide, 3:1 v/v)에 5분간 염색
1106 을 실시하였다. 염색된 슬라이드는 1% acetic acid 용액에 1분간 세척 후, 증류수로
1107 세척하여 glycerol gelatin으로 mounting하였다. LF의 축적 정도는 임의로 선정한 소
1108 화맹낭 4개 영역을 촬영하여 NL분석과 동일한 방법으로 화상분석에 이용하였다.

1109

1110 **2.4.1.3. Lysosomal membrane stability (LMS)**

1111 LMS는 인위적으로 리소솜 막을 불안정화하여, 리소솜 내 존재하는 N-
1112 acetyl beta-hexosaminidase (NAH)가 최대활성을 보이는 시간 (labilization period,
1113 minute)을 측정하여 결정하였다. 염색을 제외한 각 반응단계는 37°C에서 실시하였
1114 다. 연속절편된 슬라이드는 0.1M citrate buffer (pH 4.5, 2.5% NaCl)에 각각 0, 2, 5, 10,
1115 15, 20, 30분간 반응시켜 lysosomal membrane을 불안정화 하였다. 불안정화 된 슬라
1116 이드는 리소솜 막을 투과하는 기질이 포함된 용액에 20분간 반응시켰다. 이때, 리
1117 소솜 투과반응에 사용된 용액은 20 mg naphtol AS-BI N-acetyl beta-D-glucosaminide를

1118 2.5 ml 2-methoxy ethanol에 혼합한 후, 조직 유화제인 low viscosity polypeptide 3.5 g
1119 과 0.1M citrate buffer를 첨가하여 총 부피가 50 ml가 되도록 하였다. 반응이 완료
1120 된 슬라이드는 3% NaCl을 이용해 2분간 세척 후, diazonium salts (1 mg/ml fast violet
1121 B in 0.15M phosphate buffer)로 상온에서 염색하였다. 염색된 슬라이드를 즉시 증류
1122 수로 수세하고, Baker's calcium-formol 용액으로 4°C에서 10분간 고정하였다. 고정
1123 된 슬라이드는 세척 후 glycerol gelatin으로 mounting하여 NAH activity를 현미경으
1124 로 검경하였다 (Krishnakumar et al., 1994; Moore, 1988). NAH activity는 NL과 동일하
1125 게 임의로 선정된 소화맹낭 3개 영역을 촬영하여 화상분석에 이용하였다.

1126

1127 **2.4.1.4. Image analysis**

1128 이미지 분석은 Krishnakumar et al (1994)의 방법을 변형하여 실시하였다. NL
1129 및 LF와 LMS의 축적은 400X 배율에서 Motic Image Plus 2.0 소프트웨어를 이용해
1130 빛의 강도와 노출정도, white balance를 동일하게 고정하여 촬영하였다. 촬영된 이
1131 미지는 Image J 1.44 (NIH) 프로그램을 이용하여 면적을 다음과 같이 측정하였다.
1132 촬영된 이미지를 8 bit gray scale로 변화하여 gray 상수가 0 (clear, white)에서 255
1133 (dark, black) 단계로 구분할 수 있게 변환한 후, 이미지의 크기를 320 x 240 pixel로
1134 변환하였다. 변환된 이미지 내 염색이 되지 않은 background를 threshold를 이용해

1135 제거하였고, 이 때 threshold 값은 모든 이미지에 동일하게 적용하였다. 이후,
1136 background가 제거된 이미지 내 검은색 점의 면적을 측정하여 pixel density를 나타
1137 내었다.

1138

1139 **2.4.2. Hemocyte parameter**

1140 2012년 10월 광양만 10개 지역에서 채집된 굴의 혈구는 다음과 같이 수집
1141 하였다. 생체정보학적 측정을 완료한 굴을 개각 후 즉시 패각근으로부터 주사기
1142 (22G” 1/2)를 이용하여 혈림프액을 취하였고, 응집을 방지하기 위해 얼음에 보관
1143 된 1.5 ml 튜브에 보관하였다. 수집된 혈림프액은 총혈구수, 사망률 및 DNA 손상
1144 도, 식세포능력, Neutral Red Retention time 측정에 이용하였다.

1145

1146 **2.4.2.1. Cell count**

1147 수집된 혈림프액 (150 μ l)에 동량의 3% formalin에 혼합하여 혈구를 고정 한
1148 하였후, double strand DNA에 결합하는 형광성 염색시약 SYBR green I (Sigma-Aldrich,
1149 USA, 1,000 \times)을 첨가하여 상온의 암실에서 2시간 동안 반응시켰다. 형광염색된 혈
1150 구는 유세포 분석기 (FACS Calibur flow cytometer, Becton-Dickinson, USA)를 이용하
1151 여 SYBR green I에 염색된 세포들만을 선택하였다. 총 혈구의 수를 측정하기 위하
1152 여 총 10,000개의 세포수를 계수한 시간을 기록하였고, 1 ml 당 혈구의 수를 계산

1153 은 다음과 같다.

1154

1155 총 혈구수 = $10,000/(A \times B) \times C$

1156 이 때, A는 10,000개의 혈구세포를 측정하는 시간이며, B는 1분당 유세포 분석기의

1157 유속, C는 희석배수이다.

1158

1159 **2.4.2.2. Cell mortality and DNA damage**

1160 혈구 사망률과 DNA 손상도는 세포막이 불안정하여 막을 투과하여 DNA

1161 이중가닥에 부착하는 형광색소인 propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, USA)를 이용하

1162 여 실시하였다. 혈구 사망률은 150 μ l의 혈림프액에 동량의 항응고제 (Anti-

1163 aggregant solution, containing 2.5% NaCl and 1.5% EDTA in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)

1164 와 3 μ l의 PI를 혼합 후, 4 $^{\circ}$ C의 암실에서 10분간 반응시켜 준비하였다. 반응이 완

1165 료된 혈림프액은 유세포 분석기의 FL-3 detector를 이용하여 PI에 과하게 염색된

1166 혈구만을 선택한 후, 전체 혈구 수에 대한 비율을 계산하여 산출하였다. 혈구 세

1167 포의 DNA 손상도는 다음과 같이 수행되었다. 수집된 혈림프액 (150 μ l)에 차가운

1168 absolute ethanol (900 μ l)을 혼합하고, -20 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 permeabilization 시켰다.

1169 반응이 완료된 혈림프액은 원심분리 (3,000 rpm, 10 min) 후, 상등액을 제거하고

1170 PBS 용액에 두 차례 세척 및 재부유하였다. 이 후, RNase A (5 μ l, 10 mg/ml)를 첨가

1171 하여 30분간 반응시키고, PI (final concentration: 50 µg/ml)와 혼합하여 상온의 암실에
1172 서 30분간 반응시켰다. 유세포 분석기를 이용한 혈구의 DNA 손상도는 다음과 같
1173 이 산출되었다. 유세포 분석기의 FSC/SSC dot plot에서 혈구 세포만을 선택한 후,
1174 FL-3/Count histogram에서 cell cycle을 작성한 후, DNA가 손상된 sub G0-G1 부분에
1175 해당하는 혈구를 정량하고 전체 혈구와의 비율로 계산하였다.

1176

1177 **2.4.2.3. Phagocytosis ability**

1178 혈구 식세포율은 형광 bead (fluorescent bead; 2.0 µm diameter, Polyscience Inc.)
1179 를 식작용한 혈구의 수를 계수하여 산출하였다. 수집한 혈림프액 (150 µl)에 동량
1180 의 멸균여과해수를 혼합하고, 2%로 희석된 형광 bead를 30 µl 첨가하여 실온의 암
1181 실에서 120분간 식세포 작용을 유도하였다. 유세포 분석기를 이용하여 FSC/FL-1
1182 dot plot에서 형광 bead를 식작용한 혈구만을 선택한 후, FL-1/Count histogram에서
1183 형광 bead 를 3개 이상 식작용한 혈구를 계수, 전체 혈구 중 차지하는 비율로 나
1184 타내었다.

1185

1186 **2.4.2.4. Neutral red retention time**

1187 혈구 세포의 lysosomal membrane stability를 확인하기 위해 lysosome을 특이
1188 적으로 염색할 수 있는 Neutral Red (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 평가하였다.

1189 수집된 혈림프액 (100 μ l)에 동량의 항응고제와 neutral red solution (200 μ g/ml)을 실
1190 온의 암실에서 30분간 반응 시켰다. 반응이 완료된 후, 15분 간격으로 현미경 하
1191 에서 시료당 25개의 혈구를 무작위로 선택하여 관찰하였다. 이 때, 혈구 내
1192 lysosomal membrane이 약해져 neutral red가 혈구 세포 밖으로 빠져나가는 비중이
1193 약 50%가 되었을 때의 시간을 측정하여 평가하였다.

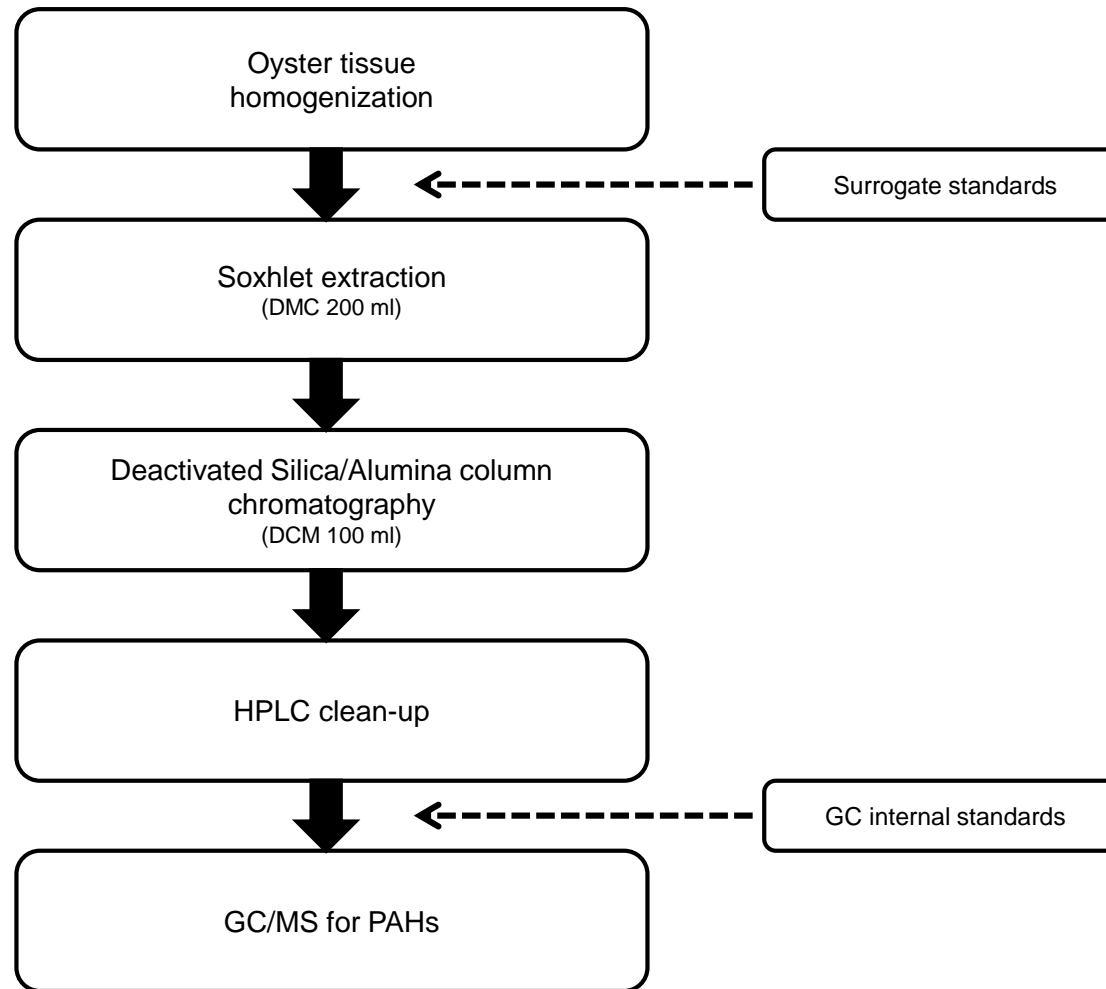
1194

1195 **2.5. Pollutant deposition in the oyster tissue**

1196 **2.5.1. PAHs concentration in oyster tissue**

1197 지역별 굴 시료 내 존재하는 PAHs 농도는 한국해양과학기술연구원 남해
1198 해양연구소에서 분석을 실시하였다. 굴 체내 PAHs 농도를 측정하기 위한 분석과
1199 정은 크게 시료 추출, 정제, 기기분석의 3단계로 이루어지며, 이에 대한 모식도는
1200 Fig. 3-3에 나타내었다. 동결건조된 굴 분말은 지역별 10개체씩 모아 약 1 g 정도
1201 의 건시료를 준비하였다. 준비된 시료에 200 ml의 디클로르메탄으로 16시간 동안
1202 속실렛 (Soxhlet) 추출하였다. 추출 전 분석 화합물에 대한 내부표준물질 (surrogate
1203 standards, Table 3-3)을 첨가하여 회수율을 구하는데 사용하였다. 속실렛 추출된 추
1204 출액은 쿠데르나데니쉬 농축기 (Kuderna-Danish concentrator)를 이용하여 1~2 ml 수
1205 준으로 농축하였다. 추출액에 포함된 무기 황은 활성화된 구리를 사용하여 제거

1206 하였다. 무기황이 제거된 추출액은 비활성화된 실리카/알루미나 컬럼을 사용하여
1207 1단계 정제를 거쳤다. 실리카/알루미나 컬럼에는 10 g 알루미나 (1% 수분함량)와
1208 20 g 실리카겔 (5% 수분함량)을 차례로 충전하며, 100 ml 디클로르메탄으로 시료
1209 추출액을 용출시켰다. 용출액은 회전 농축기로 농축한 후 고순도액체크로마토그
1210 래피 (HPLC; Phenomenex 사의 Phenogel 100Å 이 충전된 250 x 22.5 mm i.d. size-
1211 exclusion column)에 통과시켜 분취 및 추가 정제단계를 실시하였다. 추가정제된
1212 분액은 회전용매농축기를 사용하여 1~2 ml 수준으로 농축 후, 노말헥산 15 ml로
1213 치환하였다. 노말헥산으로 치환된 시료는 고순도 질소가스 (N₂, 99.999%)를 이용
1214 하여 0.5 ml로 농축시킨 후 기체크로마토그래프 내부표준용액 (GC internal standard)
1215 을 첨가한 후 GC-vial에 옮겨 기기분석을 하였다. PAHs 분석에 사용된 가스크로마
1216 토그래피-질량분석기 (GC-MS)의 조건은 Table 3-4에 기술하였다.



1217

1218 **Fig. 3-3.** Schematic diagram of PAHs analysis of the oyster tissues.

1219

1220 **Table 3-3.** Surrogate internal standards and GC internal standard for the analysis of PAHs of oyster tissue.

Surrogate standard	GC internal standard
naphthalene- <i>d</i> ₈	terphenyl- <i>d</i> ₁₄
acenaphthene- <i>d</i> ₁₀	
phenanthrene- <i>d</i> ₁₂	
chrysene- <i>d</i> ₁₀	
perylene- <i>d</i> ₁₂	

1221

1222

1223 **Table 3-4.** Analytical conditions of GC/MS for PAHs.

GC condition (HP GC 5890)

Column	DB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm Film)
temperature program	60°C (2 min) → 6°C/min to 300°C → 300°C (13 min)
Carrier gas	He 1.0 ml/min
Injection port Temp	300°C
Injection mode	splitless
Injection volume	2 µl

MS condition (HP MS 5972)

Interface Temp	280°C
Ionization Voltage	70 eV
Monitoring method	Selected Ion Monitoring

1224

1225

1226 **2.5.2. Heavy metals concentration in oyster tissue**

1227 지역별 굴 시료 내 중금속 농도는 국립수산과학원 어장환경과에서 분석을
1228 수행하였다. 굴 체내 중금속 농도는 유도결합플라즈마질량분석기 (ICP-MS,
1229 PerkinElmer Co., Model Elan DRC-e)와 금아말감수은분석기 (Automatic mercury
1230 analyzer, Milestone, Model DMA-80)를 이용하여 아연 (Zn) 및 구리 (Cu), 철 (Fe), 카
1231 드뮴 (Cd), 납 (Pb), 비소 (As), 크롬 (Cr) 그리고 수은 (T-Hg)을 다음과 같은 방법
1232 으로 분석하였다. 동결건조된 굴 분말은 지역별 10개체씩 모아 약 1 g 정도의 건
1233 시료를 준비하였다. 준비된 시료에 질산 10 ml을 첨가하여 80℃에서 400분간 반응
1234 시킨 후, 100℃에서 150분간 가열하여 질산을 증발하였다. 시료의 완전한 분해를
1235 위해 위 과정은 2번 반복하여 수행되었다. 질산 증발 후 남은 시료는 2% HNO₃
1236 용액에 녹이고 GF/F 여과지로 여과하여 100 ml의 혼합물을 취하여 분석에 이용하
1237 였다. 수은을 제외한 금속원소들은 ICP-MS로 Table 3-5과 같은 조건에서 분석하였
1238 고, 분석의 정도관리 (Qa/Qc)를 위해서 시료 15개 마다 표준물질 (DORM-3, NRC)
1239 3개씩 시료와 동일한 과정으로 분석하였다. 수은은 동결건조한 시료 약 0.03 g을
1240 금아말감수은분석기로 직접 분석하였다.

1241 **Table 3-5.** Analytical conditions of ICP-MS for heavy metals.

ICP-MS (Perkin Elmer, Elan DRC-e)		
Plasma condition		
ICP power		1200 W
Vacuum pressure		2.0×10^{-6} Torr
Lens voltage		5.75 Volts
Pulse stage voltage		1080 Volts
Discriminator Threshold		17
Nebulizer & Cooling system		
Main water temp.		20.9°C
Ar gas flow		0.97 L min^{-1}
Peristaltic pump speed		20 rpm
Data acquisition		
Measurement mode		Dual
number of sweeps		10
Replicates		5

1242

1243

1244 **2.6. Environmental factor**

1245 이 연구에서는 굴의 채집 현장에서 환경요인 조사가 동시에 수행되지 못
1246 하였다. 따라서 조사된 생리학적 연구 결과와 환경요인과의 상관관계를 분석하기
1247 위해, 한국해양과학기술원의 “남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발” 연구 보
1248 고서 (한국해양연구원, 2012)에 수록된 수질 분석 결과를 인용하였다. 굴의 채집시
1249 기와 가장 근접한 시기에 분석된 2012년 5월에 조사된 결과를 인용하였으며, 굴
1250 채집 장소와 가장 가까운 지점의 환경요인 분석 데이터를 이용하였다 (Table 3-6).
1251 외만에 위치한 계동, 방죽포, 울림리의 경우, 한국해양과학기술원의 연구보고서에
1252 서 일치하는 결과가 없었다. 따라서 연구보고서에서 보고한 수질 데이터의 지역
1253 별 변화 방향을 유념하여 임의의 수치를 기입하여 통계 분석에 활용하였다. 굴
1254 체내 중금속 농도 및 PAHs 함량은 이 연구에서 분석된 연구 결과의 평균값을 이
1255 용하였다.

1256

1257 **Table 3-6.** Seawater parameters measured by MEHI (2012) and heavy metal concentration and PAHs in oyster tissue measured in this study.

Sampling site	Site No. from MEHI report (2010)	Ammonia	Nitrate	Phosphate	Chl-a	POC	SS	DO	pH	Cu	Cd	Pb	Cr	As	Zn	Fe	T-Hg	Total PAHs	16 PAHs	Alkylated PAHs
		μ mol/L	μ mol/L	μ mol/L	μg/L	mg/L	mg/L	mg/L			mg/kg dw	mg/kg dw	mg/kg dw	mg/kg dw	mg/kg dw	mg/kg dw	mg/kg dw	mg/kg dw	ng/g dw	ng/g dw
YC	3	5.64	12	1.1	3	0.2	50	7.14	7.8	186.74	3.27	1.13	1.77	7.64	1354.21	153.54	0.06	174.3328	48.38153	125.9513
CN	1	4	10	1	2	0.2	40	7.14	7.9	266.78	5.43	1.28	1.93	9.23	3378.39	154.24	0.14	195.261	59.49034	135.7707
JD	6	3	10	0.9	1.5	0.2	50	7	7.9	163.73	2.16	0.81	1.94	15.9	2713.51	158.39	0.05	132.4495	44.48866	87.96088
WL	9	3	10	1.1	1.5	0.2	40	7	7.8	256.08	2.72	1.28	2.03	16.41	2689.45	166.77	0.05	491.1691	115.5865	375.5826
SD	16	3	6	0.8	1.5	0.15	40	7	7.9	103.71	1.89	0.91	1.85	17.37	1211.1	84.48	0.02	122.8108	53.1253	69.68553
MS1	17	3	6	0.8	1.5	0.15	40	7	7.9	158.46	2.35	1.16	2.09	15.69	2014.74	109.07	0.04	189.3515	68.27373	121.0778
MS2	19	3	6	0.8	1	0.2	50	7.14	7.9	66.92	1.63	0.93	1.75	12.64	1129.79	65.46	0.03	206.5904	78.7608	127.8296
GD	-	(2)	(5)	(0.6)	(0.5)	(0.2)	(50)	(7.14)	(7.9)	143.39	2.51	1.39	1.46	12.38	1463.32	89.68	0.03	195.0533	80.32978	114.7235
BJ	-	(2)	(5)	(0.6)	(0.5)	(0.2)	(50)	(7.14)	(7.9)	90.29	3.98	0.94	1.72	10.17	1232.34	107.48	0.02	93.32794	45.74377	47.58417
YL	-	(2)	(5)	(0.6)	(0.5)	(0.2)	(50)	(7.14)	(7.9)	148.57	3.55	1.78	1.85	13.45	1697.08	146.07	0.02	152.0874	82.09526	69.99216

1258

1259

1260 **2.7. Statistics analysis**

1261 각 지역별 분석된 항목은 one-way ANOVA 분석을 통해 유의성 검정을 하
1262 였고, Duncan test를 통해 $p < 0.05$ 수준에서 유의차를 나타내었다. 이후, 환경요인과
1263 굴의 번식생리 변화와의 상관관계를 분석하기 위해 주좌표분석 (Principal
1264 coordinates analysis, PCO)을 PRIMER software (version 6.1)을 이용하여 수행하였고,
1265 수행 방법은 Part 2에서와 같다. 다만, 수질 환경요인은 한국해양과학기술원의 수
1266 질 분석 자료 (한국해양연구원, 2012)와 이 연구에서 분석된 굴 체내 PAHs 및 중
1267 금속 농도를 환경요인으로 이용하였다.

1268

1269

1270 **3. Results**

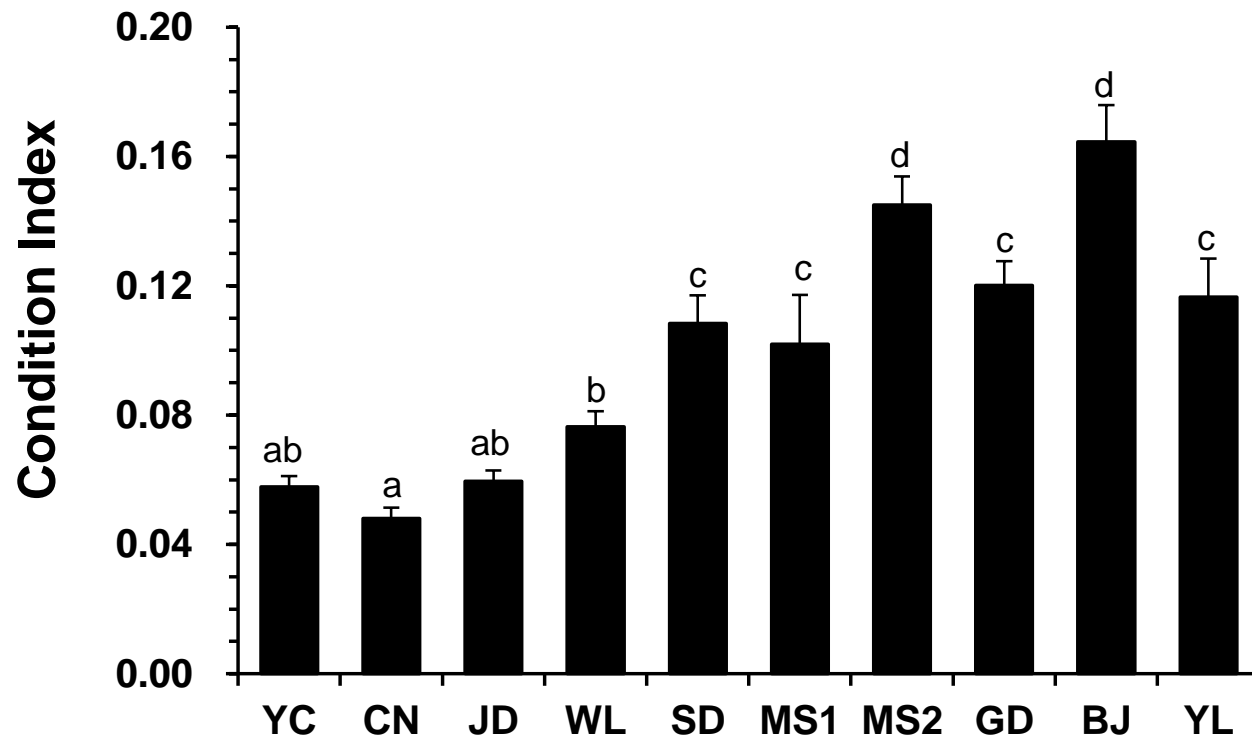
1271 **3.1. Individual levels**

1272 **3.1.1. Condition index and physiological index**

1273 2012년 10월 광양만 내만으로부터 외만으로 10개 정점에서 채집된 굴의
1274 비만도는 Fig. 3-4에서 보는 바와 같이 지역별 차이가 관찰되었다. 내만에 위치한
1275 초남대교에 서식하는 굴의 비만도가 0.048 ± 0.003 으로 가장 낮은 비만도를 갖는
1276 것으로 조사되었으며, 외만의 방죽포에 서식하는 굴의 비만도가 0.165 ± 0.011 로
1277 가장 높았다. 광양만에 서식하는 굴의 비만도는 내만에서 낮고 외만으로 갈수록

1278 유의적으로 높아지는 경향을 보였다 ($p<0.05$).

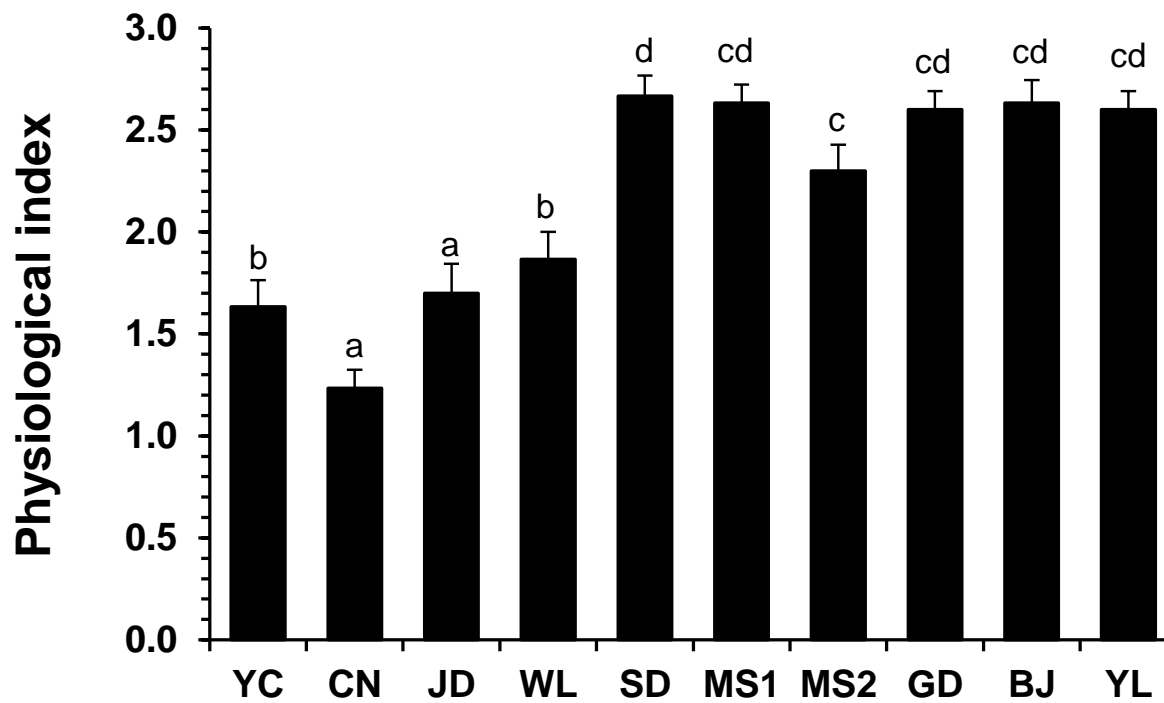
1279 육안으로 관찰한 PI 역시 비만도 결과와 동일하게 내만에서 낮고 외만에
1280서 높은 지수를 갖는 것으로 조사되었다 ($p<0.05$) (Fig. 3-5). 내만의 초남대교에서
1281채집된 굴의 PI가 1.2 ± 0.1 로 가장 낮은 수치로 육질이 watery한 상태임을 알 수
1282있다. 반면, 광양만 중앙부에 위치한 신덕리에 서식하는 굴의 PI가 2.7 ± 0.1 로 가
1283장 높았고, 외만에 위치한 나머지 지역에서는 2.3 ± 0.1 (무슬목)- 2.6 ± 0.1 (만성리 및
1284계동, 방죽포, 울림리)의 범위로 높은 PI 지수를 보였다.



1285

1286 **Fig. 3-4.** Condition index of *C. gigas* collected from Gwangyang bay in 2012. Data expressed as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$.

1287



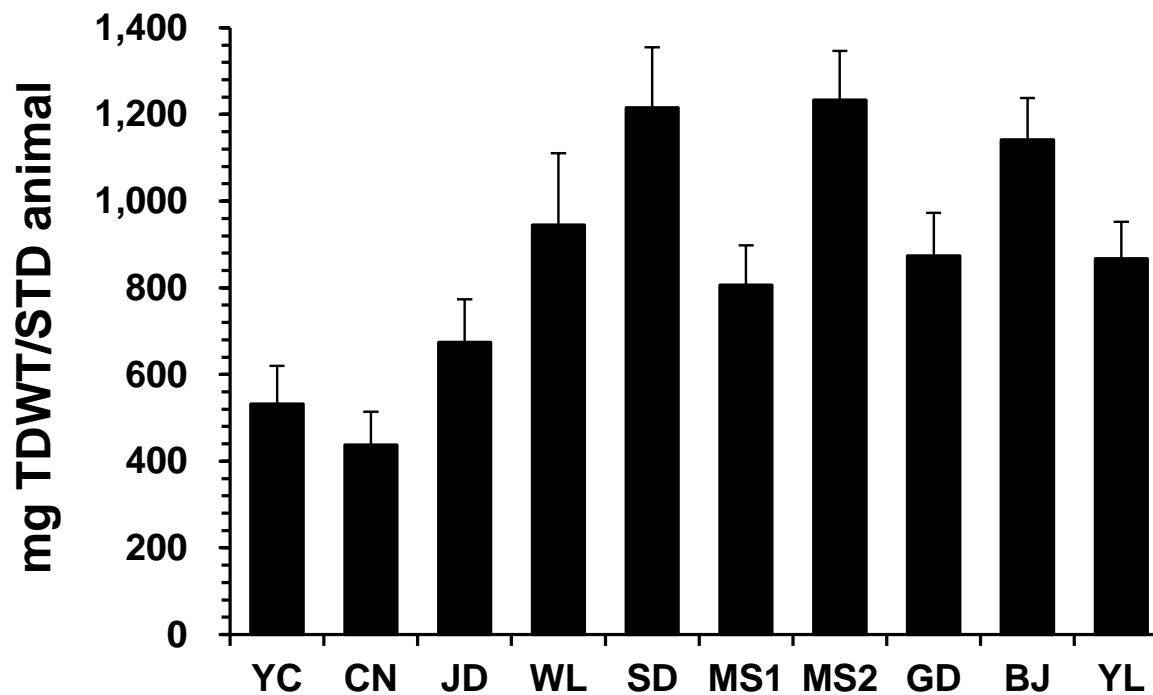
1288

1289 **Fig. 3-5.** Physiological index of *C. gigas* sampled from Gwangyang bay in 2012. Data expressed as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$.

1290

1291 **3.1.2. Tissue dry weight of standard animal**

1292 10개 지역에서 채집된 굴의 평균 크기인 각고 60.3 mm를 기준으로 표준동
1293 물의 건중량을 산출한 결과, Fig. 3-6에서 보는 바와 같다. 표준동물의 건중량은 비
1294 만도와 PI결과와 같이, 내만에 위치한 초남대교에 서식하는 굴이 437.8 ± 76.3 mg
1295 으로 가장 낮은 건중량을 갖는 것으로 조사되었으며, 무슬목에 서식하는 굴이
1296 1233.1 ± 113.6 mg으로 가장 높은 건중량을 지닌 것으로 조사되었다. 특히, 외만의
1297 신덕리와 무슬목, 방죽포에 서식하는 굴의 건중량은 초남대교 굴에 비해 약 2.6-
1298 2.8배 이상의 무게를 지닌 것으로 조사되었다.



1299

1300 **Fig. 3-6.** Tissue dry weight of the standard animal (60.3 mm SH) examined in this study. Data expressed as mean \pm 95% confidence interval.

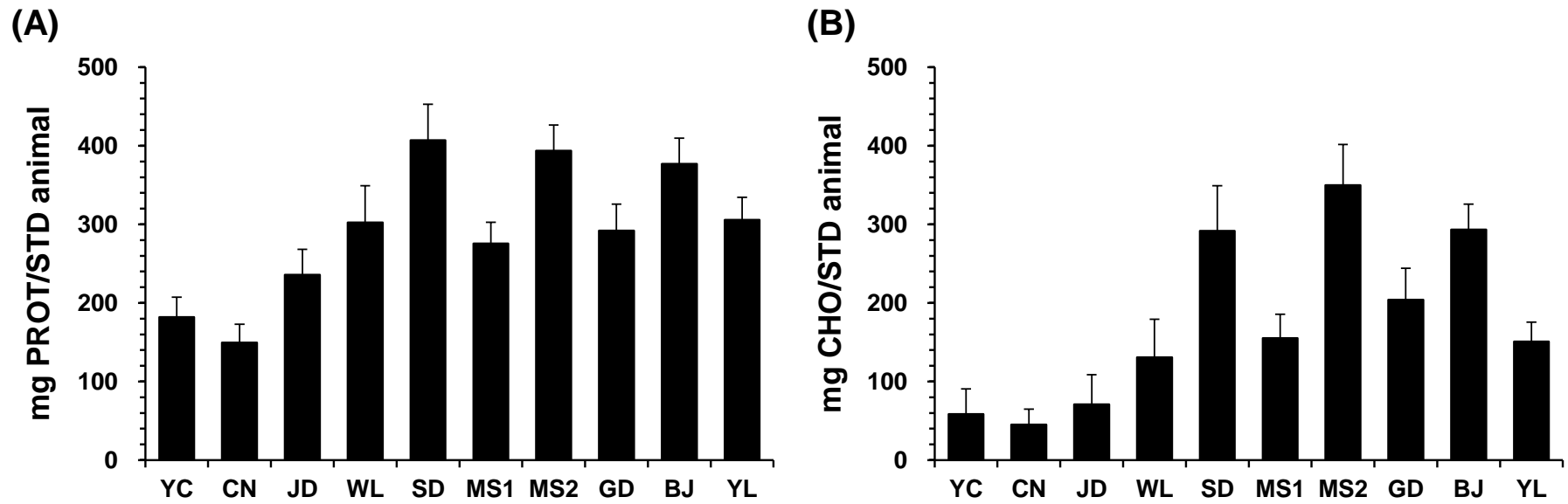
1301

1302 **3.2. Tissue levels**

1303 **3.2.1. Biochemical composition of standard animal**

1304 표준동물의 체내 총단백질과 총탄수화물 함량은 건중량 결과와 비슷한 패
1305 턴의 결과가 도출되었다 (Fig. 3-7). 총단백질 함량의 경우, 내만에 위치한 초남대
1306 교에서 149.6 ± 23.2 mg으로 가장 낮은 함량을 지닌 것으로 조사되었고, 신덕리에
1307 서 406.8 ± 46.1 mg으로 가장 높은 함량을 지녔다. 특히 신덕리와 무슬목, 방죽포에
1308 서식하는 굴의 경우에는, 건중량의 결과에서와 같이, 초남대교 굴에 비해 약 2.5-
1309 2.7배 높은 총단백질 함량을 지닌 것으로 조사되었다 (Fig. 3-7A).

1310 총탄수화물 함량 역시, 총단백질 함량 결과와 같이, 내만의 초남대교에서
1311 45.0 ± 20.0 mg으로 가장 낮고, 무슬목에서 349.7 ± 51.9 mg으로 가장 높은 함량을
1312 지녔다. 특히 총탄수화물 함량의 경우, 신덕리와 무슬목, 방죽포에 서식하는 굴은
1313 초남대교 굴에 비해 약 6.5-7.8배 높은 함량을 지닌 것으로 조사되어, 지역별 차이
1314 가 크게 나타나는 것으로 조사되었다 (Fig. 3-7B).



1315

1316 **Fig. 3-7.** Total protein (A) and total carbohydrate (B) of the standard animal (60.3 mm SH) measured in this study. Data expressed as mean \pm

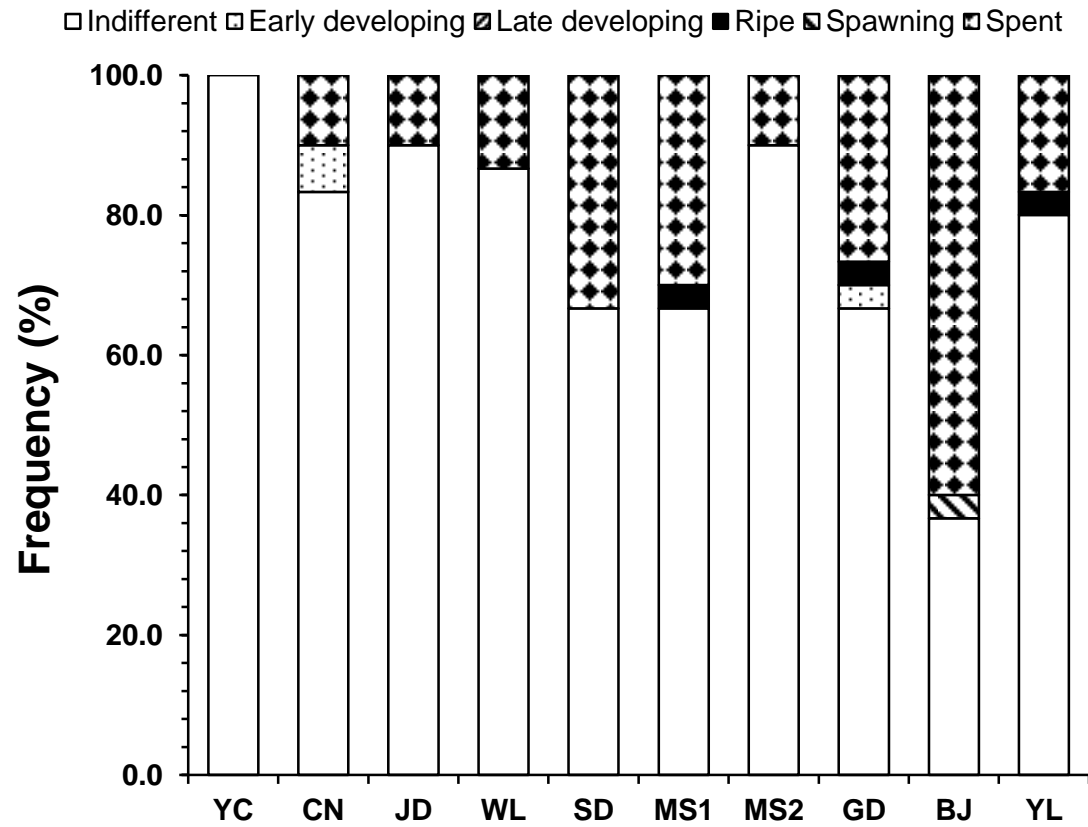
1317 95% confidence interval.

1318

1319 **3.2.2. Gametogenic stage and histopathological observation**

1320 2012년 10월 광양만 10개 지역에서 채집된 굴의 생식소 발달단계는 Fig. 3-
1321 8에서 보는 바와 같다. 내만에 위치한 울촌면과 초남대교, 중동, 월내동의 경우
1322 약 80% 이상의 대부분의 굴이 미분화기 (indifferent stage)이었으며, 일부 개체가
1323 산란후기 (spent stage)인 것으로 조사되었다. 반면, 외만에 위치한 신덕리 및 만성
1324 리, 무슬목, 계동, 방죽포, 울림리에 서식하는 굴의 경우, 미분화기 단계의 굴이
1325 36.7-90.0%였으며, 10.0-60.0의 높은 비율의 개체가 산란후기의 단계로, 내만에 비
1326 해 다소 낮은 생식소 발달단계를 보였다.

1327 조직병리학적 관찰 결과, Table 3-7에서 보는 바와 같이 RLOs 및 copepod,
1328 *Marteilioides* sp., Metacestode의 4종류 기생생물이 관찰되었다. 그러나 신덕리에서
1329 RLOs의 감염율이 20%였던 것을 제외한, 모든 지역에서 각 기생생물의 감염율이
1330 10% 미만으로 낮게 조사되었고, 지역별 및 내만과 외만의 뚜렷한 패턴은 관찰되
1331 지 않았다.



1332

1333 **Fig. 3-8.** Frequency distribution of gonad developmental stages of *C. gigas* collected from Gwangyang bay in 2012.

1334

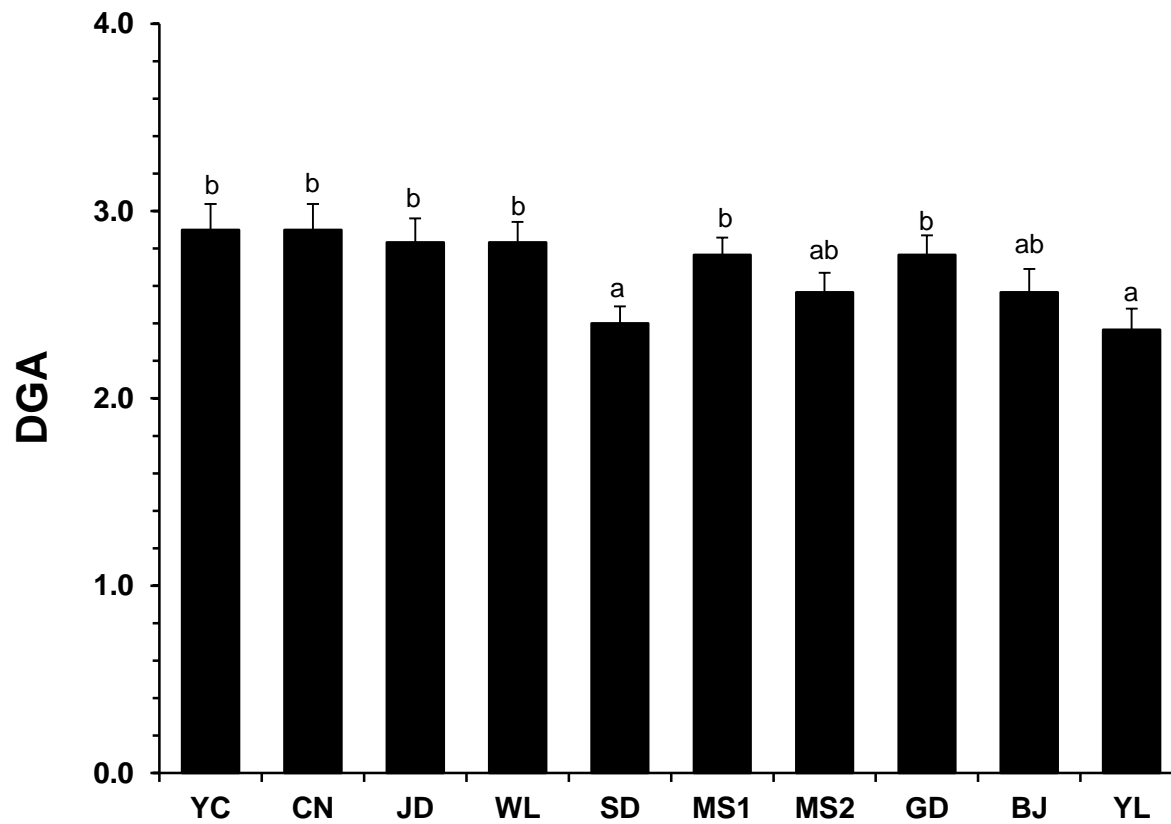
1335 **Table 3-7.** The prevalence of parasitic infection in oyster surveyed in 2012.

Site	N	Prevalence (%)			
		RLOs	Copepod	<i>Marteilioides</i> sp.	Metacestode
YC	30	0.0	6.7	3.3	0.0
CN	30	6.7	0.0	6.7	0.0
JD	30	10.0	0.0	0.0	6.7
WL	30	10.0	0.0	0.0	6.7
SD	30	20.0	0.0	0.0	0.0
MS1	30	3.3	0.0	6.7	3.3
MS2	30	0.0	0.0	0.0	0.0
GD	30	0.0	3.3	6.7	0.0
BJ	30	6.7	0.0	3.3	0.0
YL	30	3.3	0.0	3.3	0.0

1336

1337 **3.2.3. Digestive gland atrophy (DGA)**

1338 소화맹낭 위축도는 이매패류의 연안환경 인자가 미치는 스트레스나 먹이
1339 량을 간접적으로 알 수 있는 지표로, 수치가 높을수록 스트레스를 받은 것을 의
1340 미한다. 광양만 10개 지역에서 채집된 굴의 소화맹낭 위축도 지수 조사 결과는
1341 Fig. 3-9과 같다. 내만에 위치한 울촌면과 초남대교에서 2.9 ± 0.14 로 가장 높은 위
1342 축도 지수를 보였고, 외만에 위치한 신덕리에서 2.4 ± 0.09 , 울림리에서 2.4 ± 0.11 로
1343 가장 낮았다.



1344

1345 **Fig. 3-9.** Digestive gland atrophy of *C. gigas* collected from Gwangyang bay in 2012. Data expressed as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$.

1346

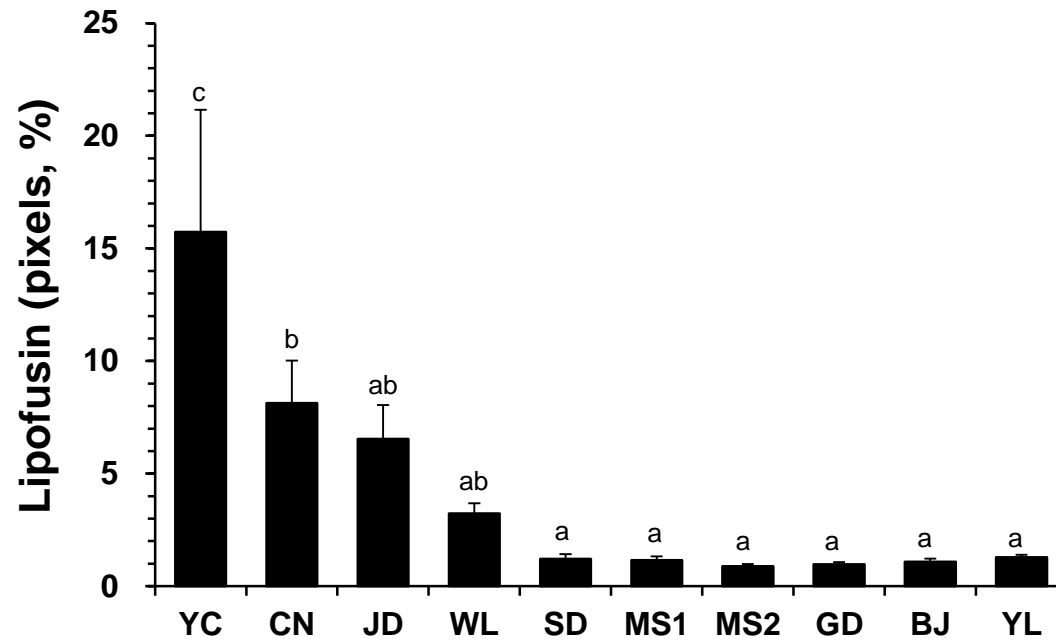
1347 **3.3. Cellular levels**

1348 **3.3.1. Cytochemical responses**

1349 **3.3.1.1. Lipofuscin (NF) and neutral lipid (NL) in digestive gland cells of oyster**

1350 소화맹낭 세포의 리소솜 내 NF 축적량은 Fig. 3-10에서 보는 바와 같다. 광
1351 양만 내만에 위치한 울촌면에 서식하는 굴이 15.73 ± 5.43 pixels로 가장 높게 조사
1352 되었고, 이어 초남대교와 중동이 각각 8.13 ± 1.89 pixels, 6.54 ± 1.51 pixels의 순으로
1353 외만에 비해 유의적으로 높게 조사되었다 ($p < 0.05$). 외만에 서식하는 굴의 소화맹
1354 낭의 리소솜 내 NF 축적량은 2.0 pixels 미만으로 무슬목에서 가장 낮은 $0.89 \pm$
1355 0.09 pixels로 조사되었다.

1356 소화맹낭 세포의 리소솜 내 NL 축적량은 LF 결과와는 상반된 양상을 보
1357 였다. Figure 3-11에서 보는 바와 같이, 내만에 위치한 울촌면, 초남대교, 중동, 월
1358 내동의 경우, 5.0 pixels 미만의 낮은 축적 정도를 보였고, 특히 울촌면에 서식하는
1359 굴이 1.14 ± 0.70 pixels로 가장 낮았다. 가장 높은 NL 축적량은 외만의 방죽포에
1360 서식하는 굴이 25.71 ± 6.72 pixels로 가장 높았다.

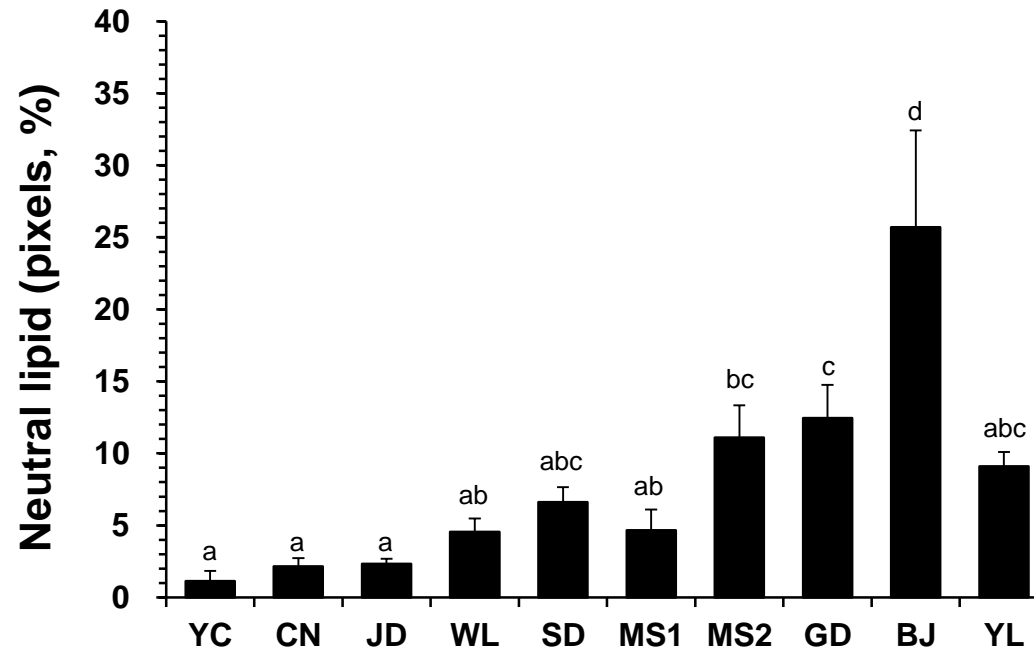


1361

1362 **Fig. 3-10.** Lipofusin contents in the digestive gland cells of oyster tissue section examined in this study. Data expressed as mean \pm SE,

1363 ANOVA, $p < 0.05$.

1364



1365

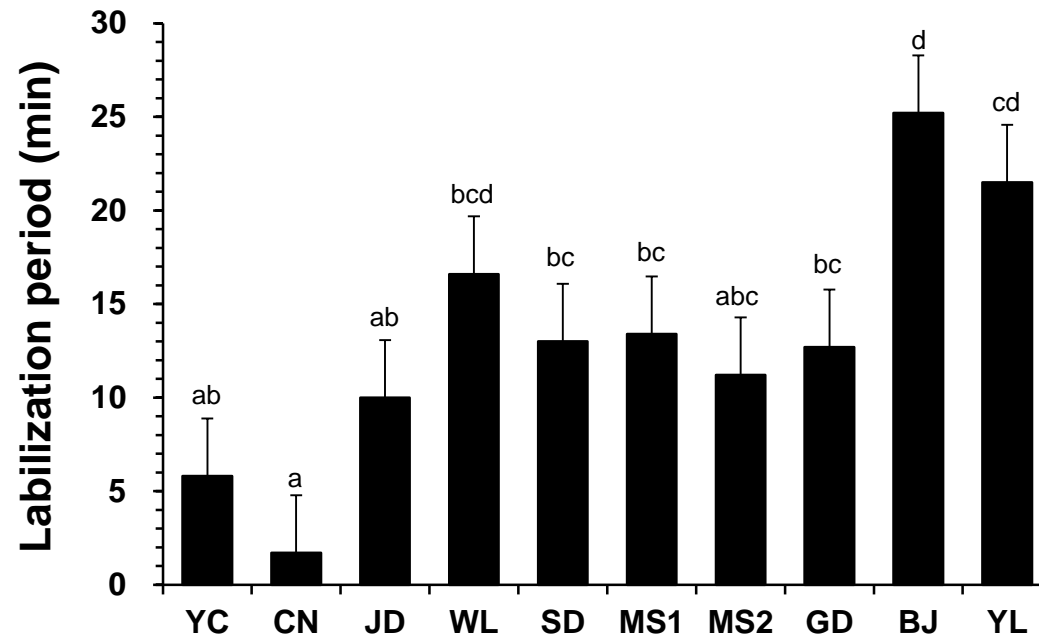
1366 **Fig. 3-11.** Neutral lipid contents in the digestive gland cells of oyster tissue section measured in this study. Data expressed as mean ± SE,

1367 ANOVA, $p < 0.05$.

1368

1369 **3.3.1.2. Lysosomal membrane stability (LMS) of digestive gland cells**

1370 광양만 10개 지역에서 채집된 굴의 소화맹낭 세포 내 리소솜 막 안정성
1371 평가 결과는 Fig. 3-12에 나타내었다. 그 결과, 내만에 위치한 울촌면 및 초남대교,
1372 중동의 굴이 외만의 방죽포와 울림리에서 채집된 굴에 비해 유의적으로 짧은 리
1373 소솜 막 불안정화 시간 (labilization time, min)을 갖는 것으로 조사되었다. 특히 내
1374 만의 초남대교에 서식하는 굴의 경우, 리소솜 막 불안정화 시간이 1.70 ± 1.05 min
1375 으로 가장 짧은 시간을 기록하였고, 외만의 방죽포에서 채집된 굴은 25.20 ± 3.26
1376 min으로 가장 긴 시간을 기록하였다.



1377

1378 **Fig. 3-12.** Labilization period of oysters estimated by NAH activity. Data expressed as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$.

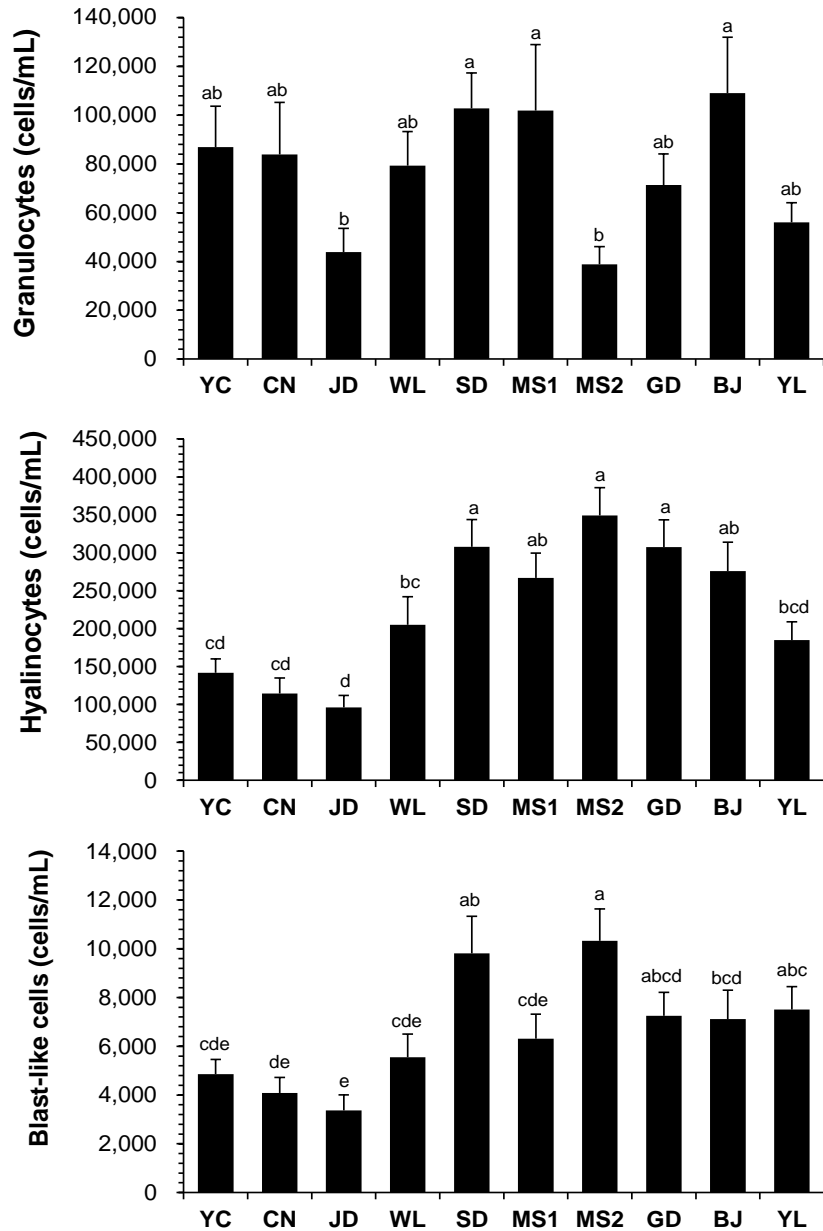
1379

1380 **3.3.2. Hemocyte parameter**

1381 **3.3.2.1. Cell count**

1382 총 혈구수는 유세포 분석기를 이용하여 굴 혈구의 형태 및 크기, 내부 밀
1383 도에 따라 granulocytes, hyalinocytes, blast-like cells의 3 종류로 구분하였고, 구분된
1384 종류별 혈구수는 Fig. 3-13에 나타내었다. 이 중 hyalinocytes의 구성 비율은 평균
1385 69.4%로 가장 많았으며, granulocytes가 평균 22.6%, blast-like cells가 3.0%의 구성비
1386 를 갖고 있었다. 지역별 혈구의 수를 비교해본 결과, granulocyte는 내만과 외만간
1387 의 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, 중동과 무슬목에서 각각 $43,904 \pm 9,672$
1388 cells/ml, $38,824 \pm 7,326$ cells/ml로 가장 적은 granulocyte 수를 지녔다. Hyalinocytes
1389 와 blast-like cells의 경우는 내만에서 유의적으로 적은 세포수를 지닌 것으로 조사
1390 되었다. Hyalinocytes의 경우, 내만의 울촌면과 초남대교, 중동에서 150,000 cells/ml
1391 이하의 적은 세포수를 지녔으며, 특히 중동에서 채집된 굴은 $96,006 \pm 15,988$
1392 cells/ml로 가장 적은 세포수를 지녔다. 반면, 무슬목에서 채집된 굴은 $349,098 \pm$
1393 $36,546$ cells/ml로 가장 높은 세포수를 지닌 것으로 조사되었고, 이는 중동 굴에 비
1394 해 약 3.6배 많은 세포수였다. Blast-like cells의 경우에도 내만의 울촌면과 초남대
1395 교, 중동에서 6,000 cells/ml 이하의 적은 세포수를 지녔으며, 중동에서 채집된 굴
1396 이 $3,374 \pm 634$ cells/ml로 가장 적은 세포수를 지닌 것으로 조사되었다. 가장 많

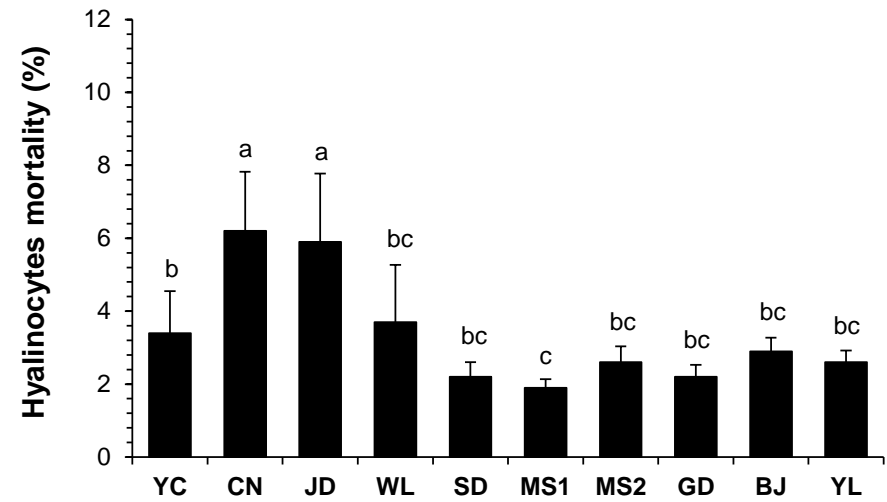
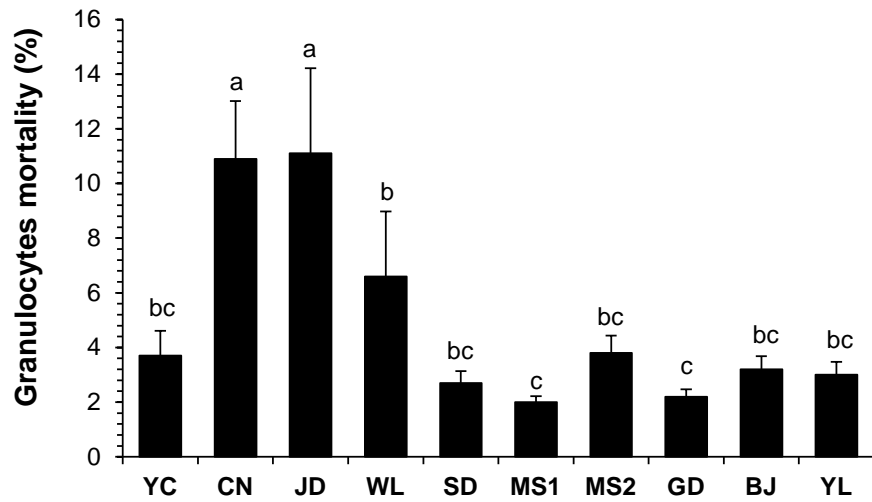
1397 은 blast-like cells가 조사된 지역은 외만의 무슬목에서 채집된 굴로, $10,323 \pm 1,313$
 1398 cells/ml 이었고, 이는 중동 굴에 비해 약 3.1배 많은 세포수였다.



1399
 1400 **Fig. 3-13.** Hemocyte counts of *C. gigas* collected from Gwangyang bay in 2012. Three
 1401 populations of hemocytes were distinguished. Data expressed as mean \pm SE,
 1402 ANOVA, $p < 0.05$.
 1403

1404 **3.3.2.2. Cell mortality**

1405 지역별 혈구의 사멸률은 Fig. 3-14에서 보는 바와 같이, granulocyte와
1406 hyalinocyte 모두 내만에서 유의적으로 높은 사멸률을 보였다. Granulocyte의 경우,
1407 내만의 초남대교와 중동 굴이 각각 $10.9 \pm 2.1\%$, $11.1 \pm 3.1\%$ 로 외만의 다른 지역
1408 에 비해 유의적으로 높았다. 외만에서는 대부분 5.0% 미만의 사멸률이 관찰되었
1409 으며, 특히 만성리 굴이 $2.0 \pm 0.2\%$ 로 가장 낮았다. Hyalinocyte의 경우, 내만의 초
1410 남대교와 중동에서 각각 $6.2 \pm 1.2\%$, $5.9 \pm 1.3\%$ 로 외만에 비해 유의적으로 높았
1411 다. 외만에서 채집된 굴의 Hyalinocyte 사멸률을 대부분 3.0% 미만으로, 만성리 굴
1412 이 $1.9 \pm 0.2\%$ 로 가장 낮았다.



1413

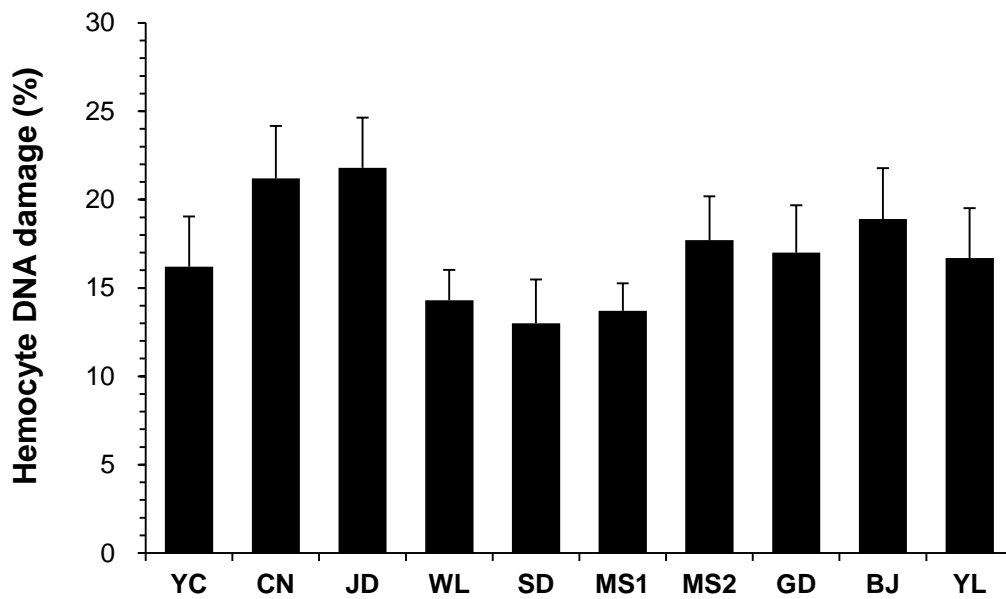
1414 **Fig. 3-14.** Hemocyte mortality of *C. gigas* sampled from Gwangyang bay in 2012. Data expressed as mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$.

1415

1416 **3.3.2.3. DNA damage**

1417 광양만 10개 지역에서 채집된 굴의 혈구 DNA 손상도는 Fig. 3-15에서 보
1418 는 바와 같다. 내만의 초남대교와 중동에서 각각 $21.2 \pm 3.0\%$, $21.8 \pm 2.8\%$ 로 타
1419 지역에 비해 높은 비율이 관찰되었고, 외만의 신덕리 굴이 $13.0 \pm 2.5\%$ 로 낮은
1420 수치가 조사되었다. 그러나 지역별 혈구 DNA 손상도는 통계학적 유의차는 관찰
1421 되지 않았다 ($p=0.1150$).

1422



1423

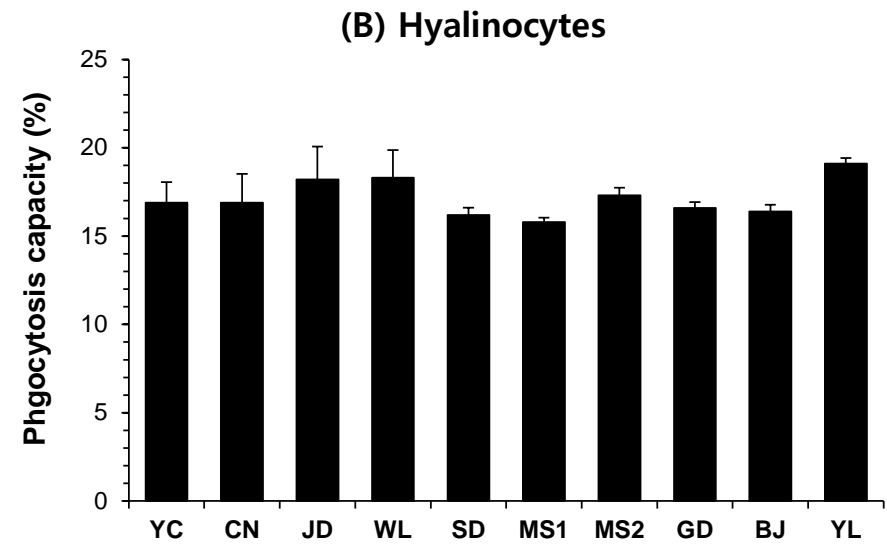
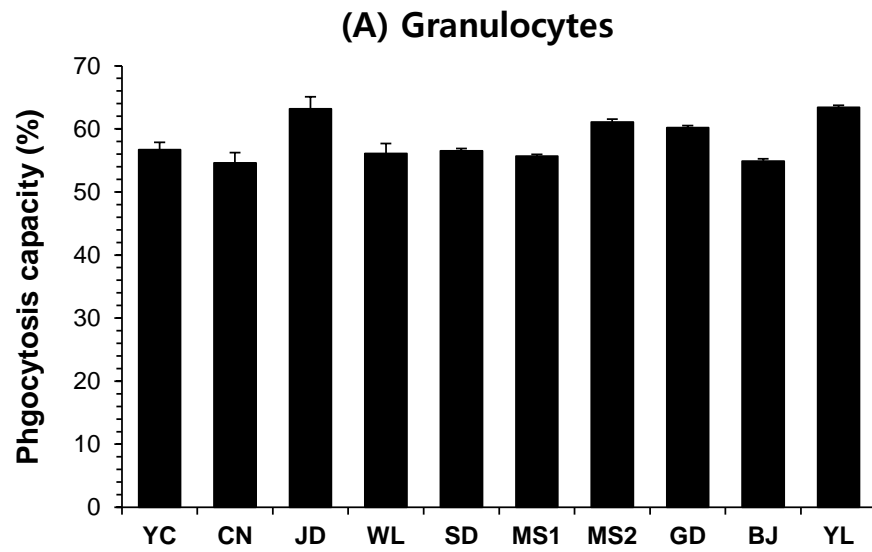
1424 **Fig. 3-15.** Hemocyte DNA damage of *C. gigas* collected from Gwangyang bay in 2012. Data
1425 expressed as mean \pm SE.

1426

1427

1428 **3.3.2.4. Phagocytosis capacity**

1429 혈구 집단별 형광 bead의 식작용 능력을 조사한 결과, Fig. 3-16에서 보는
1430 바와 같이, granulocyte가 hyalinocyte 보다 약 3.1-3.6배 높은 식작용 활성을 보였다.
1431 지역별 굴 혈구의 식세포율을 조사한 결과, granulocyte의 경우, $54.6 \pm 3.6\%$ (초남
1432 대교)- $63.4 \pm 2.0\%$ (울림리)의 범위로 유의적 차이는 관찰되지 않았다 ($p=0.0933$)
1433 (Fig. 3-16A). 지역별 굴의 hyalinocyte 식세포율의 경우, $15.8 \pm 0.8\%$ (만성리)- 19.1
1434 $\pm 1.0\%$ (울림리)의 범위로, granulocyte의 식세포율과 같이 지역간 유의적 차이는
1435 관찰되지 않았다 ($p=0.5518$) (Fig. 3-16B).



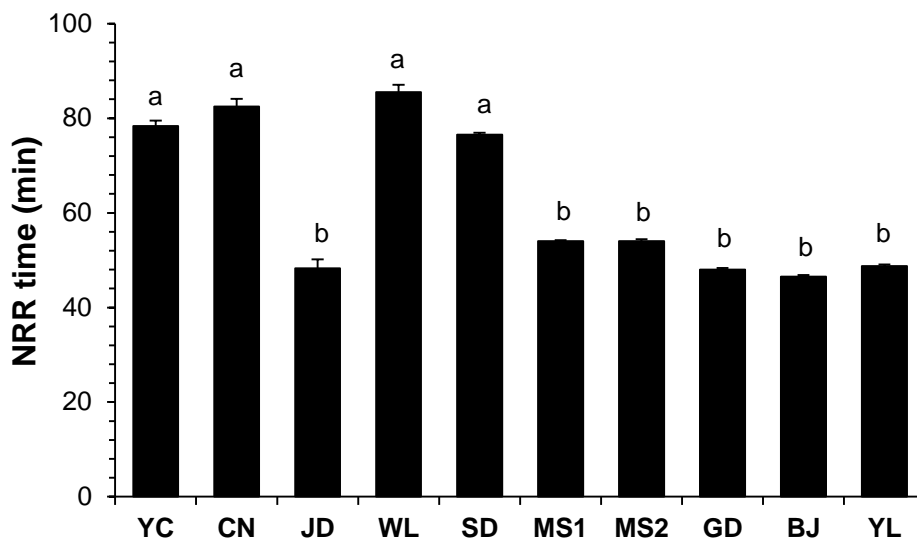
1436

1437 **Fig. 3-16.** Phagocytosis capacity of *C. gigas* hemocyte populations. Data expressed as mean \pm SE.

1438

1439 **3.3.2.5. Neutral red retention time (NRR time)**

1440 혈구의 리소솜 막 안정성 (lysosomal membrane stability)은 neutral red가 리소
1441 솜 막을 빠져나오는 시간을 관찰하여 평가하였으며, 그 결과는 Fig. 3-17과 같다.
1442 Retention time은 짧을수록 리소솜 막이 상대적으로 불안정 함을 의미한다. 중동을
1443 제외한 내만 울촌면과 초남대교, 월내동, 외만의 신덕리 굴 혈구의 NRR time은 60
1444 min 이상의 시간이 걸렸고, 특히 월내동 굴 혈구의 NRR time이 85.5 ± 8.4 min으
1445 로 가장 긴 시간이 걸렸다. 내만의 중동을 비롯한 외만의 만성리, 무슬목, 계동,
1446 방죽포, 울림리 굴 혈구의 NRR time은 60 min 이하로, 방죽포 굴 혈구의 NRR time
1447 이 46.5 ± 6.5 min으로 가장 짧은 시간이 걸렸다.



1448 **Fig. 3-17.** Neutral red retention time of *C. gigas* examined in this study. Data expressed as
1449 mean \pm SE, ANOVA, $p < 0.05$.
1450
1451

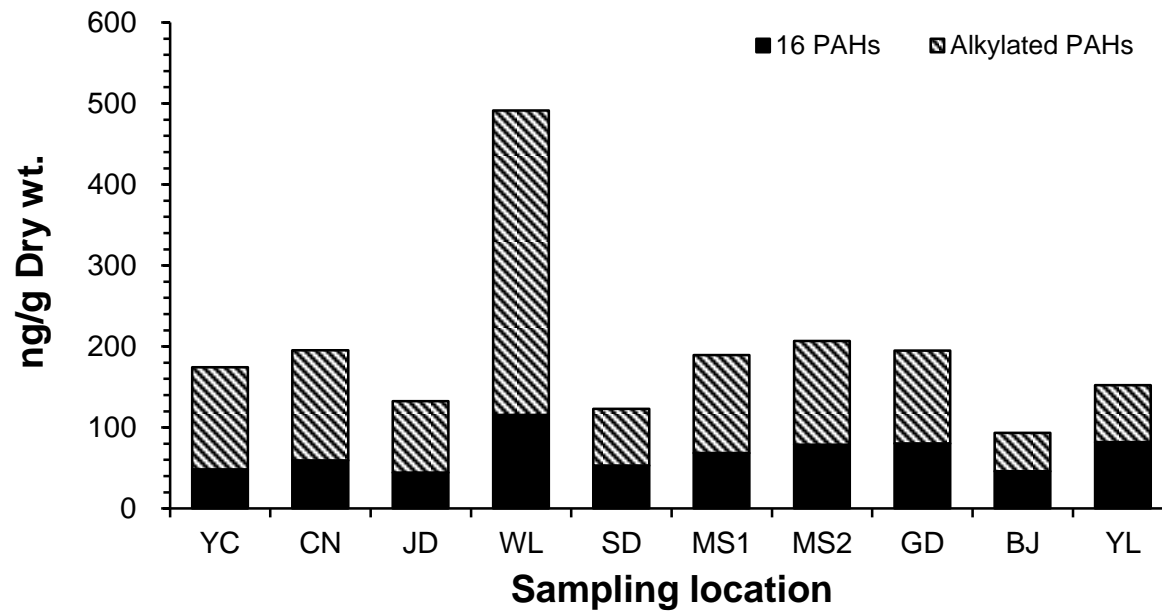
1452 **3.4. Pollutant depositions in oyster tissue**

1453 **3.4.1. PAHs concentration**

1454 광양만 10개 지역에서 채집된 굴 체내 총 PAHs 함량은 최소 93.3 ng/g
1455 TDWT (방죽포)에서 최대 491.2 ng/g TDWT (월내동)의 범위로, 월내동을 제외한 나
1456 머지 지역에서 대부분 210 ng/g TDWT 이하의 낮은 함량을 보였다 (Fig. 3-18). 굴
1457 체내 PAHs 분석은 연소기원의 16종 PAHs와 유류계의 알킬 PAHs를 모두 분석하
1458 였다. 16종 PAHs의 경우, 월내동을 제외한 나머지 지역에서 44.5 ng/g TDWT (중
1459 동)-82.1 ng/g TDWT (울림리)의 범위로 100 ng/g TDWT의 낮은 함량으로 조사되었
1460 고, 월내동의 경우 115.6 ng/g으로 가장 높은 체내 함량을 보였다. 굴 체내 알킬
1461 PAHs 함량 역시 16종 PAHs 양상과 비슷하였다. 월내동을 제외한 나머지 지역에
1462 서 47.6 ng/g TDWT (방죽포)-135.8 ng/g TDWT (초남대교)의 범위였고, 월내동에 서
1463 식하는 굴은 375.6 ng/g TDWT로 가장 높은 함량을 보였다.

1464 PAHs 함량이 가장 높았던 월내동과 가장 낮은 방죽포의 16종 PAHs와 알
1465 킬 PAHs 조성은 Fig. 3-19에서 보는 바와 같이 다르게 조사되었다. 월내동 굴 체
1466 내에서는 phenanthrene과 dibenzothiophene과 같은 고분자 화합물이 알킬화
1467 (alkylation)된 화합물이 높게 분포하였다 (Fig. 3-19A). 반면, 방죽포 굴 체내에서는
1468 naphthalene과 1-methylnaphthalene과 같은 저분자 화합물 혹은 알킬화 되지 않은

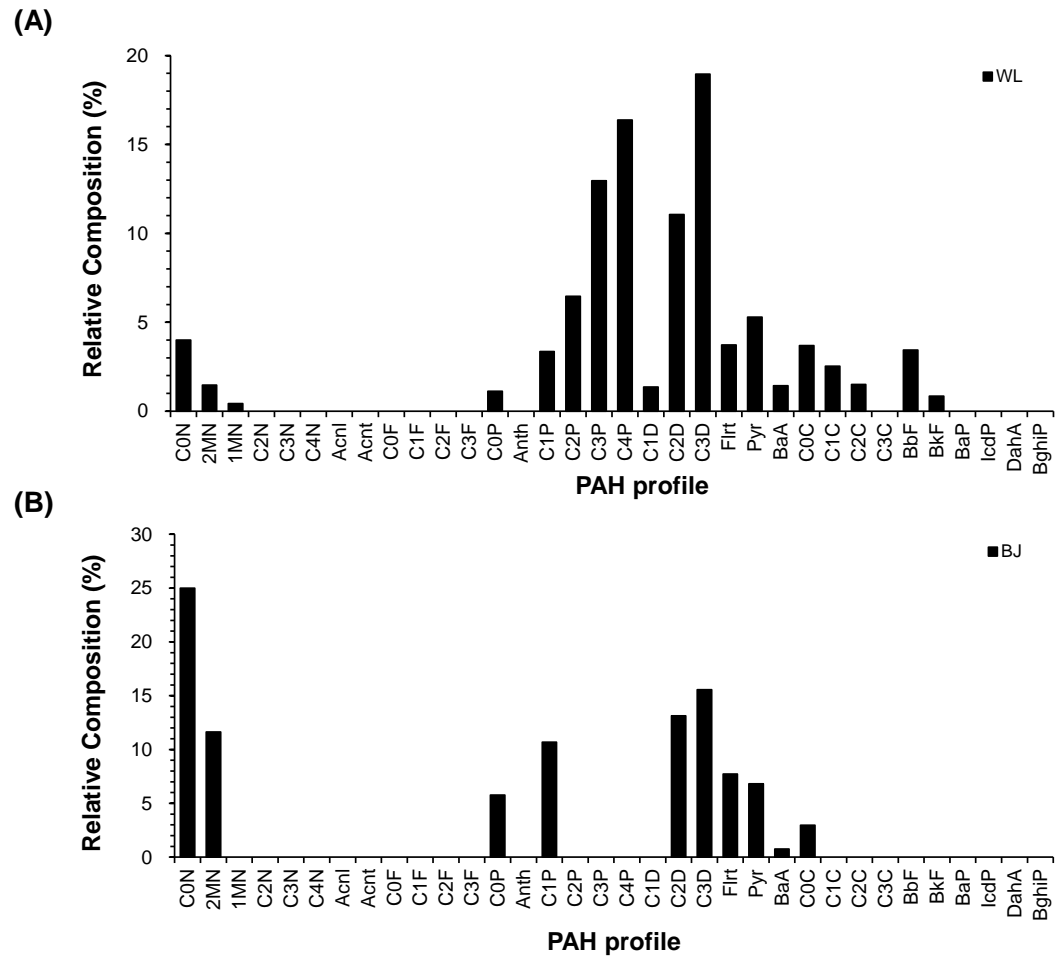
1469 고분자 화합물이 높은 비율로 분포하는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 3-19B). 월
1470 내동을 제외한 나머지 지역에서의 PAHs 조성은 대부분 방죽포 굴과 비슷한 조성
1471 을 보였다 (data not shown).



1472

1473 **Fig. 3-18.** Distribution of PAHs concentration in oyster tissues collected from Gwangyang bay in 2012.

1474

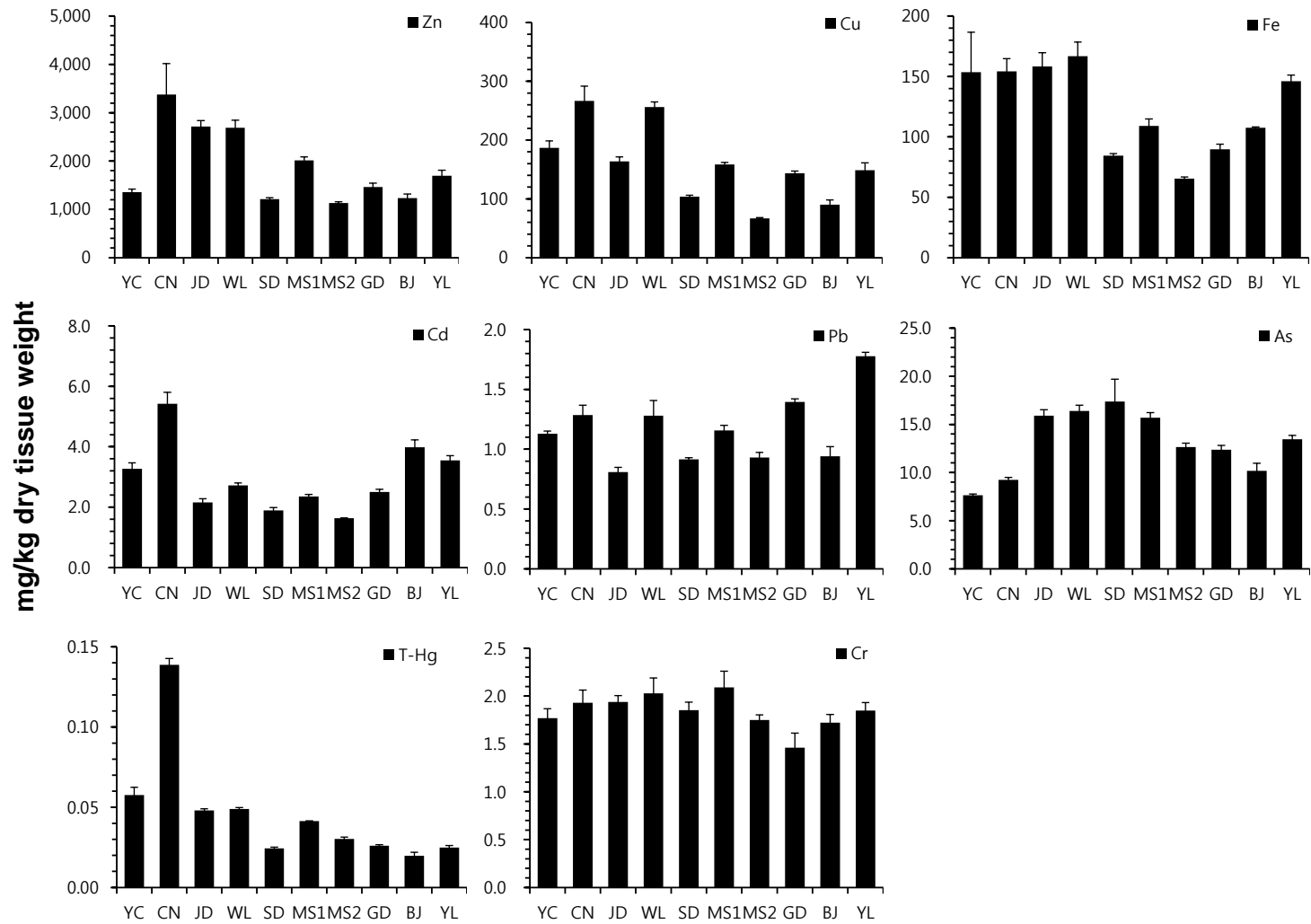


1475

1476 **Fig. 3-19.** Composition profile of PAHs concentration in oyster tissues collected from Gwangyang bay in 2012; (A) oysters from Wollae-
 1477 Dong, (B) oysters from Bangjukpo.

1478 **3.4.2. Heavy metal concentration**

1479 지역별 굴 체내 중금속 농도는 Fig. 3-20에 나타내었다. 굴 체내에 가장 높
1480 은 농도를 지닌 것은 아연 (Zn)으로 1129.79 ± 26.87 mg/kg TDWT (무슬목)- $3378.39 \pm$
1481 639.30 mg/kg TDWT (초남대교)의 범위였다. 이어 구리 (Cu)가 66.92 ± 1.37 mg/kg
1482 TDWT (무슬목)- 266.78 ± 24.82 mg/kg TDWT (초남대교), 철 (Fe)이 65.46 ± 1.42 mg/kg
1483 TDWT (무슬목)- 166.77 ± 11.73 mg/kg TDWT (월내동)의 범위 순이었다. 지역별 굴
1484 체내 중금속 농도는 아연 (Zn)과 구리 (Cu), 철 (Fe), 카드뮴 (Cd), 수은 (T-Hg)의
1485 경우 내만에서 높은 농도인 것으로 조사되었고, 납 (Pb)과 비소 (As), 크롬 (Cr)의
1486 경우는 내만에서 외만으로의 뚜렷한 패턴이 관찰되지는 않았다. 특히 내만의 초
1487 남대교 굴의 경우에는 비소 (As)를 제외한 대부분의 중금속이 다른지역에 비해
1488 높은 농도를 지닌 것으로 조사되었다.

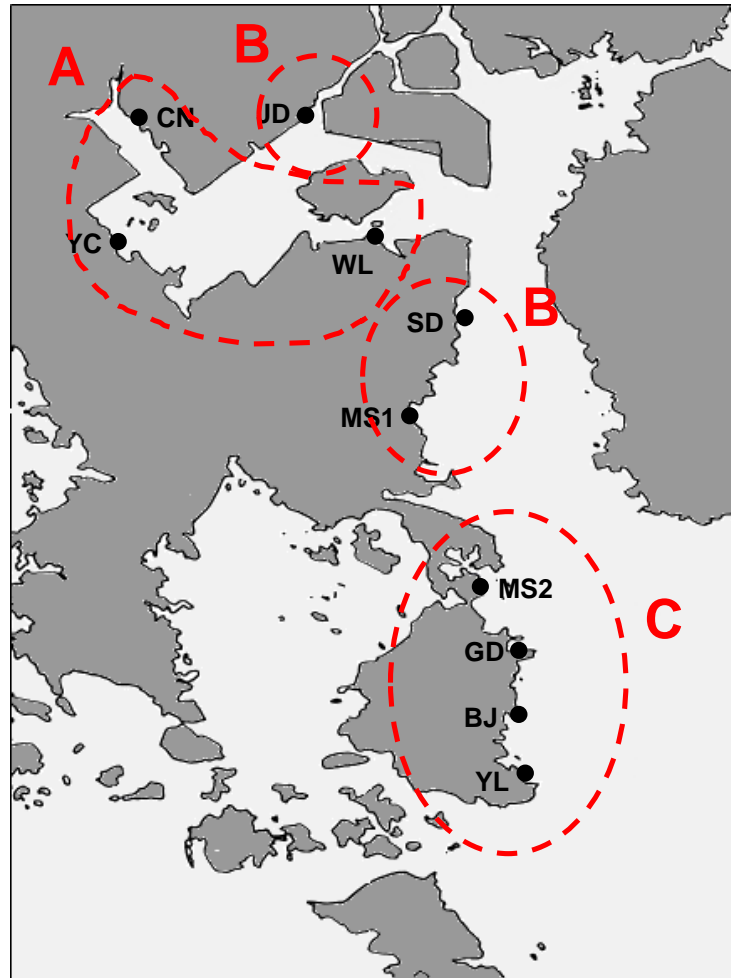


1489

1490 **Fig. 3-20.** Concentration of each heavy metal in oyster tissue collected from Gwangyang bay in 2012.

1491 **3.5. Principal coordinates (PCO) analysis**

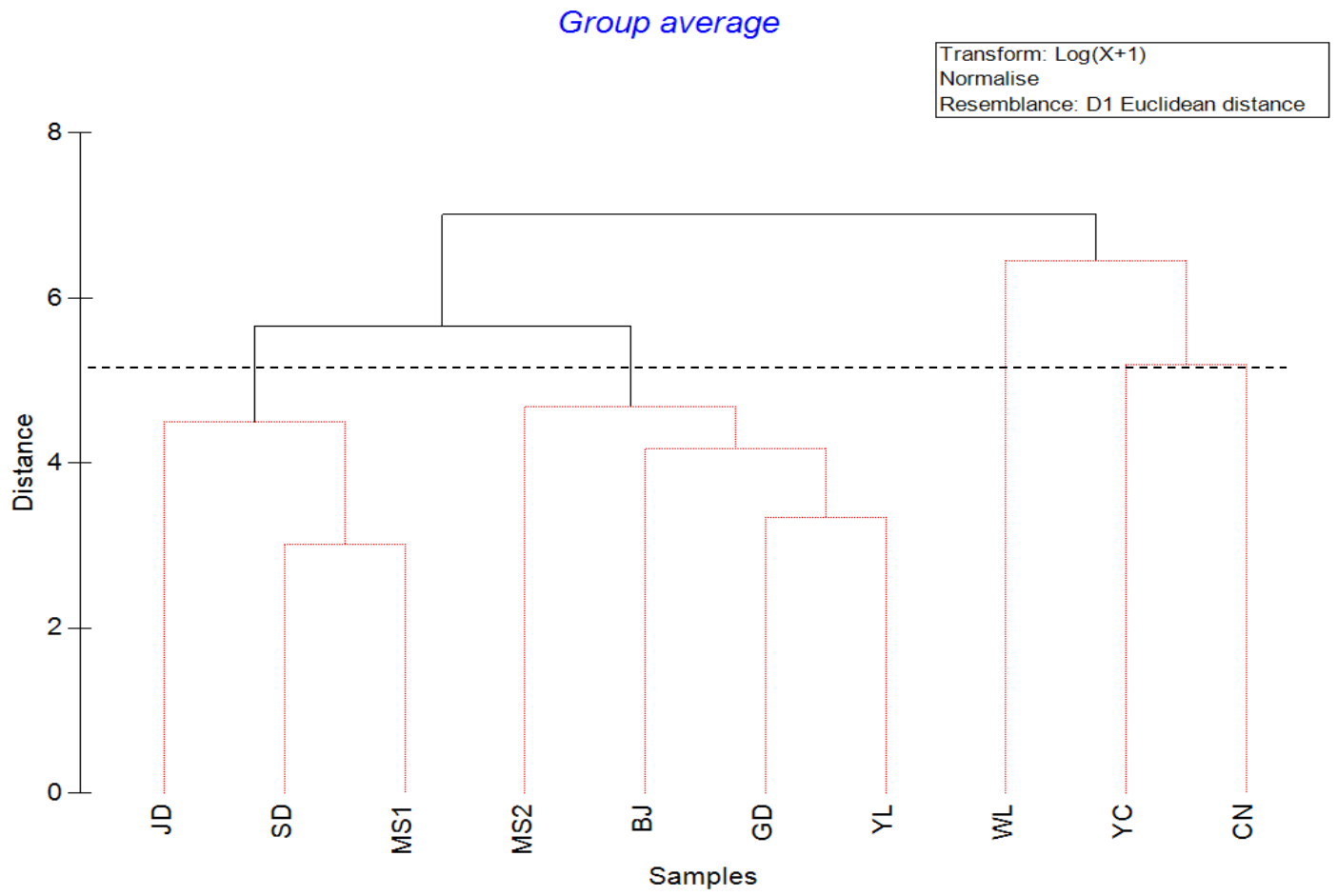
1492 광양만 내만에서 외만으로의 10지역에 대한 서식지역의 유사성을 확인하
1493 기 위해, 한국해양과학기술원의 남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발 연구보
1494 고서 (한국해양연구원, 2012)에서 발췌한 수질 자료와 이 연구에서 분석된 굴 체
1495 내 중금속 농도 및 PAHs 함량을 이용하여 D1 Euclidean distance 분석 결과 Fig. 3-
1496 21과 Fig. 3-22와 같은 지역그룹으로 구분할 수 있었다. 생리학적 요인 분석 결과
1497 를 기준으로 Bray-Curtis similarity 분석 결과, 환경 자료를 기준으로 Euclidean
1498 distance 분석 결과와 다소 차이가 있었으나, 지역그룹의 구분은 동일하였다 (data
1499 not shown). 지역 유사성 분석 결과, 광양만 내만에 위치한 울촌면 및 초남대교,
1500 월내동의 지역그룹과 광양만 중부의 중동 및 신덕리, 만성리, 외만의 4개 조사 지
1501 역의 3개 지역그룹으로 구분할 수 있었다 (Fig. 3-21와 Fig. 3-22). 이와 같은 지역
1502 그룹 구분에 기여하는 상위 3개 요인을 확인하기 위해 SIMPER test를 통해 확인
1503 하였고, 그 결과는 Table 3-8에 정리하였다. 광양만 내만 해역과 외만 해역의 환경
1504 요인의 차이는 As와 같은 중금속과 Phosphate, Chl-a, Nitrate, 및 POC와 같은 영양
1505 염류의 차이에 기인한 것으로 확인되었다. 또한 내만과 외만의 생리학적 차이는
1506 리소솜 활동 및 굴 체내 저장물질인 총탄수화물의 차이에 기인된 것으로 확인되
1507 었다.



1508

1509 **Fig. 3-21.** Map showing groups of locations clustered by Euclidean distance.

1510



1511

1512 **Fig. 3-22.** Dendrogram of the hierarchical clustering of sampling sites of Gwangyang bay based on Euclidean distance.

1513

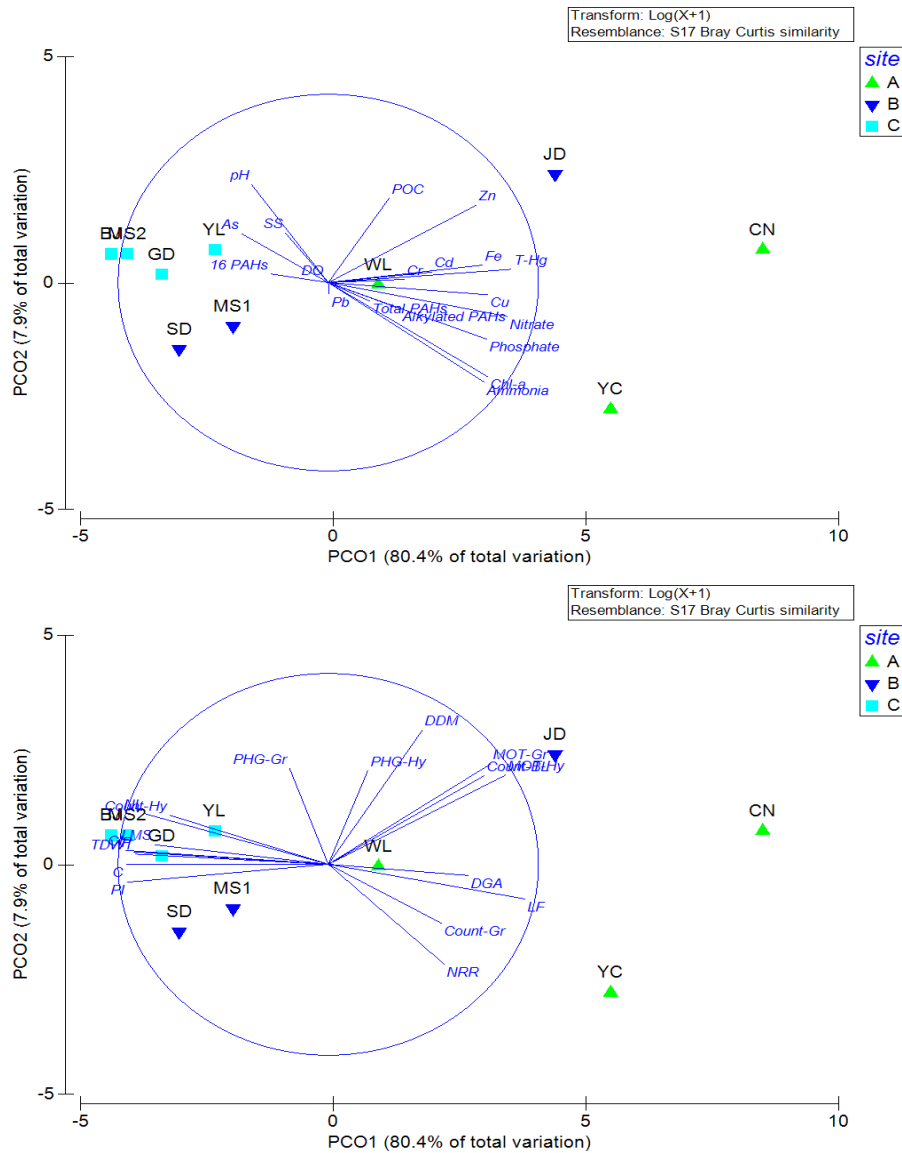
1514 **Table 3-8.** Results of SIMPER test showing the main contribution factors within the location groups in Gwangyang bay.

Gwangyang Bay (Environmental factor)			Gwangyang Bay (Biological factor)		
Variable	Average squared distance	Contribution (%)	Variable	Average dissimilarity	Contribution (%)
<i>Group A & B</i>			<i>Group A & B</i>		
As	4.03	9.51	LF	1.07	15.27
pH	3.75	8.86	C	0.86	12.18
POC	3.75	8.86	LMS	0.83	11.81
<i>Group A & C</i>			<i>Group A & C</i>		
Phosphate	4.80	8.62	NL	1.42	15.48
Chl-a	4.51	8.10	LF	1.40	15.25
Nitrate	4.38	7.87	C	1.17	12.80
<i>Group B & C</i>			<i>Group B & C</i>		
DO	3.75	11.63	LN	0.98	18.89
POC	3.75	11.63	C	0.62	11.97
Cr	3.13	9.69	MOT-Gr	0.49	9.59

1515

1516

1517 굴 서식지역의 환경과 생리학적 요인의 상관관계를 분석하기 위해 PCO
1518 분석을 실시하였고, 그 결과는 Fig. 3-23 과 같다. 광양만에 서식하는 굴은
1519 수평적인 변화요인 (PCO1)에 의해, 환경변화 및 굴의 생리학적 변화의 80.4%를
1520 설명할 수 있는 것으로 조사되었다. 이 결과에 의하면, 광양만 내만은 Cr, Cd, Fe,
1521 Cu 및 T-Hg 와 같은 중금속과 Nitrate, Phospate, Chl-a 및 Ammonia 와 같은
1522 영양염류의 영향을 강하게 받고 있는 것으로 조사되었다. 이때 굴의 DGA, LF,
1523 총혈구수 및 혈구 사멸률에 부정적인 영향을 받는 것으로 확인되었다. 또한
1524 광양만 외만의 경우에는 TDWT 를 비롯한 CI, PI, LMS 및 총탄수화물이 긍정적인
1525 지표로 묶이는 것으로 확인되었다.



1526

1527 **Fig. 3-23.** Principal coordinate analysis of the 10 sampling sites in Gwangyang bay.

1528 Euclidean distance values (up) and Bray-Curtis similarity values (down) were

1529 calculated from the standardized $\log(X+1)$ transformed abundances of reads

1530 grouped to classes. Percentages of the total variation explained by the first two

1531 axes are indicated. Vectors represent the direction of the relationships between

1532 classes and ordination axes.

1533

1534

1535 **4. Discussion**

1536 **4.1. Study area**

1537 조사해역인 광양만은 유역 면적이 4900 km²인 섬진강에서 연간 23억톤 (6
1538 년 평균, 1995~2000)의 담수가 광양만으로 유입되며, 동북부에 위치한 노량해협을
1539 통해서 높은 염분의 해수가 유입되어 광양만 내의 환경에 영향을 준다 (Jang et al.,
1540 2005; Kwon et al., 2004). 또한 광양공단, 여천공단, 광양제철소 및 울촌공단을 포함
1541 하는 광양만권 산업단지로 인해 조간대 해저 퇴적상 변화와 함께 저서환경의 생
1542 태계 변화를 초래하였다고 보고된 바 있다 (Cho et al., 2000; Choi and Koh, 1984). 이
1543 에 따라 지난 1982년부터 ‘특별관리해역’으로 지정되었으며, 퇴적물 내 중금속 함
1544 량에 대한 연구 (Cho et al., 2000; Hyun et al., 2004; Hyun et al., 2006; Joo et al., 2000;
1545 Kang and Lee, 1996; Kwak et al., 2001), 퇴적물 내 유기화합물 (i.e. PCDDs, PCDFs, and
1546 PCPs) 함량 조사 (Kim et al., 2008), 광양만 수질의 연간 변동 (Cho et al., 2013), 무
1547 기영양염의 시공간적 분포를 조절하는 요인에 관한 연구 (Jang et al., 2005) 등이
1548 활발하게 진행되어 왔다. Choi et al. (2010)의 연구 결과에 따르면, 우리나라 연안에
1549 서식하는 담치 체내 유기화합물의 함량을 조사한 결과, 광양만은 가장 오염이 적
1550 은 연안 중의 하나로 평가 된 바 있으나, 살충제 중하나인
1551 dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)의 경우 담치 체내 함량이 증가하는 추세임을

1552 보고하였다. 이와 같이, 광양만 연안 환경은 과거부터 현재까지 기후변동 및 인간
1553 활동의 변화에 따라 유입되는 오염물질과 스트레스 요인이 달라질 수 있기 때문
1554 에 지속적인 모니터링이 필요하다.

1555

1556 **4.2. Individual level**

1557 이 연구에서는 개체수준의 생리지표 항목으로 굴의 CI 및 PI, TDWT를 조
1558 사하였다. 그 결과, 모든 항목에서 내만에 위치한 울촌면, 초남대교와 중동에 서
1559 식하는 굴의 지표 결과가 외만에 비해 낮게 조사되었다 (see session 3.1). 예로부터
1560 비만도는 에너지 저장 정도나 생식소의 발달과 밀접한 연관이 있기 때문에
1561 (Costil et al., 2005; Gosling, 2004) 해양 이매패류의 영양상태 또는 일반적인 건강도
1562 를 나타내는 지표로 사용되어 왔다 (Cardoso et al., 2007; Crosby and Gale, 1990;
1563 Rainer and Mann, 1992). Costil et al. (2005)은 프랑스 노르망디 연안 Bay of Veys 내
1564 내만에서 외만으로의 6개 정점에 대한 굴 (*C. gigas*)의 생물학적 변화를 시-공간적
1565 으로 조사하였다. 이들의 연구 결과, 내만에 위치한 굴의 성장, 육중량 및 생화학
1566 성분에 있어서 외만에 비해 유의적으로 낮은 결과를 얻었다. 그들은 이와 같은
1567 연구 결과의 원인이 조석리듬에 따른 노출시간의 차이로 내만에 위치한 굴의 섭
1568 이활동 시간이 외만에 비해 짧아 충분한 먹이섭취를 못하였을 것이라고 고찰하였

1569 다. 또한 충분하지 못한 먹이 섭취의 근거로 체내 탄수화물 함량이 외만에 비해
1570 유의적으로 낮은 것을 지목한 바 있다. 이 연구에서 실시한 PCO 분석 결과 광양
1571 만 내만의 굴은 높은 DGA를 보였으며, 외만에서는 비만도 및 PI, TDWT이 유의
1572 적으로 높았다. 이때 수질 환경 요인 중 Chl-a 및 Nitrate, Phosphate, Ammonia와 같
1573 은 영양염류가 영향을 끼치는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 광양만 내만에서의
1574 낮은 CI 및 PI, TDWT는 먹이 섭취와의 밀접한 연관이 있으며, 굴의 생리상태를
1575 잘 반영하는 지표로 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 향후 연안환경 건강도 모
1576 니터링 프로그램의 주요 생체지표 (biomarker)로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

1577

1578 **4.3. Tissue level**

1579 이 연구에서는 조직수준의 생리지표 항목으로 굴의 생화학조성분 및 생식
1580 소발달단계, 조직병리학적 관찰, DGA를 조사하였다. 그 결과, 내만에 서식하는 굴
1581 체내 총탄수화물과 총단백질 함량이 외만에 비해 낮게 조사되었고 (Fig. 3-7), DGA
1582 는 내만에서 높게 관찰되었다 (Fig. 3-9). 생식소발달단계는 외만이 내만에 비해 다
1583 소 낮은 생식소 발달 단계를 보였으며 (Fig. 3-8), 조직병리학적 관찰 결과는 지역
1584 별 뚜렷한 패턴은 관찰하지 못하였다 (Table 3-7). 해산 이매패류의 소화맹낭은 먹
1585 이와 염분에 따라 위축되거나 팽창하기도 하며 (Kang et al., 2010; Winstead, 1995),

1586 먹이의 소화, 흡수뿐만 아니라 오염물질의 해독 및 배출 작용에도 관여한다
1587 (Krishnakumar et al., 1994; Livingstone, 1991). Kang et al. (2010)은 참굴의 DGA가 먹이
1588 가 부족한 가을이나, 산란 후에 위축되는 것을 보고 하였고, Winstead (1995)는 버
1589 지니아굴 (*C. virginica*)의 DGA가 저염분에 노출 되었을 때 증가하는 것을 보고한
1590 바 있다. 또한 Lowe et al. (1981)과 Moore et al. (1989)는 원유 또는 PAHs에 노출된
1591 담치 (*Mytilus edulis*)에서 소화맹장 세포 내 리소솜 활동이 자가탐식 (autophagy)를
1592 유도하여 세포의 기능상실과 세포사멸 (cell death)에 의한 것으로 보고한 바 있다.
1593 이와 같이 DGA는 다양한 스트레스에 민감하게 반응하는 기관으로, DGA 변화에
1594 기여하는 단 하나의 원인을 지목하기에 어려운 점이 있지만, 연안환경 변화 (수질,
1595 퇴적상, 해안선 변경, 다양한 오염원 유입, 기후변화 등)와 같이 다양한 스트레스
1596 요인에 반응한다. 이 연구에서 실시한 PCO 분석 결과에서도 DGA는 중금속 및
1597 영양염류의 변화와 동일한 방향성을 갖는 것으로 조사되었으며 (Fig. 3-23), 따라서
1598 DGA의 변화는 환경오염 및 먹이환경 변화의 좋은 지표로 활용 될 수 있을 것으
1599 로 사료된다.

1600 해산이매패류의 연중 번식 주기에 있어 수온과 먹이는 배우자 형성을 조
1601 절하는 가장 영향력 있는 환경요인으로 알려져 있다 (Hofmann et al., 1992; Kennedy

1602 et al., 1996; Cardoso et al., 2007). 특히 동일 지역에 서식하더라도 종 (species)의 번
1603 식 특성 차이로 인해 산란시기 및 횡수가 다를 수 있으며, 동일 종 (species)이 서
1604 로 다른 지역 (동일 위도)에 서식하더라도 그 번식 패턴은 주변 환경 요인에 의
1605 해 변화 할 수 있다 (Cárdenas and aranda, 2000). 또한 Costil et al. (2005)은 그들의
1606 연구에서 내만에서 외만으로의 서식지역 차이에 의해 크기 및 육질성장, 비만도
1607 의 차이뿐만 아니라, 외만에 서식하는 굴이 내만에 비해 산란횡수가 더 많은 것
1608 을 관찰하였다. 이들은 내만과 외만의 산란 패턴이 차이를 보이는 원인에 대해서
1609 내만에 서식하는 굴이 먹이 섭이를 할 수 있는 시간이 상대적으로 적기 때문에,
1610 체내에 저장할 수 있는 에너지가 적고, 따라서 이를 이용한 배우자를 형성에 한
1611 계가 있기 때문에 굴의 번식량은 낮아질 것이라고 고찰하였다. 최근 Baek et al.
1612 (2014)은 우리나라 곰소만 내만에 위치한 곰소항 개간 지역과 외만의 하전리 자
1613 연 양식장에 서식하는 바지락 (*Ruditapes philippinrum*)의 생리학적 변화를 조사한
1614 바 있다. 그 결과, 조사 지점 간 해수 중 클로로필 a와 seston의 농도차이를 관찰
1615 할 수 있었고, 이에 따라 바지락의 비만도, 체내 생화학 조성분, 건중량 및 성장
1616 이 곰소항에서 유의적으로 낮게 관찰되었다. 또한, 이와 같은 체내 에너지 저장
1617 차이는 번식 주기에 있어 자연 양식장에 서식하는 바지락이 개간된 지역에 비해

1618 더 빨리 배우체를 생산하고, 산란 횟수 및 산란 기간이 더 길어지는 결과를 초래
1619 하였다고 보고하였다. 이와 같은 관점에서 보았을 때, 이번 연구에서 관찰된 외만
1620 에서 다소 늦은 생식소 발달단계 양상은 산란 기간이 더 연장되어 재생속 하는
1621 개체 일 수 있으며, 정확한 비교는 산란시기 전,후로 수개월에 걸쳐 시료를 채집
1622 하여야 할 것이다.

1623

1624 **4.4. Cellular level**

1625 이 연구에서는 세포수준의 생리지표 항목으로 굴의 소화맹낭 내 리소솜
1626 (lysosome) 변화 및 혈구 면역력을 조사하였다. 굴의 소화맹낭 내 리소솜 활동의
1627 경우, 광양만 내만에서 높은 LF 축적량 (Fig. 3-10)과 짧은 LMS (Fig. 3-12)로 외부
1628 스트레스를 강하게 받고 있는 것으로 조사되었으나, NL의 경우 정반대의 결과
1629 (Fig. 3-11)가 도출되었다. 혈구 면역력 측정에서도 내만에 서식하는 굴이 총혈구수
1630 는 적고 (Fig. 3-13), 혈구 사멸률은 높은 것 (Fig. 3-14)으로 조사되었으나, 혈구
1631 DNA 손상도와 식세포능은 지역간 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 3-15
1632 와 Fig. 3-16). 게다가, 혈구의 LMS의 경우 (NRR time test 결과, Fig. 3-17), 소화맹낭
1633 에서 관찰된 LMS의 결과 (Fig. 3-12)와는 정반대의 결과가 도출되었다. 소화맹낭
1634 의 리소솜은 먹이의 소화, 흡수뿐만 아니라 오염물질의 해독 및 배출 기능의 주

1635 된 역할을 수행한다 (Moore, 1985; Petrović et al., 2001; Viarengo et al., 1987). 리소솜은
1636 효모에서 인간까지 모든 진핵생물 세포에 존재하며, 생체이물질 혹은 환경오염
1637 등의 스트레스를 받으면 리소솜 막 안정성이 저하된다. 이에 따라 리소솜 내 가
1638 수분해 효소가 세포질로 확산 되거나, NL혹은 LF와 같은 물질이 비정상적으로 축
1639 적되어 종국에는 병리학적 자가탐식 (autophagy) 혹은 세포사멸 (cell death), 리소솜
1640 저장병 (lysosomal storage disease) 등 세포에 해로운 영향을 미친다 (Chung, 2003;
1641 Cuervo, 2004; Moore et al., 2006; Petrović et al., 2001). Viarengo et al. (2007)은 해산 이매
1642 패류의 소화맹낭 LMS 시간에 따른 생물체의 생리학적 건강도 구분을 다음과 같
1643 이 할 수 있다고 제시하였다. 생물체의 LMS가 20분 이상인 경우 스트레스에 영
1644 향을 받지 않는 건강한 상태이며, 10분 이상 20분 미만일 때는 개체가 스트레스를
1645 받지만 이를 회복할 수 있는 상태, 10분 미만의 LMS를 보이는 경우는 생물체가
1646 병리학적 증상을 보이는 스트레스 상태라고 설명하였다. Dimitriadis et al. (2004)은
1647 그리스 에게해에 분포하는 지중해담치 (*M. galloprovincialis*) 소화맹낭의 리소솜 LF,
1648 NL, 및 NAH 효소 활성도 측정 결과, LF가 높게 나타난 홍합에서 낮은 수준의
1649 NL 및 약한 NAH 효소활성을 보고한 바 있다. 이와 같은 현상은, 과도한 LF 축
1650 적이 리소솜 내 NAH 효소활성을 저하 시키고, 리소솜 내 NL을 지질 과산화 작

1651 용을 통하여 LF로 전환하였기 때문이라고 설명하였다. 그러나 리소솜 내 NLI
1652 지질 과산화 작용을 통한 LF로의 전환에 대한 자세한 메커니즘은 아직 명확히
1653 설명되지 않고 있다. 따라서 현장 조사를 통한 연안환경 모니터링에서는 리소솜
1654 내 최종 축적 물질인 LF의 양을 평가하는 것이 보다 명확한 평가가 이루어 질
1655 것으로 판단된다.

1656 해산 이매패류는 체액성 인자 (humoral effectors)들과 혈구 (hemocyte)로 구
1657 성된 선천 면역 시스템 (innate immune system)을 보유하고 있으며, 혈구는 모든 조
1658 직세포 사이를 자유롭게 순환하며 내부 면역 외에도 영양분의 소화와 이동, 패각
1659 과 조직의 수선, 분비 등에 관여를 하며 생리적 안정상태를 유지하기 위해 다양
1660 한 변화를 나타낸다 (Cheng, 2000; Chu, 2000). 특히 오염 물질 (구리 (Cu), 카드뮴
1661 (Cd), 생체이물질 (Xenobiotics), Polychlorinated biphenyl (PCB), 및 Tributyltin (TBT))
1662 에 노출된 해산이매패류 (*M. edulis*, *C. virginica*, *Chlamys farreri*) 혈구의 총혈구수
1663 변화, 식세포능 (phagocytosis)이 저하된다는 여러 연구 결과가 보고 된 바 있다
1664 (Auffert et al., 2002; Brousseau et al., 2000; Fisher et al., 1990; Liu et al., 2009; Matozzo et
1665 al., 2001; Pipe and Coles, 1995; Sauvé et al., 2002). 이중, 총혈구수의 경우에는 Fisher et
1666 al. (2000)과 Pipe and Coles (1995)의 연구 결과에서는 구리 (Cu)와 카드뮴 (Cd)에 노
1667 출된 패류의 총혈구수가 증가한 반면, Liu et al. (2009)의 연구에서 PCBs에 노출된

1668 패류 혈구의 총혈구수는 감소하는 상반된 결과가 보고된 바 있다. 또한 Park et al.
1669 (2009)는 카드뮴 (Cd)에 노출시킨 바지락 (*R. philippinarum*) 혈구의 DNA 손상도
1670 가 증가함을 확인하였으나, Hong et al. (2012)은 광양만과 진해만 조간대에 서식하
1671 는 굴 (*C. gigas*) 혈구의 DNA 손상도가 지역간 유의적인 차이는 없었지만, 식세포
1672 율과 NRR time 등의 면역력에서는 유의적 차이가 있었다고 보고하기도 하였다.
1673 Lacoste et al. (2002)는 굴 (*C. gigas*)의 스트레스를 유발할 수 있는 요인에 노출 시
1674 킨 후, 혈구의 면역력을 측정하였으며, 그 결과 스트레스로 인해 면역력이 30-90
1675 분 사이에 면역자극이 반응을 한다고 보고하였다. 이와 같이, 해산이매패류의 혈
1676 구를 이용한 면역력 측정은 서식지역과 노출된 스트레스의 종류, 패류의 종
1677 (species)에 따라 다르며, 혈구의 면역 능력은 스트레스 유입 초기에 즉각적으로
1678 반응을 하는 지표이다. 또한 유세포분석기 (Flow cytometer)를 이용한 식세포능 조
1679 사 및 혈구 LMS 분석의 경우에는 살아 있는 세포의 반응을 측정한다. 이 연구에
1680 서 광양만 내만에 서식하는 굴의 혈구 세포 사멸률이 높았던 것을 감안하면, 새
1681 로이 분열된 혈구 세포로 인한 오차 발생 가능성이 있을 것으로 사료된다. 따라
1682 서 장기적인 스트레스 노출에 대한 혈구의 면역 반응 지표의 선정에 있어서는,
1683 혈구의 세포 분열 주기에 따른 면역능력 차이에 대한 연구가 진행 되어야 정확한

1684 고찰이 가능 할 것으로 사료된다.

1685

1686 **4.5. Contaminant deposition in the oyster tissue**

1687 굴의 생리학적 변화에 대한 배경을 조사하고자 이 연구에서는 굴 체내
1688 PAHs와 중금속 (heavy metal) 함량을 조사하였다. 그 결과, 굴 체내 PAHs 함량은
1689 Fig. 3-18에서 보는 바와 같이 내만의 월내동을 제외한 나머지 지역에서는 대부분
1690 200 ng/g TDWT로 낮은 함량을 보였다. 굴 체내 중금속 함량은 Fig. 3-20에서 보는
1691 바와 같이 미량금속 종류별로 보았을 때, 지역간 체내 농축 패턴이 다르게 조사
1692 되었다. 광양만은 지난 40여년 동안 광양만 주변 산업단지 및 물류항구 활동 등
1693 으로 연안 오염에 대한 심각성이 고취되어 지난 1982년부터 ‘특별관리해역’으로
1694 지정되어 다양한 연구가 진행되어 왔으며 대부분 수질 및 퇴적물 내 오염물질 축
1695 적 정도에 대한 연구를 수행하였다 (Cho et al., 2000; Hyun et al., 2004; Hyun et al.,
1696 2006; Joo et al., 2000; Kang and Lee, 1996; Kwak et al., 2001). 이와 같은 연안환경의 유
1697 해물질 오염도 연구는 전세계적으로 주목하는 연구분야이기도 하다. 유럽의 경우
1698 에는 해양 환경 내 오염물 및 질병인자의 증가로 2006년부터 담당 기관 창설 및
1699 식품 위생에 관련된 프로그램을 계획하여, 2008년부터 패류 내 오염물 모니터링,
1700 패류 섭취 시 발생할 수 있는 유해 작용에 관한 보고서를 작성하고 있다

1701 (Guéguen et al., 2013). 최근 Choi et al. (2010) 의 보고에 따르면, 2001-2007년 우리나라
1702 라 연안에 서식하는 담치의 체내 유기화합물 함량을 조사한 결과, 국외의 연구
1703 결과에 비해 낮거나 비슷한 경향을 보였으며, 특히 광양만은 우리나라에서 가장
1704 오염이 적은 연안 중의 하나로 평가하기도 하였다. Kim et al. (2003)의 연구 결과에
1705 서도, 우리나라 남해안산 패류 (*C. gigas*, *M. edulis* and *Scapharca broughtonii*) 체내 중
1706 금속 함량을 조사하였을 때, 굴의 경우, Hg는 0.004-0.015 mg/kg wet weight (WT)의
1707 범위로 조사되었고, Cd는 0.030-1.198 mg/kg WT, Pb는 trace-0.864 mg/kg WT, Cr은
1708 trace-0.849 mg/kg WT의 범위였다. 이는 국내 패류 중금속 허용기준 (As: 3.13-7.28
1709 mg/kg WWT, Pb: 2.0 mg/kg WWT 이하, Cd: 1.0 mg/kg WWT 이하 (Lee, 1993))과 미국
1710 FDA 허용 기준치보다 낮은 함량을 가진다고 보고한 바 있다. 또한 광양만 조간
1711 대에 서식하는 바지락 (*R. philippinarum*)의 체내 중금속의 경우, As는 2.3-3.3 mg/kg
1712 WT의 범위, Pb는 1.8-2.3 mg/kg WT, Cd는 0.15-0.29 mg/kg WT의 범위로 우리의 연구
1713 보다 낮은 함량인 것을 알 수 있다. 대부분의 패류 체내 중금속 및 유기화합물의
1714 분석이 습중량을 기준으로 분석을 실시하고 있어, 우리의 결과와는 비교하기 어
1715 려운 점이 있다. 그러나 이번 연구에 이용된 굴의 수분함량이 대부분 80% 내외
1716 (data not shown) 인 것을 감안하면, 이번 연구에서 조사된 PAHs 및 중금속 함량은

1717 이전 연구 혹은 국내 식품 허용 기준보다 낮거나 비슷한 수준이라고 할 수 있다.

1718

1719

1720

1721 **Reference**

- 1722 국토해양부, 2013. 해양환경기준 설정 및 개선방안 연구 (6차). MONO1201416480.
- 1723 국토해양부, 세종, p. 364.
- 1724 한국해양연구원, 2010. 남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발. BSPE98463-2251-
- 1725 3. 한국해양연구원, 안산, pp. 381.
- 1726 한국해양연구원, 2012. 남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발. BSPE98582-
- 1727 10041-3. 한국해양연구원, 안산, pp. 396.
- 1728 한국해양과학기술원, 2013. 남해 특별관리해역 생태계 건강지수 개발. BSPE98745-
- 1729 10195-3. 한국해양과학기술원, 안산, pp. 422.
- 1730 해양수산부, 2012. 해양생태계기본조사: 동해 남부해역 기장 35.3N° ~ 36.5N°, 제1권
- 1731 기본조사. 해양수산부, 세종, p. 600.
- 1732 Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S., 2013. Ecological biomarkers: Indicators of
- 1733 ecotoxicological effects. Boca Raton, CRC Press. pp. 450.
- 1734 Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Mouneyrac, C., 2015. Aquatic ecotoxicology: Advancing
- 1735 tools for dealing with emerging risks. New York, Academic Press. pp. 504.
- 1736 Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution
- 1737 monitoring: a review. Mar. Pollut. Bull. 48, 817-834.
- 1738 Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced
- 1739 immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Mar. Environ. Res. 54,

- 1740 585-589.
- 1741 Bartell, A.M., 2006. Biomarkers, bioindicators, and ecological risk assessment-A brief review
1742 and evaluation. *Environmental Bioindicators*. 1, 60-73.
- 1743 Baek, M.J., Lee, Y.J., Choi, K.S., Lee, W.C., Park, H.J., Kwak, J.H., Kang, C.K., 2014.
1744 Physiological disturbance of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, by altered
1745 environmental conditions in a tidal flat on the west coast of Korea. *Mar. Pollut. Bull.*
1746 78, 137-145.
- 1747 Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, E., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M., 2000.
1748 Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya*
1749 *arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology* 142,
1750 145-156.
- 1751 Camacho, A.P., Delgado, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., 2003. Energy balance,
1752 gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*.
1753 *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 258, 133-145.
- 1754 Cárdenas, E.B., Aranda, D.A., 2000. A review of reproductive patterns of bivalve mollusks
1755 from Mexico. *Bull. Mar. Sci.* 66, 13-27.
- 1756 Cardoso, J.F.M.F., Langlet, D., Loff, J.F., Martins, A.R., Witte, J.I.J., Santos, P.T., van der
1757 Veer, H.W., 2007. Spatial variability in growth and reproduction of the Pacific oyster
1758 *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) along the west European coast. *J. Sea Res.* 57,
1759 303-315.
- 1760 Cheng, T.C., 2000. Cellular defense mechanisms in oysters. In Fingerman, N.,
1761 Nagabhushanam, R., (eds) *Recent advances in marine biotechnology:*
1762 *Immunobiology and pathology.* Science Publishers, Enfield, NH, pp. 43-83.
- 1763 Cho, E.S., Hwang, J.D., Han, I.S., Suh, Y.S., 2013. Yearly Fluctuation of Water Quality in

- 1764 Gwangyang Bay Based on Long-Term Monitoring. Korean J. Nature Conservation
1765 7, 83-98.
- 1766 Cho, Y.G., Lee, C.B., Koh, C.H., 2000. Heavy Metals in Surface Sediments from Kwangyang
1767 Bay, South Coast of Korea. J. Korean Soc. Oceanogr. 5, 131-140.
- 1768 Choi, H.G., Moon, H.B., Choi, M. Yu, J., Kim, S.S., 2010. Mussel watch program for organic
1769 contaminants along the Korean coast, 2001-2007. Environ. Monit. Assess. 169, 473-
1770 485.
- 1771 Choi, J.W., Koh, C.H., 1984. A study on the polychaete community in Kwangyang Bay,
1772 southern coast of Korea. J. Oceanol. Soc. Korea 19, 153-162.
- 1773 Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders.
1774 Overview of physical and behavioural homeostasis. J. Am. Med. Assoc. 267, 1244-
1775 1252.
- 1776 Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In Fingerma, N.,
1777 Nagabhushanam, R., (eds) Recent advances in marine biotechnology:
1778 Immunobiology and pathology. Science Publishers, Enfield, NH, pp. 1-42.
- 1779 Chu, F.L.E., Soudant, P., Hale, R.C., 2003. Relationship between PCB accumulation and
1780 reproductive output in conditioned oysters *Crassostrea virginica* fed a contaminated
1781 algal diet. Aqua. Toxi. 65, 293-307.
- 1782 Chung, K.W., 2003. Ultrastructure of chronic liver disease: Lysosomes and lysosomal storage
1783 diseases. Korean J. Hepatol. 9, 344-361.
- 1784 Connell, D.W., Lam, P.K.S., Richardson, B.R., Wu, R.S.S., 1999. Introduction to
1785 Ecotoxicology. Abingdon, Blackwell Science. pp. 170.
- 1786 Costil, K., Royer, J., Ropert, M., Soletchnik, P., Mathieu, M., 2005. Spatio-temporal
1787 variations in biological performances and summer mortality of the Pacific oyster

- 1788 *Crassostrea gigas* in Normandy (France). Helgol. Mar. Res. 59, 286-300.
- 1789 Crosby, M.P., Gale, L.D., 1990. A review and evaluation of bivalve condition index
1790 methodologies with a suggested standard method. J. Shellfish Res. 9, 233-237.
- 1791 Cuervo, A.M., 2004. Autophagy: in sickness and in health. Trends Cell Biol. 14, 70-77.
- 1792 Dailianis, S., 2010. Environmental impact of anthropogenic activities: The use of mussels as
1793 a reliable tool for monitoring marine pollution. In: McGevin, L.E. (Eds) Mussels:
1794 Anatomy, habitat and environmental impact. New York, Nova Science Publisher. pp.
1795 1-30
- 1796 Delgado, M., Camacho, A.P., 2007. Influence of temperature on gonadal development of
1797 *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) with special reference to
1798 ingested food and energy balance. Aquaculture 264, 398-407.
- 1799 Dimitriadis, V.K., Domouhtsidou, G.P., Cajaraville, M.P., 2004 Cytochemical and
1800 histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus*
1801 *galloprovincialis* (L.) in relation to function. J. Mol. Histo. 35, 501-509.
- 1802 Dridi, S., Romdhane, M.S., Elcafsi, M., 2007. Seasonal variation in weight and biochemical
1803 composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic
1804 cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. Aquaculture 263,
1805 238-248.
- 1806 Drummond, L., Mulcahy, M., Culloty, S., 2006. The reproductive biology of the Manila clam,
1807 *Ruditapes philippinarum*, from the north-west of Ireland. Aquaculture 254, 326-340.
- 1808 Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method
1809 for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356.
- 1810 FAO, 2013. Global Capture Production 1950-2013. Retrieved from
1811 <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-productionquery/en>.

- 1812 FAO, 2015. Cultured Aquatic Species Information Programme, *Crassostrea gigas* (Thunberg,
 1813 1793. Retrieved from
 1814 http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en.
- 1815 Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oyster *Crassostrea*
 1816 *virginica* from Tampa Bay, Florida: Association of internal defense measurements
 1817 with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51, 115-138.
- 1818 Fisher, W.S., Wishkovsky, A., Chu, F.L.E., 1990. Effects of tributyltin on defense-related
 1819 activities of oyster hemocytes. *Arch. Environ. Con. Tox.* 19, 354-360.
- 1820 Galgani, F., Senia, J., Guillou, J.L., Laugier, T., Munaron, D., Andral, B., Guillaume, B.,
 1821 Coulet, E., Boissery, P., Brun, L., Bertrand, M.C., 2009. Assessment of the
 1822 Environmental Quality of French Continental Mediterranean Lagoons with Oyster
 1823 Embryo Bioassay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 540-551.
- 1824 Gosling, E.M., 2004. Bivalve Molluscs: biology, ecology and culture. Fishing News Books,
 1825 Oxford, p. 443.
- 1826 Guéguen, M., Amiard, J.C., Arnich, N., Badot, P.M., Claisse, D., Guérin, T., Vernoux, J.P.,
 1827 2013. Shellfish and Residual Chemical Contaminants: Hazards, Monitoring, and
 1828 Health Risk Assessment Along French Coasts. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 213,
 1829 55-111.
- 1830 Hofmann, E.E., Powell, E.N., Klinck, J.M., Wilson, E.A., 1992. Modeling oyster populations
 1831 III. Critical feeding periods, growth and reproduction. *J. Shellfish Res.* 11, 399-416.
- 1832 Hong, H.K., Kang, H.S., Kim Y.O., Choi, K.S., 2012. Assessment of Immune Parameters of
 1833 the Wild Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) using a Flow Cytometry and Neutral
 1834 Red Retention Assay. *Ocean Polar Res.* 34, 137-149. (in Korean with English
 1835 abstract)

- 1836 Hong, J.S., 1987. Summer oxygen deficiency and benthic biomass in the Chinhae Bay system,
1837 Korea. J. Oceanol. Soc. Korea 22, 246-256.
- 1838 Howard, D., Smith, C., 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. NOAA
1839 technical memorandum NMFS-F/NEC-25. Woods Hole, Massachusetts.
- 1840 Huanxin, W., Lejun, Z., Presley, B.J., 2000. Bioaccumulation of heavy metals in oyster
1841 (*Crassostrea virginica*) tissue and shell. Environ. Geol. 39, 1216-1226.
- 1842 Hyun, S., Lee, T., Lee, C.H., Park, Y.H., 2006. The effects of metal distribution and
1843 anthropogenic effluents on the benthic environment of Gwangyang Bay, Korea. Mar.
1844 Pollut. Bull. 52, 104-120.
- 1845 Hyun, S., Paeng, W.H., Lee, T., 2004. Characteristics of Surficial Sediment and Benthic
1846 Environments Based on Geochemical Data in Gwangyang Bay, Korea. Korean J.
1847 Environ. Biol. 22, 93-102.
- 1848 Jang, P.G., Lee, W.J., Jang, M.C., Lee, J.D., Lee, W.J., Chang, M., Hwang, K.C., Shin, K.,
1849 2005. Spatial and Temporal Distribution of Inorganic Nutrients and Factors
1850 Controlling Their Distributions in Gwangyang Bay. Ocean Polar Res. 27, 359-379.
- 1851 Jeung H.D., Lee, J.Y., Hong, H.K., Kang, H.S., Kim, Y.O., Choi, K.S., 2012. Cytochemical
1852 Measurement of Lysosomal Responses in the Digestive Cells of Wild Pacific Oyster,
1853 *Crassostrea gigas* on the South Coast of Korea. Ocean Polar Res. 34, 151-163. (in
1854 Korean with English abstract)
- 1855 Jeung, H.D., Kang, D.H., Park, H.S., Le Moullac, G., Choi, K.S., 2014. Quantification of
1856 eggs and sperm in the Black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera* using an
1857 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Fish. Sci. 80, 451-462.
- 1858 Joo, H.S., Park, J.C., Kim, J., Lee, W.B., Lee, S.W., 2000. Physicochemical Composition and
1859 Heavy Metal Contents on the Sediment of Kwangyang Bay. Korean J. Limnol. 33,

- 1860 31-37.
- 1861 Jung, J.H., Kim, S.J., Lee, T.K., Shim, W.J., Woo, S., Kim, D.J., Han, C.H., 2008. Biomarker
1862 responses in caged rockfish (*Sebastes schlegeli*) from Masan Bay and Haegeumgang,
1863 South Korea. Mar. Pollut. Bull. 57, 599-606.
- 1864 Jung, J.H., Addison, R.F., Yim, U.H., Hong, S.H., Ha, S., Shim, W.J., 2009. Biomarker in
1865 marbled flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from contaminated and reference sites
1866 in South Korea. Mar. Pollut. Bull. 58, 1754-1759.
- 1867 Jung, J.H., Kim, M., Yim, U.H., Ha, S.Y., An, J.G., Won, J.H., Han, G.M., Kim, N.S., Addison,
1868 R.F., Shim, W.J., 2011. Biomarker responses in pelagic and benthic fish over 1 year
1869 following the *Hebei Spirit* oil spill (Taean, Korea). Mar. Pollut. Bull. 62, 1859-1866.
- 1870 Kang H.S., Lee, K.W., 1996. Trace Metal Concentrations and Sedimentation Rates of
1871 Kwangyang, Masan and Ulsan Bay Sediments. J. Korean Soc Water Qual. 12, 455-
1872 461.
- 1873 Kang, D.-H., Park, H.-S., Yi, S.-K., Choi K.-S., 2005. Reproductive condition of the tropical
1874 blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus 1758) from Chuuk Lagoon,
1875 Federated State of Micronesia during the summer months in 2003. Ocean and Polar
1876 Res. 27, 351-358.
- 1877 Kang, D.H., Chu, F.L.E., Yang, H.S., Lee, C.H., Koh, H.B., Choi, K.S., 2010. Growth,
1878 reproductive condition, and digestive tubule atrophy of pacific oyster *Crassostrea*
1879 *gigas* in Gamakman Bay off the southern coast of Korea. J. Shellfish Res. 29, 839-
1880 845.
- 1881 Kang, H.S., Hong, H.K., Yang, H.S., Park, K.I., Lee, T.K., Kim, Y.O., Choi, K.S., 2015.
1882 Spatial Variation in the Reproductive Effort of Manila Clam *Ruditapes*
1883 *philippinarum* during Spawning and Effects of the Protozoan Parasite *Perkinsus*

- 1884 *olseni* Infection on the Reproductive Effort. Ocean Polar Res. 37, 1-11.
- 1885 Kang, S.G., Choi, K.S., Bulgakov, A.A., Kim, Y., Kim, S.Y., 2003. Enzyme-linked
1886 immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the
1887 pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 282, 1-21.
- 1888 Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F., 1996. The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. A
1889 Maryland Sea Grant Book, Maryland, p.734.
- 1890 Kim, Y.S., Eun, H., Cho, H.S., Kim, K.S., Watanabe, E., Baba, K., Katase, T., 2008. The
1891 characterization of PCDDs, PCDFs and coplanar PCBs during the past 50 years in
1892 Gwangyang Bay, South Korea. J. Haz. Mat. 154, 756-765.
- 1893 Kim, J.H., Lim, C.W., Kim, P.J., Park, J.H., 2003. Heavy Metals in Shellfishes Around the
1894 South Coast of Korea. J. Fd. Hyg. Safety 18, 125-132.
- 1895 KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2014. Statistic Database for Fisheries
1896 Production. Retrieved from <http://kosis.kr/>
- 1897 Krishnakumar, P.K., Casillas. E., Varanasi. U., 1994. Effect of environmental contaminants
1898 on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington, USA. I.
1899 Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using
1900 automatic image analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 106, 249-261.
- 1901 Kwak, Y.S., Hwangbo, J.K., Lee, C.I., 2001. Heavy Metal Concentrations of Sediment and
1902 *Ruditapes philippinarum* Inhabited in the Intertidal Zone of Gwangyang Bay. J. Ecol.
1903 Environ. 24, 297-301.
- 1904 Kwon, K.Y., Moon, C.H., Lee, J.S., Yang, S.R., Park, M.O., Lee, P.Y., 2004. Estuarine
1905 Behavior and Flux of Nutrients in the Seomjin River Estuary. J. Korean Soc.
1906 Oceanogr. 9, 153-163.
- 1907 Lacoste, A., Malham, S.K., Gelebart, F., Cueff, A., Poulet, S.A., 2002. Stress-induced

- 1908 immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. Dev. Comp. Immunol. 26, 1-9.
- 1909 Lee, P.Y., 1993. Occurrence and Seasonal Variation of Oxygen-Deficient Watermass in
1910 Wonmun Bay. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 26, 392-400.
- 1911 Lee, S.H., Lee, K.W., 1983. Heavy metals in sediments from Jinhae Bay, Korea. J. Oceanol.
1912 Soc. Korea. 18, 49-54.
- 1913 Lim, D.I., Choi, J.Y., Jung, H.S., Choi, H.W., Kim, Y.O., 2007. Natural Background Level
1914 Analysis Metal Concentration in Korean Coastal Sediments. Ocean Polar Res. 29,
1915 379-389.
- 1916 Limpanont, Y., Yang, H.S., Won, S.H., Han, S.J., Lee, J.B., Lee, B.G., Choi, K.S., 2010. First
1917 report on the annual reproductive cycle of Burchardi's cockle, *Acrosterigma*
1918 (= *Vasticardium*) *burchardi* Dunker 1877 (Bivalvia: Cardiidae) on a subtidal sand
1919 flat off southern Jeju Island, Korea. Invert. Reprod. Develop. 54, 27-34.
- 1920 Liu, J., Pan, L.Q., Zhang, L., Miao, J., Wang, J., 2009. Immune responses, ROS generation
1921 and the hemocyte damage of scallop *Chlamys farreri* exposed to Aroclor 1254. Fish
1922 Shellfish Immun. 26, 422-428.
- 1923 Livingstone, D.R., 1991. Organic xenobiotics metabolism in marine invertebrates. In: Giles,
1924 R., (ed) Advances in comparative and environmental physiology. Springer-Verlag,
1925 Berlin. Pp. 45-185.
- 1926 Livingstone, D.R., Pipe, R.K., 1992. Mussels and environmental contaminants: molecular
1927 and cellular aspects. In: Gosling E.M. (Eds) The mussel *Mytilus*: Ecology,
1928 physiology, genetics and culture. Amsterdam, Elsevier Science Publishers. pp. 425-
1929 426.
- 1930 Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., 2000. Development of biomarkers to detect
1931 the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic,

- 1932 cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and
 1933 other mytilids. Int. J. Environ. Pollut. 13, 56-91.
- 1934 Lowe, D.M., Moore, M.N., Clarke, K.E., 1981. Effect of oil on digestive cells in mussels:
 1935 quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. Aquat. Toxicol. 1, 213-
 1936 226.
- 1937 MacDonald, B.A., Thompson, R.J., 1985. Influence of temperature and food availability on
 1938 the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. II.
 1939 Reproductive output and total production. Mar. Ecol. Prog. Ser. 25, 295-303.
- 1940 Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in
 1941 *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperature. J. Mar.
 1942 Biol. Assoc. U.K. 59, 95-100.
- 1943 Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D.M., Marin M.G., 2001. Effects of copper and
 1944 cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes*
 1945 *philippinarum*. Arch. Environ. Con. Tox. 41, 163-170.
- 1946 Min, D.K. Lee, J.S., Koh, D.B., Je, J.G., 2004. Mollusks in Korea. Hanguel Graphics, Busan,
 1947 p. 566.
- 1948 Mondol, M.R., Kim, C.W., Kim, B.K., Kang, C.K., Choi, K.S., 2012. Early growth and
 1949 reproduction of hatchery-produced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Gamakman
 1950 Bay off the southern coast of Korea. Fish. Sci. 78, 1285-1292.
- 1951 Moore, M.N., 1985. Cellular responses to pollutants. Mar. Pollut. Bull. 16, 164-169.
- 1952 Moore, M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-
 1953 ferrihemoprotein reductase in molluscs to environmental and experimental exposure
 1954 to xenobiotics. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46, 81-89.
- 1955 Moore, M.N., Allen, J.I., McVeigh, A., 2006. Environmental prognostics: An integrated

- 1956 model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal
1957 health status. *Mar. Environ. Res.* 61, 278-304.
- 1958 Moore, M.N., Livingstone, D.R., Widdows, J., 1989. Hydrocarbons in marine mollusks:
1959 biological effects and ecological consequences. In: Varanasi, U., (ed) *Metabolism of*
1960 *polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC press. Boca
1961 Raton, pp. 303-310.
- 1962 Moschino, V., Delaney, E., Meneghetti, F., Ros, L.D., 2011. Biomonitoring approach with
1963 mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) and clam *Ruditapes philippinarum* (Adams
1964 and Reeve, 1850) in the Lagoon of Venice. *Environ. Monit. Assess.* 177, 649-663.
- 1965 Newell, R.I.E., Hilbish, T.J., Koehn, R.K., Newell, C.J., 1982. Temporal variation in the
1966 reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia, Mytilidae) from localities on the
1967 east coast of the United States. *Biol. Bull.* 162, 299-310.
- 1968 O'Connor, T.P., 2002. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters
1969 in the USA. *Mar. Environ. Res.* 53, 117-143.
- 1970 Ojea, J., Pazos, A.J., Martinez, D., Novoa, S., Sanchez, J.L., Abad, M., 2004. Seasonal
1971 variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes*
1972 *decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238, 451-468.
- 1973 Park, K.I., Choi, K.S., 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying
1974 of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): I.
1975 Quantifying eggs. *Aquaculture* 241, 667-687.
- 1976 Park, K.I., Choi, M.S., Park, S.W., Park, K.H., Choi, S.H., Yoon, J.M., 2009. Cellular
1977 immune responses of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, exposed to
1978 cadimium chloride. *Korean J. Malacol.* 25, 135-143.
- 1979 Park, K.I., Figueras, A., Choi, K.S., 2006. Application of enzyme-linked immunosorbent

- 1980 assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes*
 1981 *philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): II. Impact of *Perkinsus olseni* on clam
 1982 reproduction. *Aquaculture* 251, 182-191.
- 1983 Petrović, S., Ozretić, B., Krajnović-Ozretić, M., Bobinac, D., 2001. Lysosomal membrane
 1984 stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus*
 1985 *galloprovincialis* Lam.) as biomarker in a field study. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 1373-
 1986 1378.
- 1987 Pipe, R.K., Coles, J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immune function in
 1988 marine bivalves molluscs. *Fish Shellfish Immun.* 5, 581-595.
- 1989 Pouvreau, S., Gangnery, A., Tiapari, J., Lagarde, F., Garnier, M., Bodoy, A., 2000a.
 1990 Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster,
 1991 *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto Atoll (French
 1992 Polynesia). *Aquat. Living Resour.* 13, 37-48.
- 1993 Rainer, J.S., Mann, R., 1992. A comparison of methods for calculating condition index in
 1994 eastern Oysters, *Crassostrea virginica* (GMELIN, 1791). *J. Shellfish Res.* 11, 55-58.
- 1995 Ren, J.S., Marsden, I.D., Ross, A.H., Schiel, D.R., 2012. Seasonal variation in the
 1996 reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea*
 1997 *gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand J. Mar.*
 1998 *Freshwater Res.* 37, 171-182.
- 1999 Ruesink, J.L., Lenihan, H.S., Trimble, A.C., Heiman, K.W., Micheli, F., Byers, J.E., Kay,
 2000 M.C., 2005. Introduction of Non-Native Oysters: Ecosystem Effects and Restoration
 2001 Implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Sys.* 36, 643-689.
- 2002 Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Pmorin, Y., Sen cal, L., Goudreau, P., Fournier, M.,
 2003 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of

- 2004 hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg, and Zn). *Aquat. Toxicol.* 58, 189-200.
- 2005 Schulte, P.A., Waters, M., 1999. Using molecular epidemiology in assessing exposure for risk
2006 assessment. *New York, Ann NY Acad Sci.* 895, 101-111.
- 2007 Toba, M., Miyama, Y., 1991. Gonadal development and spawning induction in artificially
2008 conditioned Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57,
2009 1269-1275. (in Japanese with English abstract)
- 2010 Toba, M., Miyama, Y., 1994. Relationship of size to gonadal maturation and spawning in
2011 artificially conditioned Manila clams. *Nippon Suisan Gakkaishi* 60, 839-848. (in
2012 Japanese with English abstract)
- 2013 Uddin, M.J., Jeung, H.D., Yang, H.S., Kim, B.K., Ju, S.J., Choi, K.S., 2013. Quantitative
2014 assessment of reproductive effort of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in a
2015 lagoon on Jeju Island (Korea) using enzyme-linked immunosorbent assay. *Invert.*
2016 *Reprod. Dev.* 57, 316-324.
- 2017 Vasanthi, L.A., Revathi, P., Arulvasu, C., Munuswamy, N., 2012. Biomarkers of metal
2018 toxicity and histology of *Perna viridis* from Ennore estuary, Chennai, south east
2019 coast of India. *Ecotox. Environ. Safe.* 4, 92-98.
- 2020 Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers
2021 in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress
2022 syndrome in sentinel organisms. *Com. Biochem. Physiol. Part C.* 146, 281-300.
- 2023 Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K., Farrar, S.V., 1987.
2024 Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine
2025 mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenathrene. *Mar.*
2026 *Biol.* 94, 251-257.
- 2027 Winstead, J.T., 1995. Digestive tubule atrophy in eastern oyster, *Crassostrea virginica*

2028 (Gmelin 1791), exposed to salinity and starvation stress. J. Shellfish Res. 14, 105-
2029 111.

2030 Yang, H.S., Kang, D.H., Park, H.S., Choi, K.S., 2011. Seasonal changes in reproduction and
2031 biochemical composition of the Cockle, *Fulvia mutica* Reeve (1884), in Cheonsu
2032 Bay off the west coast of Korea. J. Shellfish Res. 30, 95-101.

2033 Yang, H.S., Kim S.S., Kim, G.B., 1995. Pollution of Heavy Metals and Sedimentation Rates
2034 in Sediment Cores from the Chinhae Bay, Korea. J. Korean Environ. Sci. Soc. 5,
2035 489-500.

2036

2037

2038 **Acknowledgements**

2039 2006년 무척추동물실험실에 들어와 박사학위를 받을 때까지, 10년이라는
2040 시간이 지났습니다. 10년의 세월 동안 많은 분들의 도움과 조언으로 통해 대학원
2041 박사과정을 통과하였기에 졸업논문의 감사의 글을 통해 감사 인사를 드리고자 합
2042 니다.

2043 지난 10년 동안 돌아보면, 지금 이 자리에 제가 오기까지, 아무것도 모르는 저
2044 에게 공부하는 방법, 연구하는 방법, 보고서 쓰는 방법, 논문 쓰는 방법 등 모든
2045 부분을 열정적으로 지도해주신 최광식 교수님이 계셨기에 가능했다고 생각합니다.
2046 그 무엇보다 우선적으로 10년이라는 기 기간 동안 저를 물심양면으로 지도해주신
2047 지도교수님께 감사의 인사를 드립니다. 또한, 학위논문 심사위원장이신 광주과학
2048 기술원에 계신 강창근 교수님, 멀리 한국해양과학기술원 남해연구소에 계시는 정
2049 지현 박사님, 그리고 제주대학교 정석근 교수님과 박상률 교수님께도 깊은 감사
2050 를 드립니다. 이 밖에 대학원 학위 과정 동안 수업 및 세미나를 통해 많은 가르
2051 침을 주신 이경준 교수님, 김기영 교수님, 송춘복, 전유진 이제희, 여인규, 허문수,
2052 정준범 교수님들께도 진심으로 감사를 전하는 바입니다.

2053 이 논문에서 가장 중요한 부분이었던 굴의 PAHs와 중금속을 흔쾌히 분석
2054 하여 주신 한국해양과학기술원 남해연구소에 계신 임운혁 박사님과, 하성룡씨, 안

2055 준건씨, 그리고 국립수산과학원 어장환경과에 계신 황동운 박사님께도 감사의 인
2056 사를 전합니다.

2057 10년이라는 기간 동안 함께 동고동락한 실험실 동료들에게도 감사의 인사
2058 를 전하고 싶습니다. 실험실 동료들이 없었다면 그 긴 시간을 견뎌내지 못했을
2059 것이라 생각이 듭니다. 실험실 선배님인 한국해양과학기술원 강도형 박사님, 군산
2060 대학교 박경일 교수님, 켄, 자심, 타오, 모스타피쥬, 이지연, 임나래, 양현성 박사
2061 님, 강현실 박사님, 홍현기 박사님, 이희중, 박아름이, 레탄크영, 김영민, 조영관,
2062 이혜미 및 멀리 하늘에서 항상 힘을 주는 김봉규 박사님에게도 깊은 감사를 드립
2063 니다.

2064 서른살이 넘는 나이까지 학교에 다니며 공부하고 있는 아들을 믿고, 기다
2065 려주시고, 응원해주신 아버지와 어머니께도 소중한 결실로 보답할 수 있어 기쁨
2066 니다. 부모님의 큰 사랑으로 제가 여기까지 올 수 있었다고 생각합니다. 감사하고
2067 사랑합니다.

2068 이제 사회로 진출하는 한발을 내딛었습니다. 아직도 많이 부족하겠지만 열
2069 심히 노력하겠습니다. 항상 따끔한 충고와 조언 부탁드립니다. 감사합니다.

2070