

THESIS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

**Impacts of 2007 Hebei spirit oil spill on reproductive
physiology of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*; Tunberg,
1793) in Taean off the west coast of Korea**

Hee-Joong Lee

Department of Biotechnology

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February 2010

**Impacts of 2007 Hebei spirit oil spill on reproductive
physiology of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*; Tunberg, 1793)
in Taean off the west coast of Korea**

Hee-Joong LEE

(Advised by Professor Kwang-Sik Choi)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of
Master of Science

February 2010

This thesis has been examined and approved by

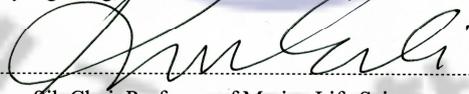


.....
Thesis director,

Dr. In-Kyu Yeo, Associate Professor of Marine Life Science



.....
Dr. Do-Hyung Kang, Senior research scientist, KORDI



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

February 2010

.....
Date

**Department of Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

목 차

영문요약	i
LIST OF FIGURES	
LIST OF TABLES	
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법	5
1. 시료 채집 및 condition index 측정.....	5
2. 조직학적 관찰을 통한 생식소 발달 단계 및 소화맹낭 관찰.....	7
4. 참굴 조직의 성분 분석.....	12
5. 체내 Chlorophyll-a 분석.....	15
6. 효소면역 반응 측정 (ELISA)	15
III. 결과.....	16
1. Condition Index 변화.....	16
2. 연중 생식소 발달 비교.....	17
3. 소화맹낭 위축도 비교	18
4. 체조직 성분 분석 비교	24
4.1 총 탄수화물 함유량 비교.....	24
4.2 총 단백질 함유량 비교	24
4.3 총 지방 함유량 비교.....	24
4.4 체내 Chlorophyll-a 함유량 비교.....	24
5. 효소면역 반응 측정 비교.....	26
IV. 고찰.....	28
V. 요약.....	35
VI. 참고문헌.....	38
감사의 글	

LIST OF FIGURES

Fig. 1.	Map showing study area.....	6
Fig. 2.	Physiological condition of oyster. (F) fat condition; (M) medium condition; (W) watery condition.....	8
Fig. 3.	Photomicrographs of ovarian development of <i>C. gigas</i>	9
Fig. 4.	Photomicrographs of testicular development of <i>C. gigas</i>	10
Fig. 5.	Digestive gland atrophy of Pacific oyster of <i>C. gigas</i>	13
Fig. 6.	Seasonal shell growth of oyster in the spilled area and control area. black bar (spilled area at Sinduri), white bar (Control area at Jonghyun).....	19
Fig. 7.	Seasonal variation of condition index of oyster in the spilled area and control area. black bar (spilled area at Sinduri), white bar (Control area at Jonghyun).....	20
Fig. 8.	Seasonal variation of PCI of oysters from spilled area and control area. (A), non-oil spill site (Jonghyun) (B), oil spill site (Sinduri). (F), fat condition, (M), medium condition, (W), watery condition.....	21
Fig. 9.	Annual gametogenesis of the oyster from spilled area and control area. (A), non-oil spill site (Jonghyun) (B), oil spill site (Sinduri).....	22
Fig. 10.	Seasonal variation of digestive gland atrophy of oyster from spilled area and control area. (A), non-oil spill site (Jonghyun) (B), oil spill site (Sinduri).....	23
Fig. 11.	Seasonal variation in biochemical components in oyster tissue from spilled area and control area. A, carbohydrate; B, protein; C, lipid; D, chlorophyll-a. black bar (spilled area at Sinduri), white bar (Control area at Jonghyun).....	25
Fig. 12.	Monthly variation in GSI of the oysters from spilled area and control area. black bar (spilled area at Sinduri), white bar (Control area at Jonghyun).....	27

LIST OF TABLE

Table 1	Scale of digestive gland atrophy (Winstead <i>et al.</i> , 1995).....	11
Table 2	Temporal variations in digestive gland strophy (D), reproductive gland atrophy (R), physiological condition index (PCI) in the Sinduri (spilled area) and Jonghyun (control area) during the sampling period. The number in parenthesis is standard deviation.....	29
Table 3	Monthly mean shell length in mm (SL), tissue dry weight (TDW), condition index (CI), and gonad somatic index (GSI) of Sinduri (spilled area) and Jonghyun (control area). The number in parenthesis is standard deviation.	30
Table 4	Temporal variations in total proteins(P), (mg/g DTWT); carbohydrates (C), (mg/g DTWT); lipids (L), (mg/g DTWT); Chlorophyll-a (Chl-a), (mg/g DTWT) in the Sinduri (spilled area) and Jonghyun (control area) during the sampling period. The number in parenthesis is standard deviation.	31

Abstract

On 7th December 2007, Taean county located on west coast of South Korea spilled 209,000 tones of crude oil from a oil tanker *Hebei Spirit* followed by a watercraft accident. As soon as occurred an oil spill in costal or ocean, marine life including environment have been indirect or/and directly threatened by a variety of oil originated materials. Oyster is a species of bivalves which have a known ability to accumulate different contaminants from sea water and can therefore serve as bioindicators. The present study investigated whether there is reproductive cycle and nutrition alterations in a heavy oil exposed Pacific oyster, *Crassostera gigas*. Hence, the relationship between the nutrition and gonad development in oysters was examined using biochemical, histological and immunological assay.

The condition index (CI), digestive tubule atrophy and gonad development of *C. gigas* collected from two different sites, one is heavy oil contaminated area (Sinduri) and the other one is non-oil contaminated area (Jonghyun) as a control were measured once a month for a year followed by physiological parameter and histological analysis. The high values of CI in control was June while oil contaminated area was September. Interestingly, CI values in oil contaminated area were average 2.6% higher than control area from June into September. Reproductive cycle investigation using histological analysis showed that spawning of oysters in oil contaminated area was two times per year, late July to early August and late September while control area was one time per year, between June and July. The pattern of a total lipid concentration also highly observed in oil spilled area.

To quantify the biochemical compositions and gonad maturation for oil impacted oysters, biochemical analysis and enzyme-linked immunosorbent assay were monitored. The total carbohydrate content of oysters sampled from January to May was significantly twice lower than the control, 134.9mg/gDTWT and 675.5mg/gDTWT respectively. Both oil polluted

and control groups were increased the total proteins and lipids during the spawning stage while carbohydrates are decreased. The results of ELISA coincided with the reproductive cycles of oysters in above histological study.



I. 서론

2007년 12월 7일 충남 태안 만리포 북서방 10 km 해상 (N 36° 52' 13 / E 126°) 해상을 운행하던 중국 국적의 선박 허베이 스피리트호 (Hebei Spirit)와 인근을 지나던 예인선이 충돌하여 허베이 스피리트호에 적재되어 있던 아랍에메레이트산 (UAE upper zakum), 쿠웨이트산 (Kuwait export) 및 이란산 (Iranian heavy) 원유 263,000 kl 중 12,547 kl 가 유출 되는 사고가 일어났다 (Lee *et al.*, 2008). 이 중 이란산 중질유는 포화탄화수소류가 53%, 방향족탄화수소류가 30%로 대부분을 차지하며, 극성화합물은 17 %로, 일부 미량중금속중인 바나듐의 함유량은 81ppm 이었다 (Jokuty, P. 1999). Hebei Spirit 유류유출사고로 태안군은 유류유출이 일어난 지 10 일만에 태안군의 해안선 150 km 를 포함한 태안 해안 국립공원 전체에 영향을 입혔다 (Waddell, J., 2008).

우리나라는 1993 년부터 1998 년까지 2,530 여건의 크고 작은 유류유출 사고로 인해 38,300 kl 의 유류가 유출되었고 약 2,600 억원의 어업피해가 발생하였다 (환경부, 1999). 원유 (crude oil)속에는 수천 가지의 다양한 탄화수소성분 (hydrocarbon, 75% 이상) 과 유황화합물 (4%), 산소화합물 (2%), 질소화합물 (1%), 미량의 금속화합물 (V, Fe, Ni, Cu, K, Na, Ca, As, Si)과 비 탄화수소 (non-hydrocarbon)가 포함되어 있다 (Fingas, 2001). 여러 화합물의 복합체인 원유가 바다에 유출되게 되면 확산 (spreading), 이류 (drift), 증발 (evaporation), 유화 (emulsification), 분산 (dispersion), 용해 (dissolution), 광산화 (photo oxidation), 미생물분해 (biodegradation) 및 침전 (sedimentation)의 과정을 거쳐 분해되게 된다. 해양 환경에 유류가 유입될 경우 해양 생태계에 독성 물질로 작용을 하며 그 영향은 수질 변화를 통하여 순간적으로부터 수십 년 동안 다양한 형태로 해양 생태계에 악영향을 미치게 된다

(Mearns *et al.*, 2003; Waddell, J., 2008). 대부분의 원유는 낮은 비중 (0.9 미만)과 친유성의 특징을 갖고 있어 용존상으로 존재하기 보다 입자에 흡착되거나 해안으로 표착하여 연근해 및 조간대에 서식하는 어류, 이매패류 및 해조류를 포함하는 해양생물들에게 직·간접적인 영향을 미치게 된다. 실제로 태안 지역의 유류유출 전후의 해수내 chlorophyll-a 의 농도변화를 조사한 결과, 유출 직후 chlorophyll-a 의 농도가 감소하다 유출 2주후 부터 농도가 급격히 증가되는 경향이 관찰되었다 (Lee *et al.*, 2009). 또한, Prestige 유류유출사고에 유출된 원유와 같은 종류의 원유에 지중해 담치 (*Mytillus galloprovincialis*)를 노출시켜 지중해담치의 면역반응의 변화를 알아본 실험이다. 선천면역에 관여하는 식세포 작용 (Phagocytosis)은 노출된 유류의 농도가 높을수록 식세포작용 능력이 저하되는 것을 확인하였고 lysozyme activity 도 노출된 유류의 농도가 높아질수록 activity 가 감소하는 경향을 보인다고 보고하였다 (Ordas, *et al.*, 2007). 유출된 유류에 영향을 입은 지중해담치 (*M. galloprovincialis*)는 시간이 흐르면서 먹이섭이율과, 비만도가 감소하며 (Peteiro, *et al.*, 2006), 이러한 영향은 소화맹낭의 위축 정도를 조직학적 관찰을 통해서 확인할 수 있는데 이는 유출된 원유의 스트레스로 인하여 소화맹낭이 위축되기 때문이라고 보고하였다 (Weinstein, 1997). 이러한 스트레스로 인해 저하된 참굴 (*C. gigas*)의 먹이섭이는 체조직 성분에 반영되어 체조직 성분을 이루는 탄수화물, 지방, 단백질의 감소를 초래하고 궁극적으로 참굴의 성장에 영향을 준다고 보고하였다 (Hyun *et al.*, 2001). 원유성분 중의 하나인 polychlorinated biphenyl (PCB)에 노출된 버지니아 굴 (*Crassostrea virginica*)의 산란능력이 저하된 것으로 보고한바 있다 (Encomio and Chu., 2000).

참굴 (*Crassostrea gigas*; Thunberg, 1793)은 남해안과 서해안을 중심으로 널리 양식되고 있으며, 환경 적응력이 높아 산업적 가치가 높은 이매패류이다.

2005 년을 기준으로 우리나라 연근해 어업과 양식업을 합쳐 37 만톤을 생산하고 있으며 (Choi, 2008) 우리나라 이매패류 생산량의 80%, 생산액은 약 1,500 억 원으로 높은 경제적 가치를 가지고 있다. 유류유출이 일어난 태안군은 충청남도에 포함되어있으며 충청남도의 참굴 생산량은 2007 년 현재 6,954 ton 이며 주로 서해안의 낮은 수심을 이용하여 양식하는 간이수하식 방법을 사용하여 참굴을 생산하고 있다. 인천시 종현동 지역의 참굴은 해수면에 돌을 투하하여 자연적으로 치패를 양성하며 키우는 투석식 굴 양식법을 사용하며 서해안의 높은 조석간만의 차를 이용하여 자연적인 단련시기를 거쳐 생산하고 있다.

이 연구는 유류유출피해를 입은 태안군 신두리 지역의 참굴이 유류에 의한 영향을 유류유출 피해를 입지 않은 인천시 종현동 지역의 굴과 조직학적 관찰 (생식소 발달단계, 소화맹낭 위축도 지수), 비만도, 체조성 성분 및 면역학적 분석을 통한 번식량을 비교함으로써 유출된 원유에 의해 굴에게 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 채집

유류유출지역의 참굴은 태안군 신두리 지역에서 간이수하식으로 양식된 1년생 참굴 40.8 ~ 79.0 mm를 채집하였으며 대조구 지역인 인천시 종현동에서 투석식으로 양성된 참굴 1년생 77.4 ~ 89.3 mm의 참굴을 채집하여 실험에

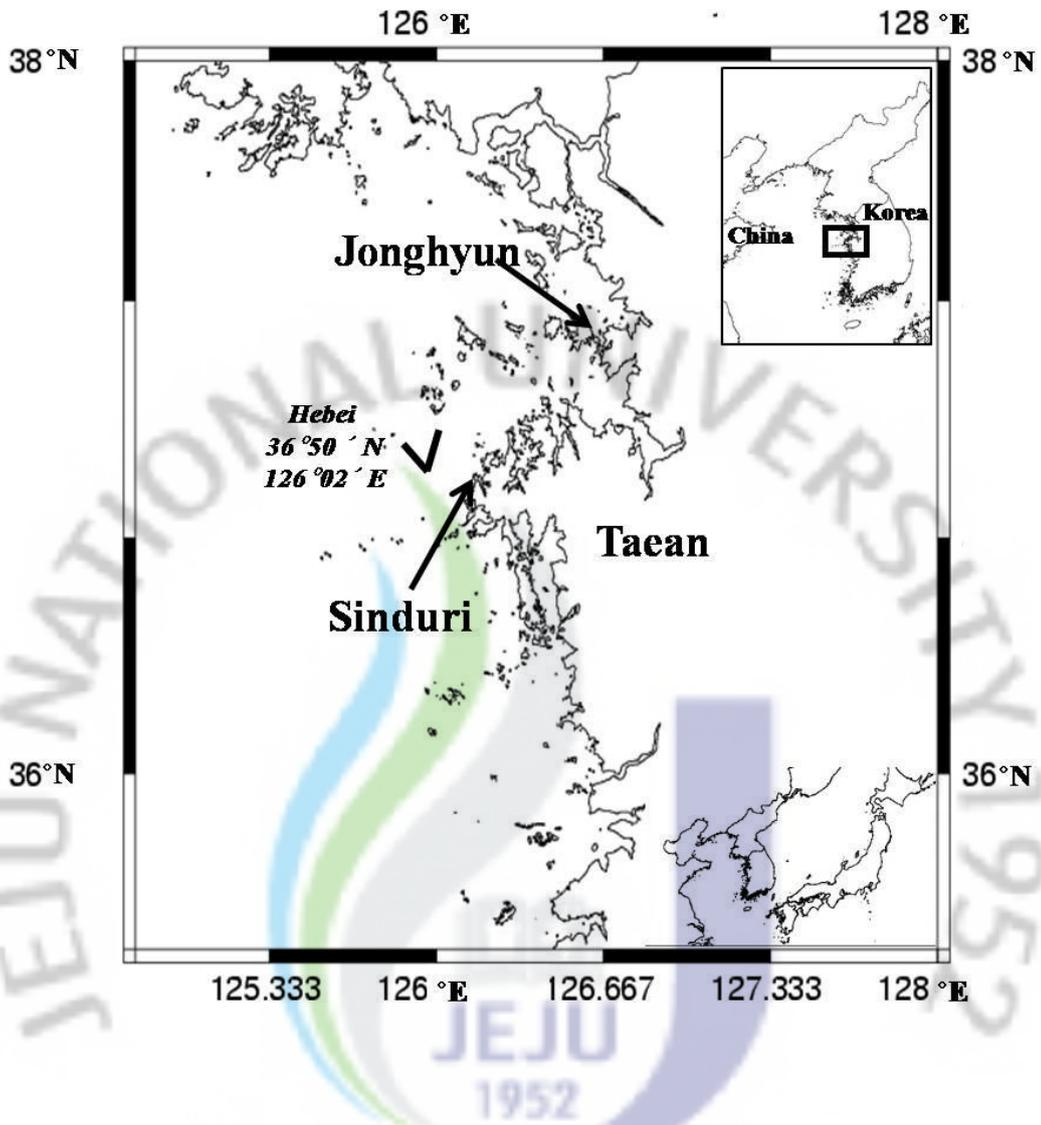


Fig. 1. Map showing study area.

사용하였으며 (Fig. 6.) 채집된 장소는 다음과 같다(Fig. 1). 두 지역 모두 2008 년 1 월부터 2009 년 1 월까지 월평균 1 회 채집하였으며 산란에 들어가는 시기에는 2 회 채집하였다. 현장에서 채집된 시료는 실험실로 옮겨 부착생물을 제거하고 패각의 길이를 측정하였다. 패각내에 육질부의 용량을 산출하기 위해 메스실린더를 이용하여 개각 전 참굴 전체의 부피와 개각 후 적출된 조직을 제외한 패각의 부피를 측정하여 패각내 용적률을 산출하였고, 전 조직 (whole body)은 동결 건조를 실시하여 건 중량을 측정하여 참굴의 비만도(condition index)를 산출하였으며, Rainer *et al.*, (1992)의 계산식을 사용하여 나타내었다.

$$CI = \frac{\text{참굴의 건중량 (g)}}{\text{패각내 부피 (ml)}} * 100$$

육질부 건강도 상태 (physiological condition index, PCI)는 Howard *et al.* (2004)의 기준에 따라 (W), watery condition (패각내 육질의 상태가 medium oyster보다 무르며 반투명한 상태), (M), medium condition (패각내 육질부의 상태가 fat oyster에 비해 무르며 생식소 부분의 색이 옅고 밝은 갈색을 띠), (F), fat condition (육질부가 패각내에 육질이 가득 차 있고 패각을 열었을 때 anterior protein이 단단하게 차 있으며 생식소부분의 색이 크림색인 상태)으로 구분하여 (Fig. 2) 실험을 실시하였다.

2. 생식소 발달 단계 및 소화맹낭 관찰

패각으로부터 분리된 전조직 (whole body)의 중앙부를 외투강, 생식세포, 소화맹낭과 아가미 조직이 포함되도록 절단하여 Davison's solution에 하루 또는

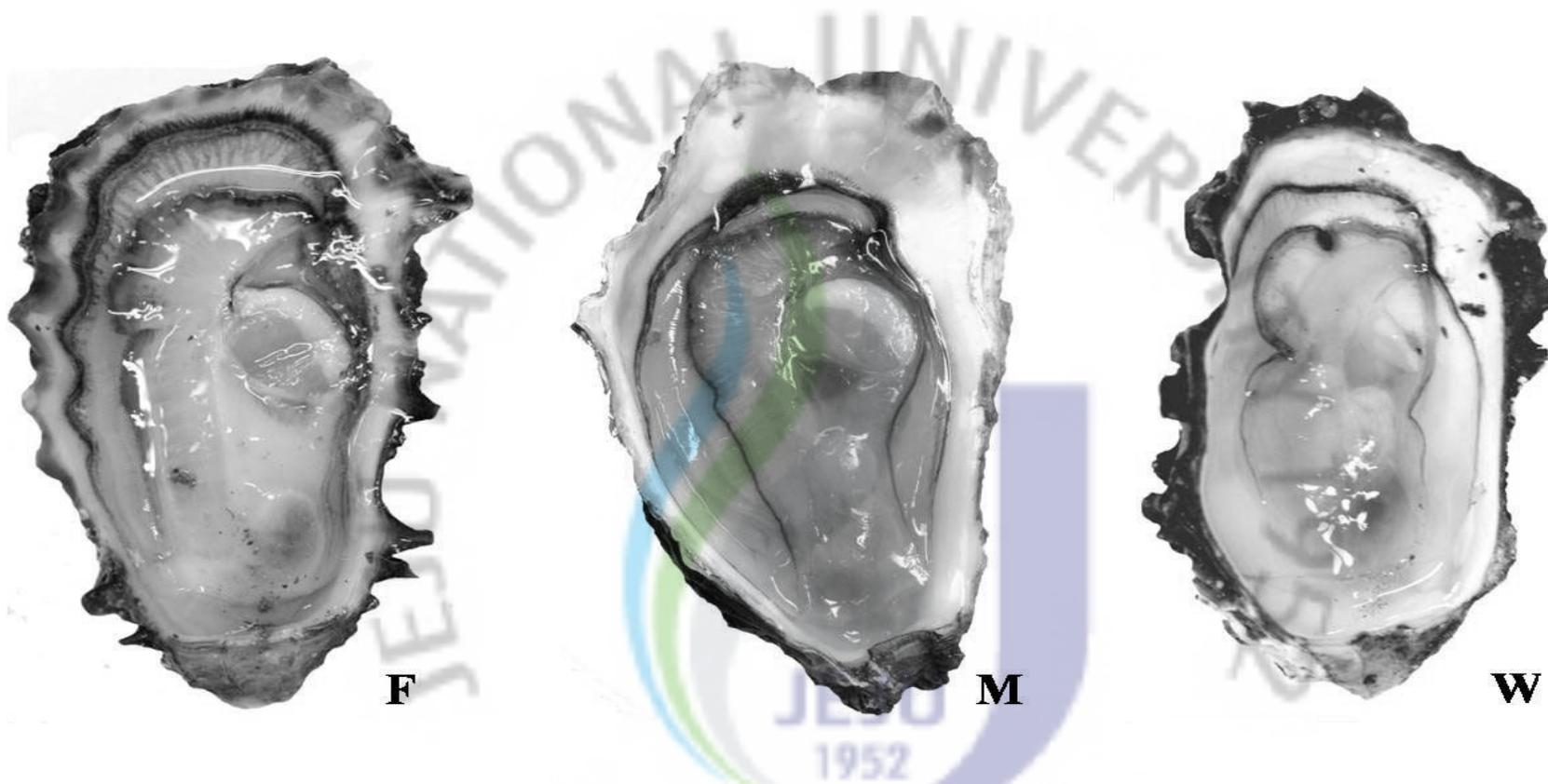


Fig. 2. Physiological condition of oyster. (F) fat condition; (M) medium condition; (W) watery condition

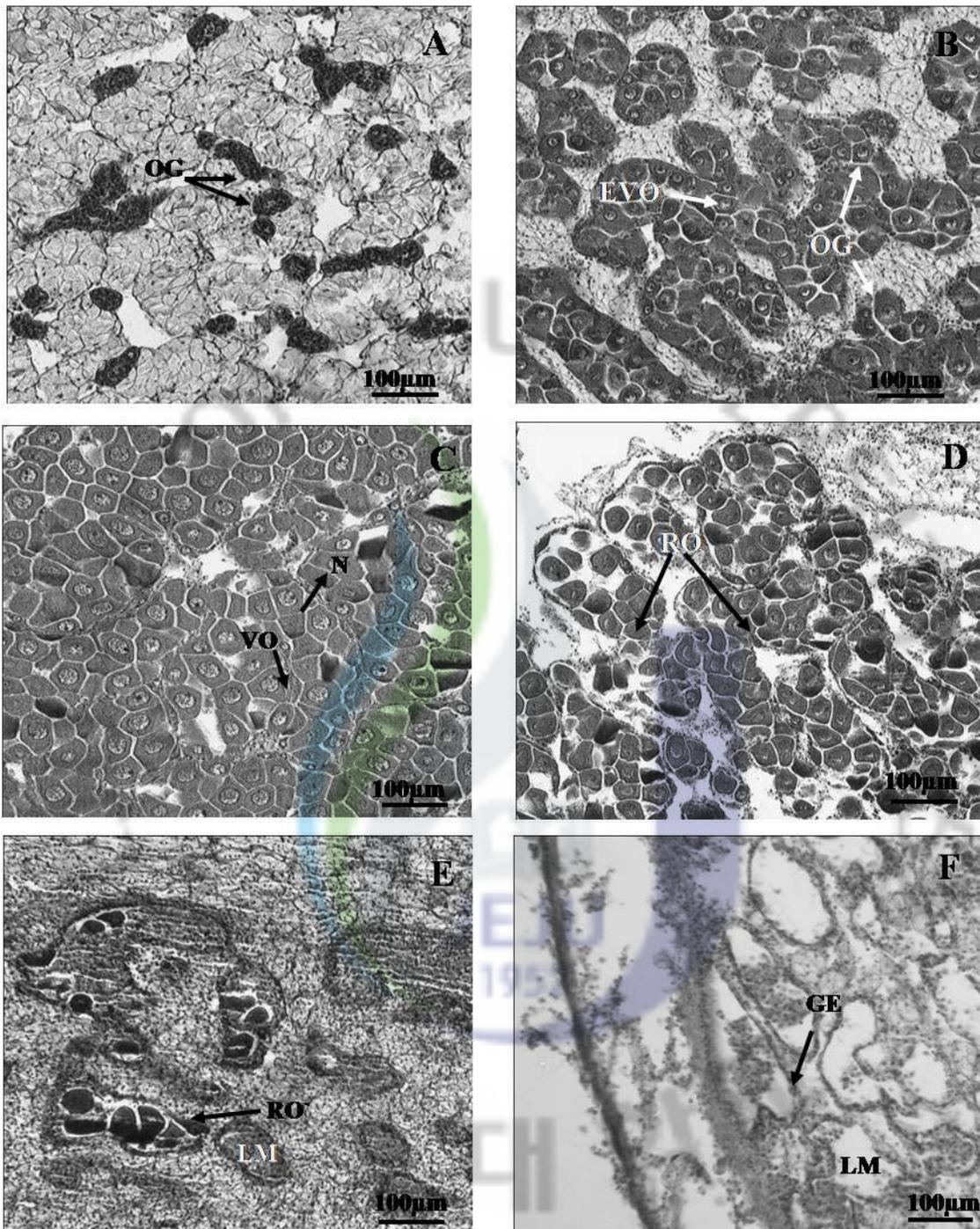


Fig. 3. Photomicrographs of ovarian development of *C. gigas* A, early development stage: OG (oogonia), B, late development stage: EVO (early vitellogenic oocyte), VO (vitellogenic oocyte); C, mature stage: N (nuclear); D, spawning stage: RO (relict oocyte); E, spent stage: LM (lumen); F, resting stage: GE (germinal epithelium).

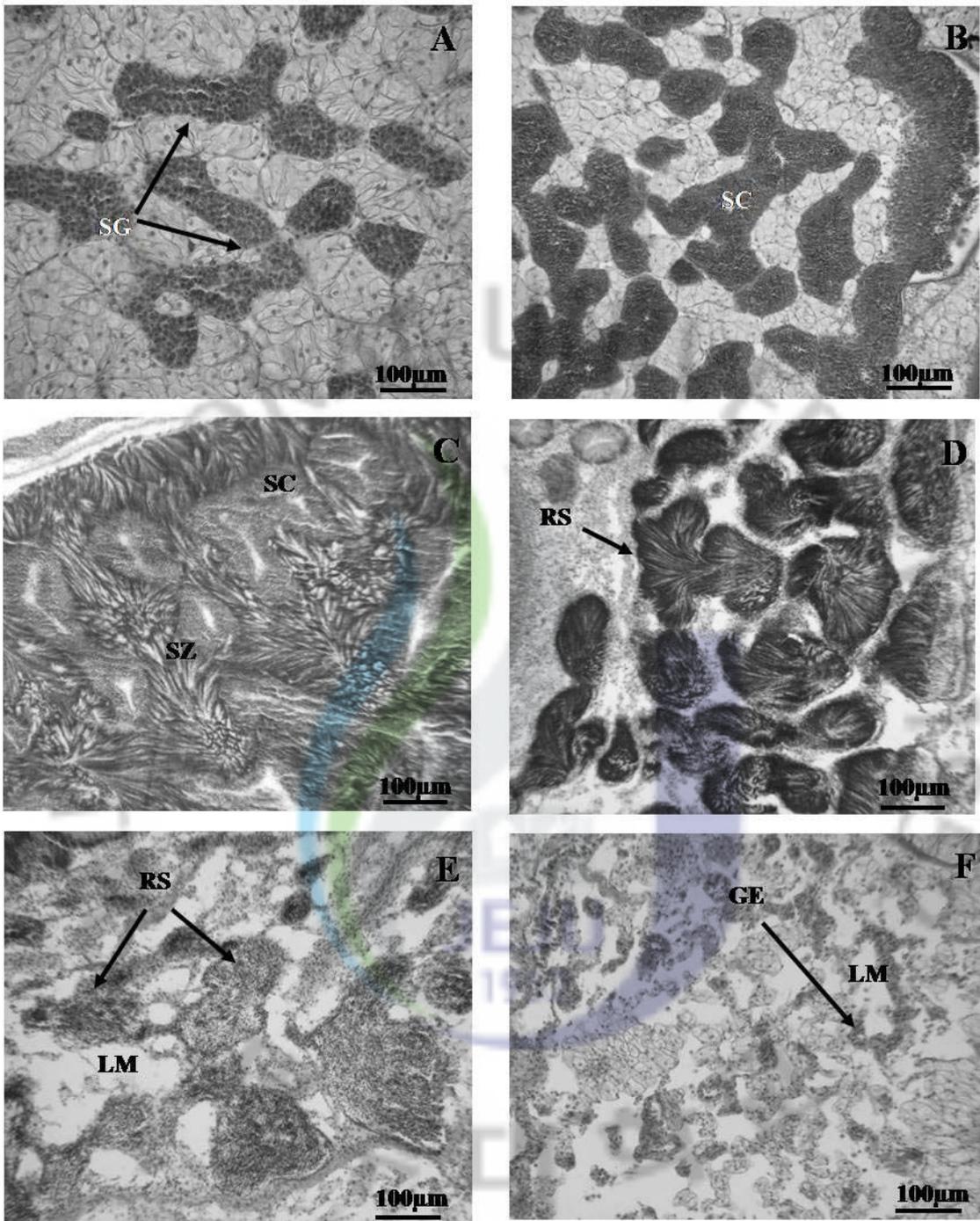


Fig. 4. Photomicrographs of testicular development of *C. gigas* A, early development stage: SG (spermatogonia); B, late development stage: SC (spermatocytes); C, mature stage: SZ (spermatozoa); D, spawning stage: LM (lumen); E, spent stage: RS (relict spermatozoa); F, resting stage: GE (germinal epithelium).

Table 1

Scale of digestive gland atrophy (Winstead *et al.*, 1995)

Score	Description
0	Normal wall thickness in most tubules (0% atrophy), lumen nearly occluded, few tubules even slightly atrophied
1	Average wall thickness less than normal, but greater than one-half Normal Thickness, most tubules showing some atrophy, some tubule still normal
2	Wall thickness averaging about one-half as thick as normal
3	Wall thickness less than one-half of normal, most tubules walls significantly atrophied, some walls extremely thin (fully atrophied)
4	Wall extremely thin (100% atrophied), nearly all tubules affected

이들간 고정하였다. 고정된 시료는 70% 에탄올로 탈수하여 파라핀 블록에 포매하였다. 파라핀 포매된 조직은 마이크로톰을 이용하여 6 um 두께로 절단하여 Harris' hematoxylin과 eosin Y로 염색하여 생식소 발달 및 소화맹낭 위축도 산정을 관찰하였다. 생식소 발달 단계는 (Siddiqui and Ahmed, 2002)의 방법에 따라 광학현미경하에서 관찰하여 구분하였다 (Fig. 3 and 4). 소화맹낭 위축도는 오염물질 축적 정도에 따른 각 개체간의 계절적 스트레스 정도를 파악할 수 있는 조직학적 관찰방법이며 (Winstead, J. T., 1995), 소화맹낭의 위축도 (Fig. 5)는 소화선의 내벽과 외벽의 두께, 소화선 내의 공간 정도를 관찰하여 0-4 단계 등급으로 구분하여 (Table 1) 분석하였다 (Ellis *et al.*, 1998).

4. 참굴 조직의 성분 분석

단백질 분석은 Lowry, *et al.*, (1951) 방법을 이용하였다. 20 mg의 건조된 참굴 시료에 0.1 M NaOH 용액을 첨가하여 37 °C 2 시간 동안 반응시켰다. 반응액을 원심분리하여 상등액을 취하고 단백질 정량에 사용하였다. BSA (bovine serum albumin)을 standard로 사용하고, BCA 시약을 혼합한 시료는 562 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도와 흡광도의 상관식에 따라 단백질 함량 (mg/g dry tissue weight, DTWT)을 산출하였다.

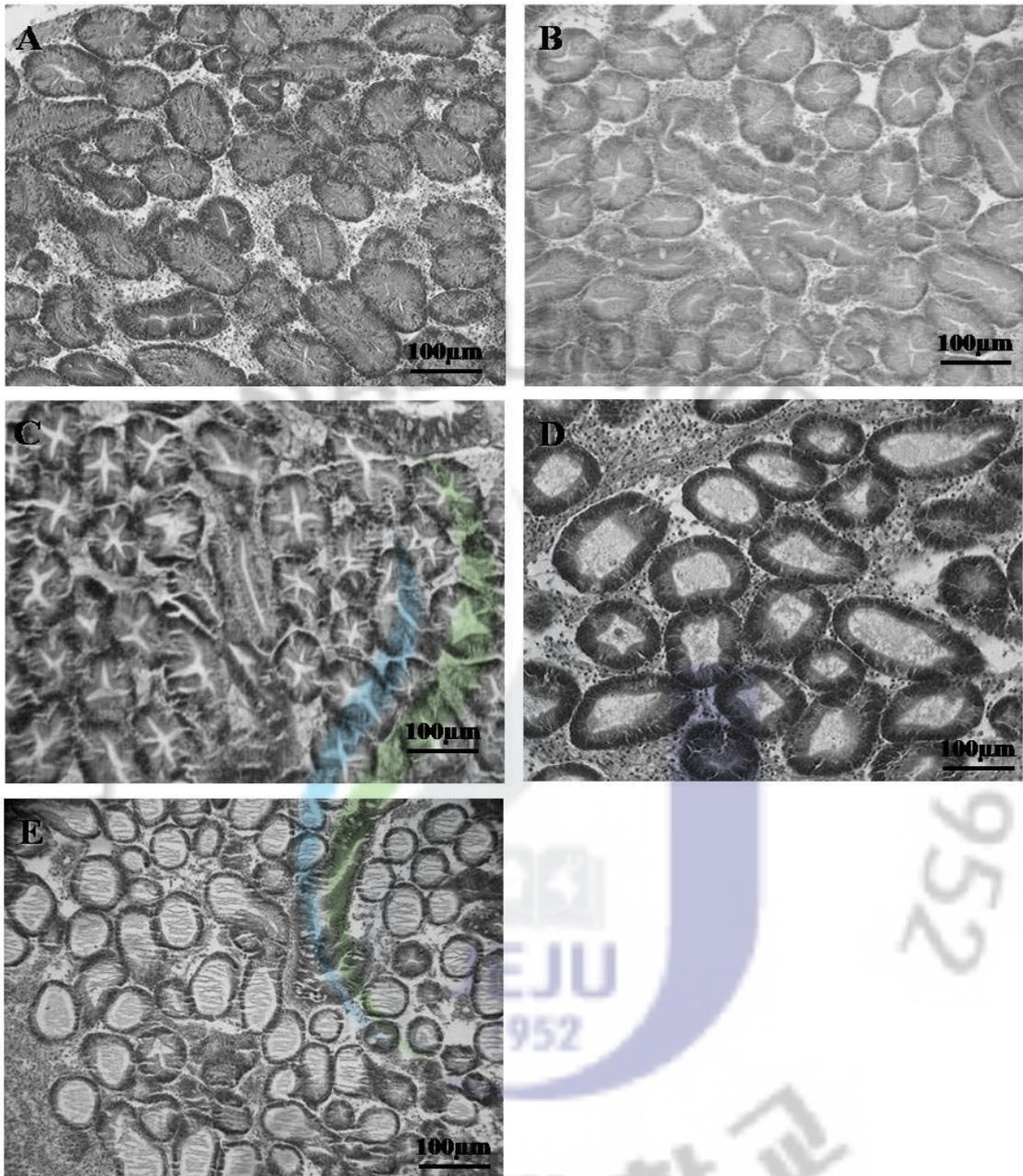


Fig. 5. Digestive gland atrophy of Pacific oyster (*C. gigas*). A, (score 0): digestive gland atrophy without sign of atrophy. B, (score 1): thickness of digestive gland tubule is normal but the small lumen appeared. C, (score 2): the columnar epithelium of digestive gland was observed with wider lumen. D, (score 3): the decrease in of columnar epithelium to almost cuboidal, the lumen was obvious. E, (score 4): The digestive gland tube is extremely thin. The large lumen was observed.

총 탄수화물 분석은 Taylor (1955)의 phenol & sulfuric 방법을 이용하였다. 동결 건조된 시료 20 mg을 취하여 PBS (phosphate buffered saline pH 7.4)를 혼합하여 초음파 분쇄기를 이용하여 균질화 하였다. 균질화된 시료는 원심분리 (5162 xg, 5 분)한 뒤 상등액을 취하여 10배 희석하였으며 표준 물질로 dextrose anhydrose를 사용하였고, 취득한 상등액에 10% phenol과 sulfuric acid를 첨가하여 실온에서 반응시켰다. 반응액을 490 nm에서 흡광도를 측정하여 탄수화물양과 흡광도간의 상관식에 따라 탄수화물 함량 (mg/g DTWT)을 나타내었다.

총 지질은 Bligh and Dyer (1959)의 chloroform-methanol 분석법을 사용하였다. 동결건조된 시료 100 mg을 solvent A (chloroform : methanol= 1:2) 6 ml를 가하여 초음파로 용액을 균질화 하였다. 균질화된 용액은 574 xg, 5 분간 원심분리하여 상등액을 취한 후, 4°C 에 보관하였다. 남아있는 있는 pellet에 solvent B (chloroform : methanol= 2:1) 6 ml를 가하여 혼합하고 위의 방법과 동일하게 원심분리를 수행하였다. 분리된 상등액에 4°C에 보관중인 용액과 혼합하여, 1% NaCl를 가하여 4°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 1 시간 후, 혼합액을 원심분리시켜 methanol-물층과 chloroform-lipid층으로 나뉘어진 상등액으로부터 하층의 chloroform-lipid를 미리 무게를 측정하여 준비해둔 알루미늄 접시에 옮겨 60°C에 12 시간 건조하여 건조 전후의 무게를 측정하고, 이를 이용하여 총 지질의 무게를

산출하였다. 총 지질 함량은 시료 건중량 무게에 대한 값 (mg/g DTWT)으로 나타내었다.

Chlorophyll-a 함량은 Moran and Porath (1980)의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 동결건조 된 참굴시료 20 mg에 N,N- dimethylformamide 900 ml을 혼합후 4°C, 30 분간 방치하였다. 혼합물을 5,162 xg, 5 분간 원심분리하여 부유물질을 가라앉히고 chl-a 농도는 상등액을 취하여 750nm의 흡광도를 측정하여 탁도를 보정하고 , 664, 647 nm에서 흡광도를 측정하여 scan한 후 각각의 식에 맞추어 계산하였다.

5. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

유류유출 지역의 참굴 과 대조구 지역의 참굴의 번식량 변화를 비교하기 위하여 Kang, *et al.*, (2003)이 개발한 난 단백질에 특이적으로 발현하는 항체 (anti-oyster egg specific protein rabbit IgG)를 이용하여 난 특이성과 감도 확인을 위해 ELISA를 실시하였다. 항원 단백질로 참굴 알을 외투막, 아가미, 순관, 폐각근 분말을 섞어 알 함량이 5, 10, 20, 40, 60%가 되도록 항원 단백질을 1X PBS 용액에 녹여 원액의 1000배 희석하여 준비하였다. 두 지역의 시료는 조직학적 관찰을 통해 선별된 암컷 개체를 이용하여 각각 20 mg의 동결 건조된 분말을 PBS 용액에 녹여 원액의 1000배 희석하였다. 준비된 standard와 두 지역 시료를 96 well plate에

100 ul씩 분주하여 4°C에 밤새 배양하였다. 다음날, 1% BSA (bovine serum albumin)을 함유한 PBST-100 (triton-100 in PBS)을 가하여 1 시간 동안 blocking을 하였다. Blocking이 끝난 시료는 Kang, S. G., (2003)에 의해 만들어진 8µg/ml rabbit IgG를 100µl 첨가하여 1 시간 동안 반응시키고, 2차 항체는 1000배 희석된 alkaline phosphate-conjugated goat-antirabbit IgG (Sigma, A3687)를 1ug/ml농도가 되게 첨가한 후 1 시간 동안 반응시킨 후, 발색기질로 p-nitrophenylphosphate 100µl를 첨가하여 발색시킨 후, 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

III. 결과

이 연구에서 사용된 참굴의 평균 각장은 유류유출지역 참굴 40.8 ~ 79.0 mm 범위였고, 대조구 지역 참굴의 각장의 범위는 77.4 ~ 89.3 mm 였다 (Fig 6).

1. Condition index 변화

두 지역간의 폐각의 성장은 유류유출지역 참굴이 대조구지역 참굴보다 연평균 12.7 ± 4.5 mm 작은 성장을 나타내었다 (Fig. 6.). 육안으로 관찰한 두 지역 참굴의 건강도는 Figure. 8에 나타내었다. 대조구지역 참굴은 2월부터 6월초까지 대부분이 fat condition을 보이다 산란기 이후부터 2009년 1월까지

56.3%의 medium condition을 보였다. 유류유출지역 참굴은 1월부터 6월말까지 대부분이 medium condition이었으며, watery condition (21.1%)도 관찰되었다. 이후, 7월 초부터 조금씩 fat condition이 관찰되기 시작하여, 9월초에 대부분이 fat condition (87.5%)으로 나타났다. 두 지역의 참굴 패각내 부피와 육질부의 건중량 비로 산출된 CI결과는 Table 4 와 Figure 7에 나타내었다. 대조구지역 참굴은 산란직전인 6월초에 가장 높은 값 (16.4)을 나타내었고, 산란 이후 감소하는 경향을 보이다가 10월말에 일시 증가하는 패턴이 관찰되었다. 유류유출지역 참굴의 CI결과는 3월부터는 증가하기 시작하여 6월말 (10.8)과 9월 (12.4)에 가장높은 CI가 관찰되었다. 두 지역간의 CI를 비교한 결과, 3월부터 6월초까지는 대조구지역 참굴이 유류유출지역 참굴 보다 높은 CI값을 보이는 반면, 6월말 이후부터는 유류유출지역 참굴이 대조구 지역 참굴보다 높은 CI 를 나타내었다.

2. 생식소 발달 단계

조직학적 관찰을 통하여 두 지역간의 참굴의 생식소 발달 단계를 비교하여 Table 3과 Figure 9에 나타내었다. 유류유출지역 참굴은 3 ~ 5월 대부분의 참굴이 초기 발달 단계와 후기 발달 단계를 나타내었고, 6월말에는 완숙한 개체가 65%가 관찰되었다. 7월부터 조금씩 산란이 이루어 졌으나 본격적인 산란은 8월에 47.5%, 9월 76.3%에 나타났다. 대조구지역 참굴은 6월초에 완숙한 개체 95%가 관찰되었으며, 6월말 ~ 7월 42.5%가 산란을 하였고 8월에 산란을 마쳤다. 유류유출

지역 참굴은 대조구지역 참굴에 비해 생식소 발달 단계가 더디게 진행되어 차이를 나타내었으며 산란종결 시기 또한 늦게 종결되는 형태를 나타내었다.

2. 소화맹낭 위축도 비교

대조구지역 참굴은 1월 ~ 5월 1, 2 단계 위축도를 보이는 개체가 70%인 반면, 유류유출지역 참굴에서는 17.8%로 나타났다 (Fig. 10.). 유류유출지역 참굴은 1월 58.8%가 3,4 단계의 위축도를 보였으며, 3월 이후 3,4 단계의 위축도를 보이는 비율이 점차 감소하였다. 6월에는 전체 개체의 17.5%가 3,4 단계의 위축도를 나타내었다. 대조구지역의 참굴은 2월 ~ 7월 1,2 단계의 위축도를 지닌 개체가 71% 관찰되었고, 7월 이후에는 3,4 단계 위축도를 지닌 개체가 증가되는 패턴이 9월까지 관찰되었다.

3. 체조성 성분 분석

2008년 1월부터 2009년 1월까지 채집 기간 동안 분석된 두 지역의 참굴 체조직내 탄수화물, 단백질, 지질함량 변화 결과와 체내에 함유되어있는 Chlorophyll-a양을 Table 5와 Figure 11에 나타내었다. 유류유출지역 참굴의 탄수화물 함유량은 연간 3.8 ~ 32.5mg/g DTWT의 범위를 보였고, 단백질과 지질의

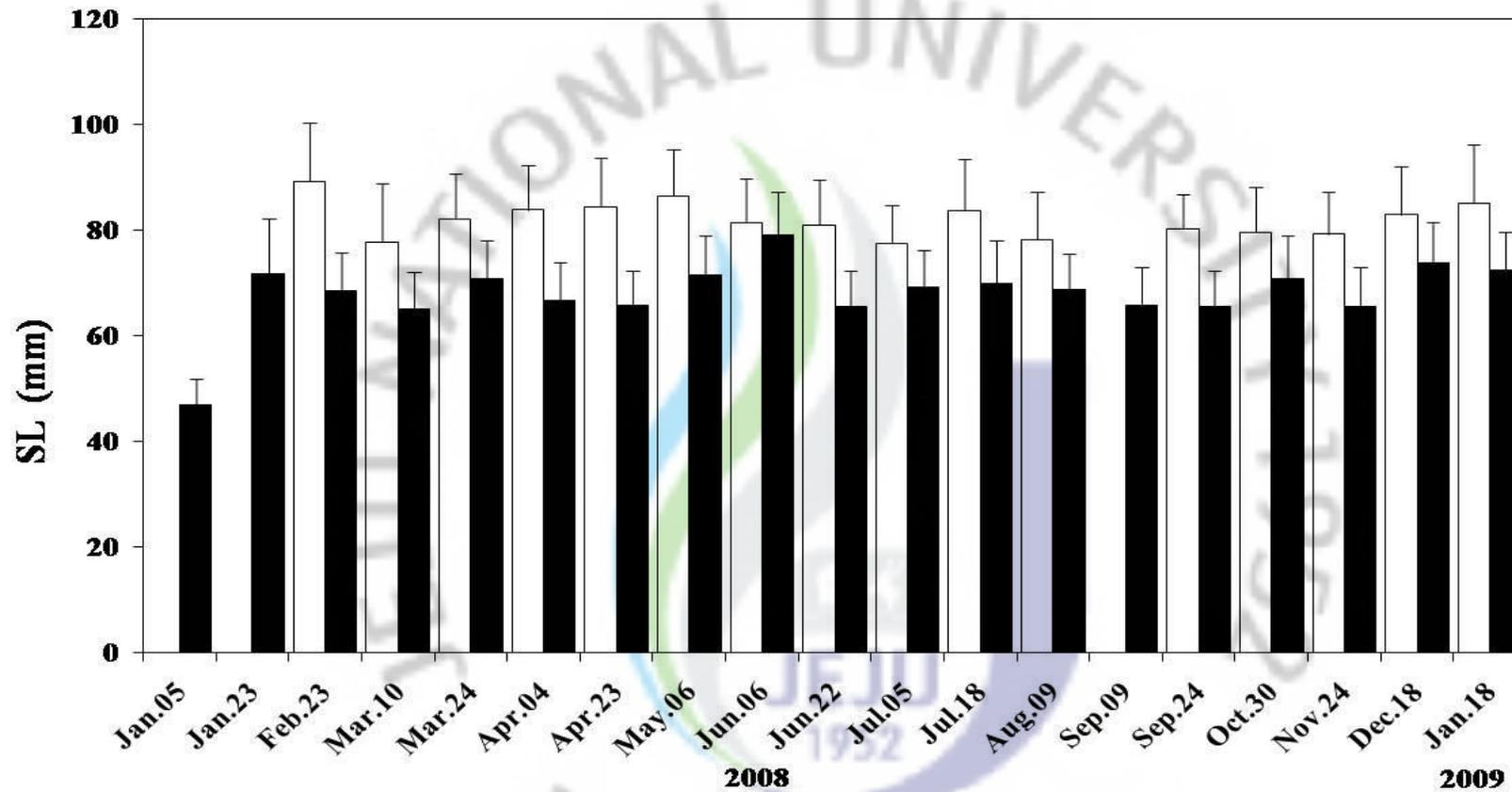


Fig. 6. Seasonal shell growth of oyster in the spilled area and control area. black bar (spilled area at Sinduri), white bar (Control area at Jonghyun)

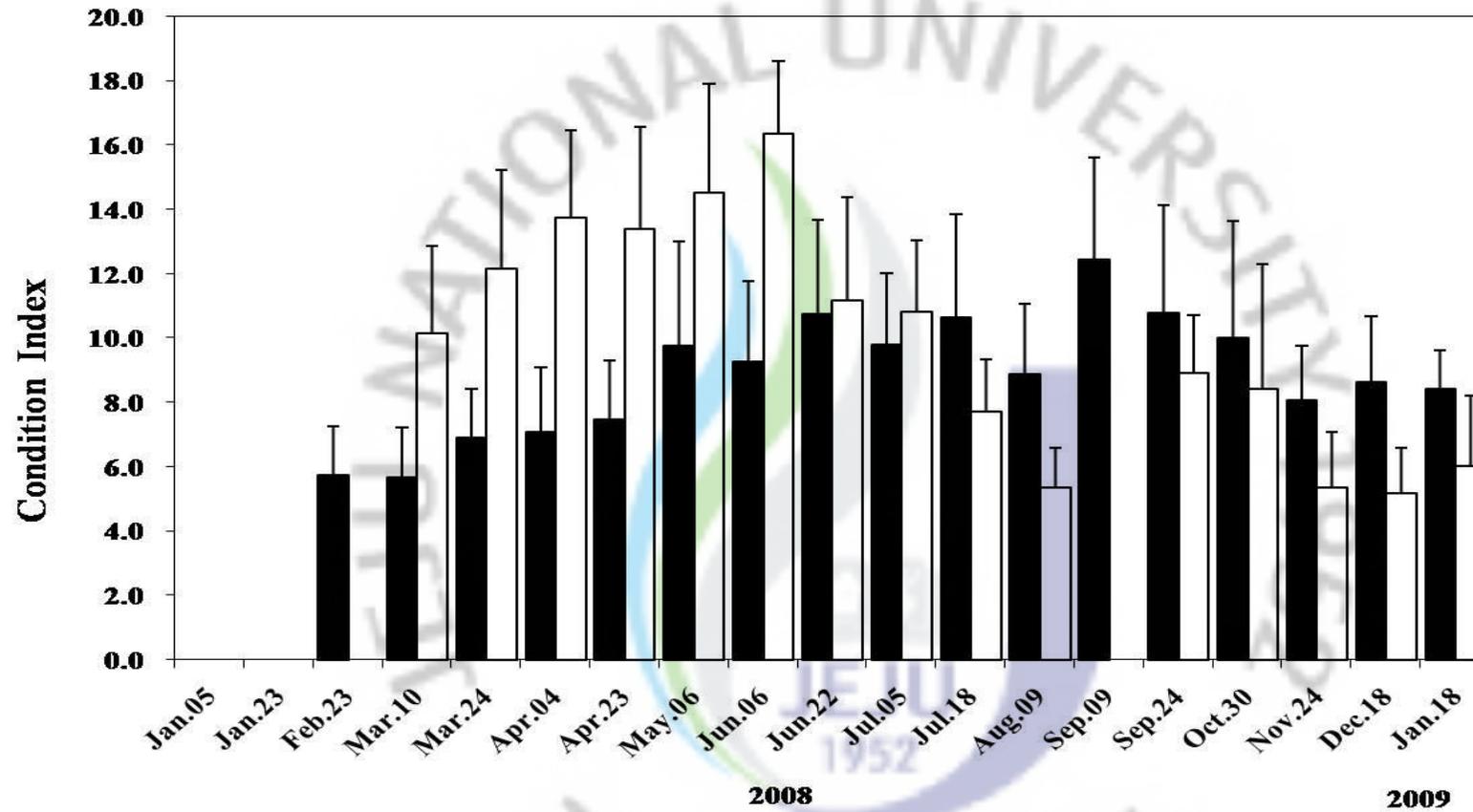


Fig. 7. Seasonal variation of condition index of oyster in the spilled area and control area. black bar (spilled area at Sinduri), white bar (control area at Jonghyun)

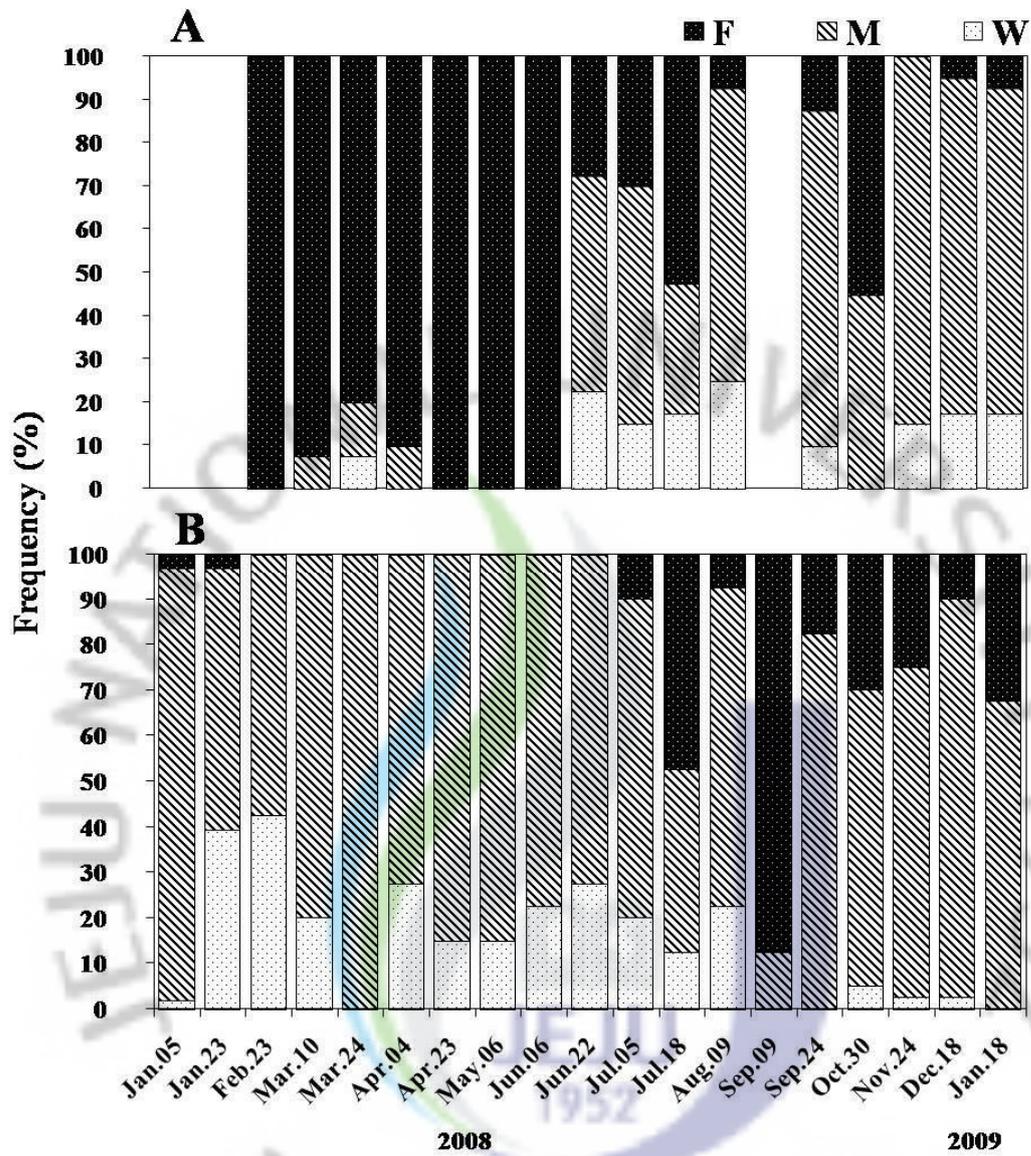


Fig. 8 Seasonal variation of PCI of oysters from spilled area and control area. (A), non-oil spill site (Jonghyun) (B), oil spill site (Sinduri). (F), fat condition, (M), medium condition, (W), watery condition.

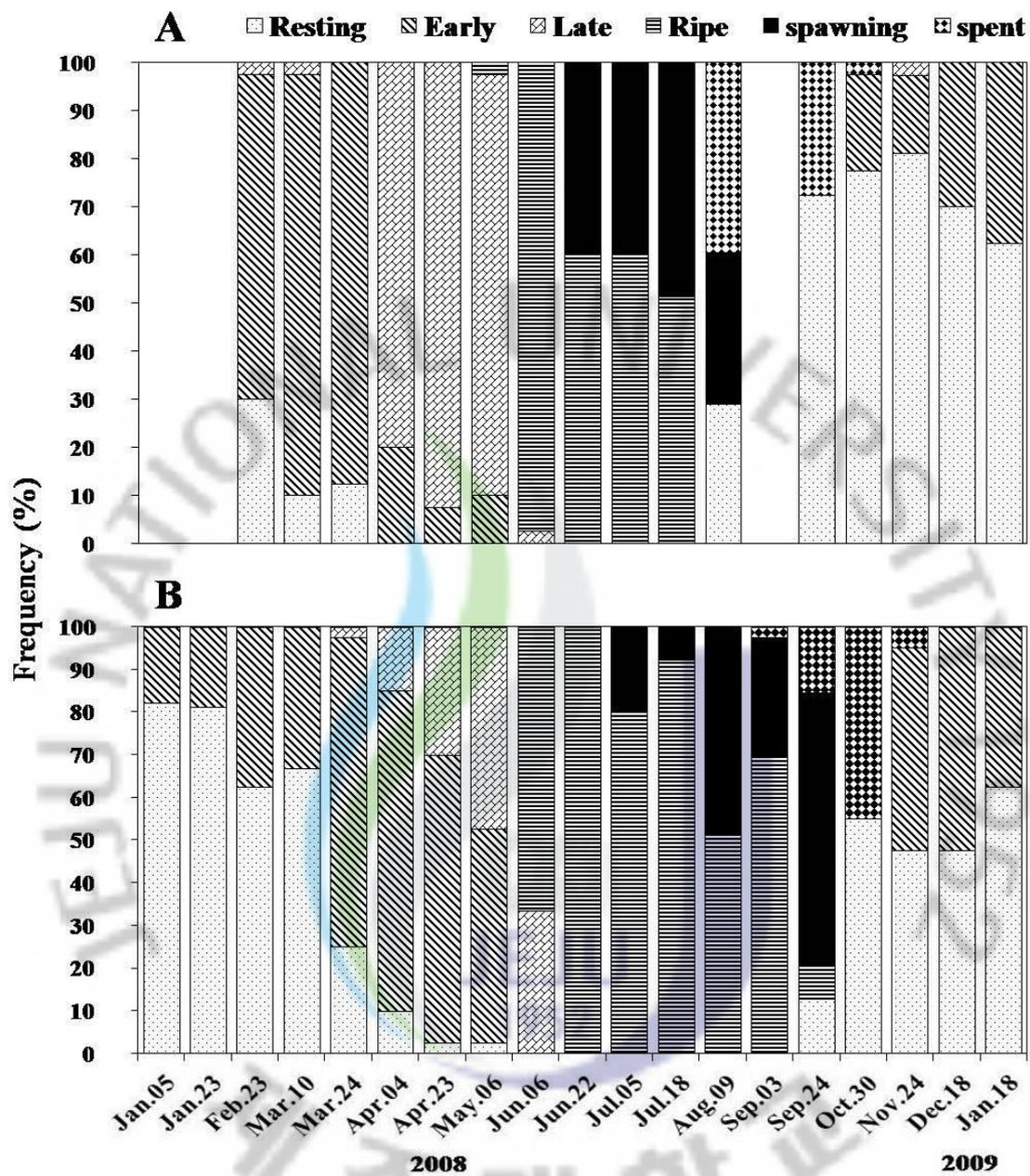


Fig. 9. Annual gametogenesis of the oyster from spilled area and control area. (A), non-oil spill site (Jonghyun) (B), oil spill site (Sinduri).

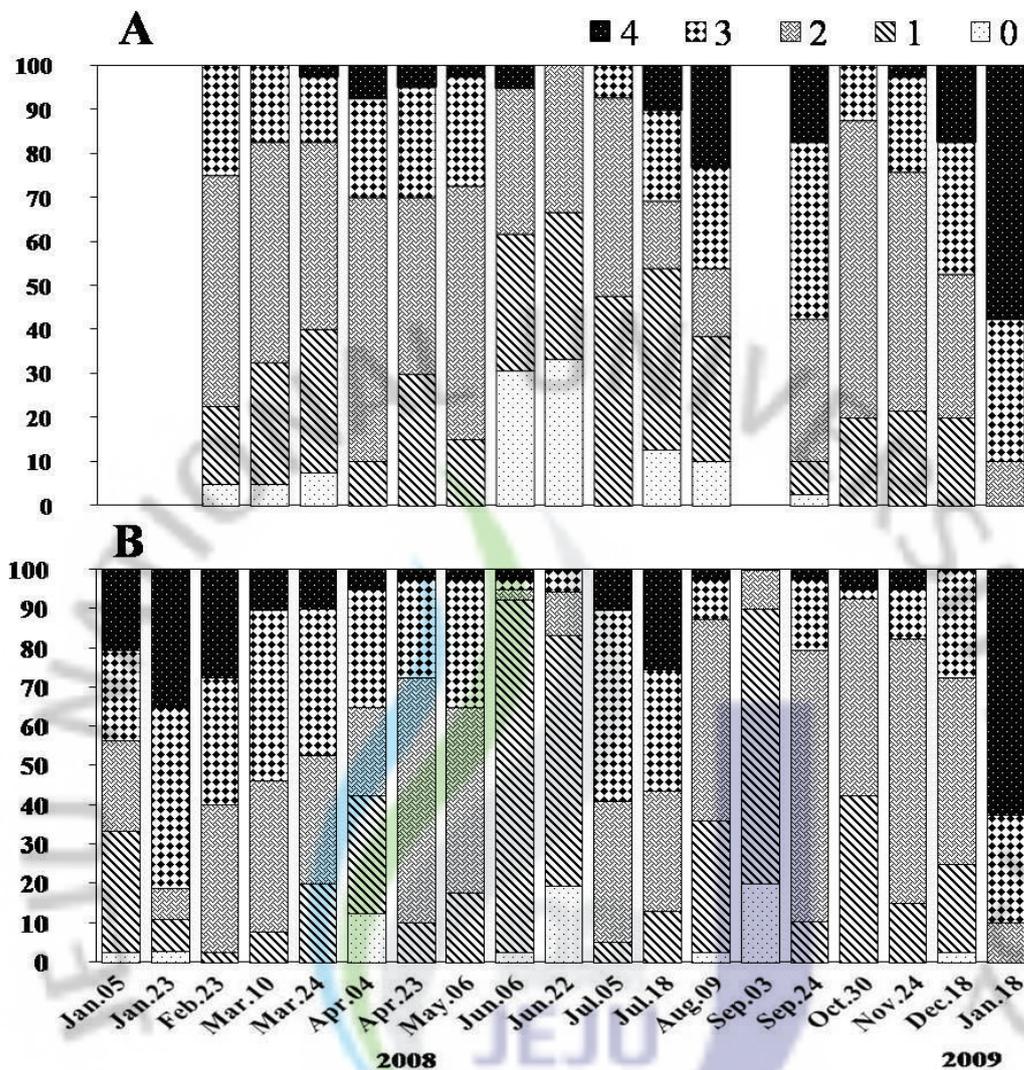


Fig. 10. Seasonal variation of digestive gland atrophy of oyster from spilled area and control area. (A), non-oil spill site (Jonghyun) (B), oil spill site (Sinduri).

함량은 29.1 ~ 39.2 mg/g DTWT와 8.2 ~ 13.7 mg/g DTWT로 각각 나타났
다. 2008년 1월에 채집된 개체의 탄수화물 함량이 가장 낮은 3.8 mg/g DTWT을
보였으나 5월 26.4 mg/g DTWT를 정점으로 이후 7월까지 감소하였다. 7월 이후
대조구지역 참굴의 탄수화물 함량 보다 평균 10.4 ± 3.3 mg/g DTWT 높은 함유량
을 나타내었다. 생식소 발달이 진행될수록 반대로 탄수화물의 함량은 줄어드는 경
향을 나타내었다. 단백질 월별 함량변화는 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았으나, 2008
년 9월부터 2009년 1월까지 증가와 감소가 주기적으로 반복되는 경향을 나타냈다.
지질의 월별 함량 변화는 1월부터 7월까지 점차적으로 증가하는 경향을 보이다, 7
월 이후로는 증가와 감소가 반복되는 경향을 나타냈다. 참굴 체내에 포함되어 있는
chlorophyll-a의 함유량을 분석한 결과, 유류유출지역 참굴에서는 4월에 가장 높은
함유량 12.2 mg/g DTWT 를 보였고, 4월 이후 급격히 감소하는 경향을 보였다. 이
와 달리, 대조구지역 참굴은 2008년 2월 5.7 mg/g DTWT 과 2009년 1월 6.6
mg/g DTWT에 가장 높은 함유량을 보였고, 2월 이후 감소하는 경향을 보이다 10
월부터 2009년 1월까지 점차 증가하는 경향을 보였다 (Table 4 and Fig. 12).

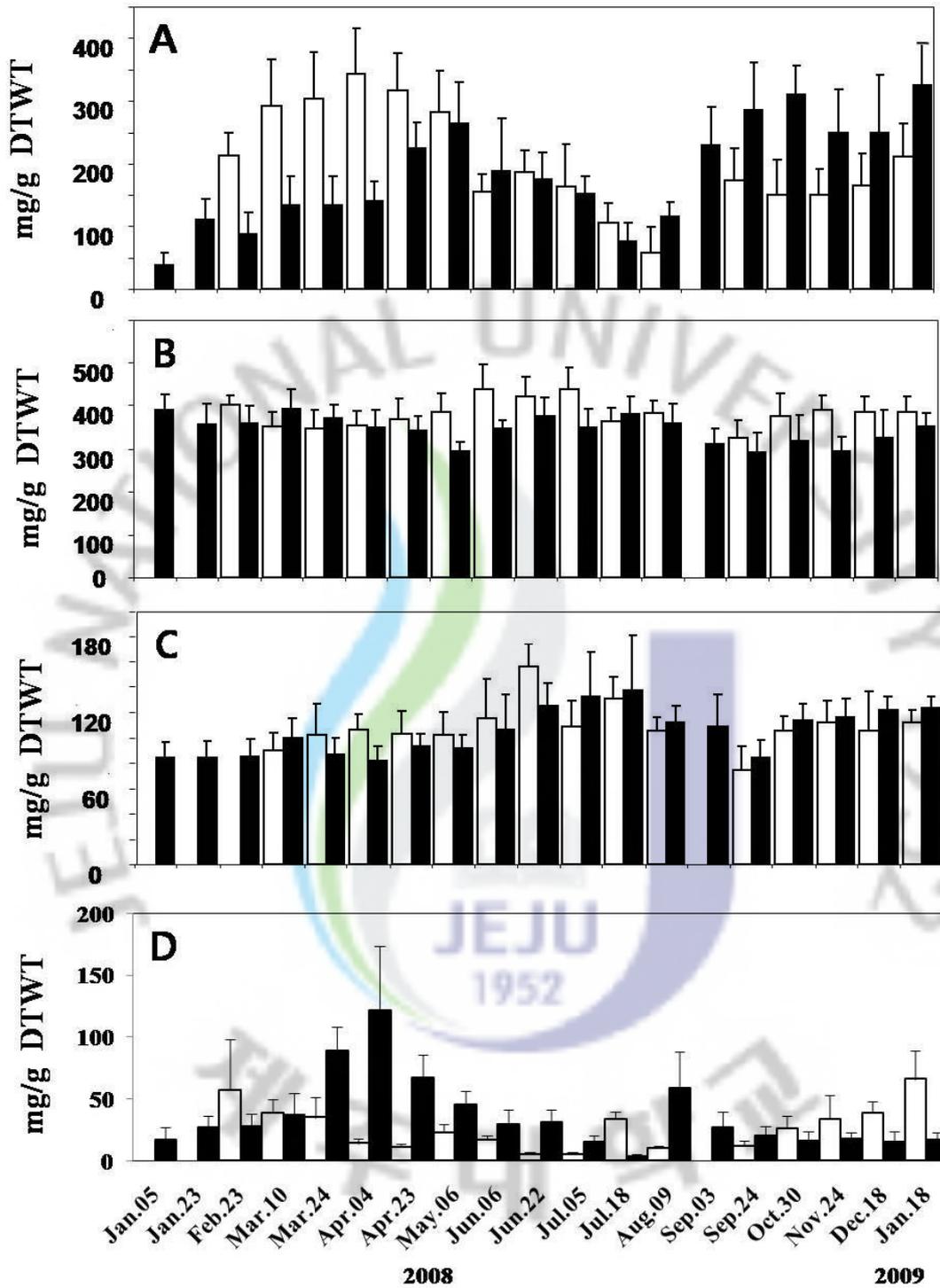


Fig. 11. Seasonal variation in biochemical components in oyster tissue from spilled area and control area. A, carbohydrate; B, protein; C, lipid; D, chlorophyll-a. black bar (spilled area at Sinduri), white bar (Control area at Jonghyun)

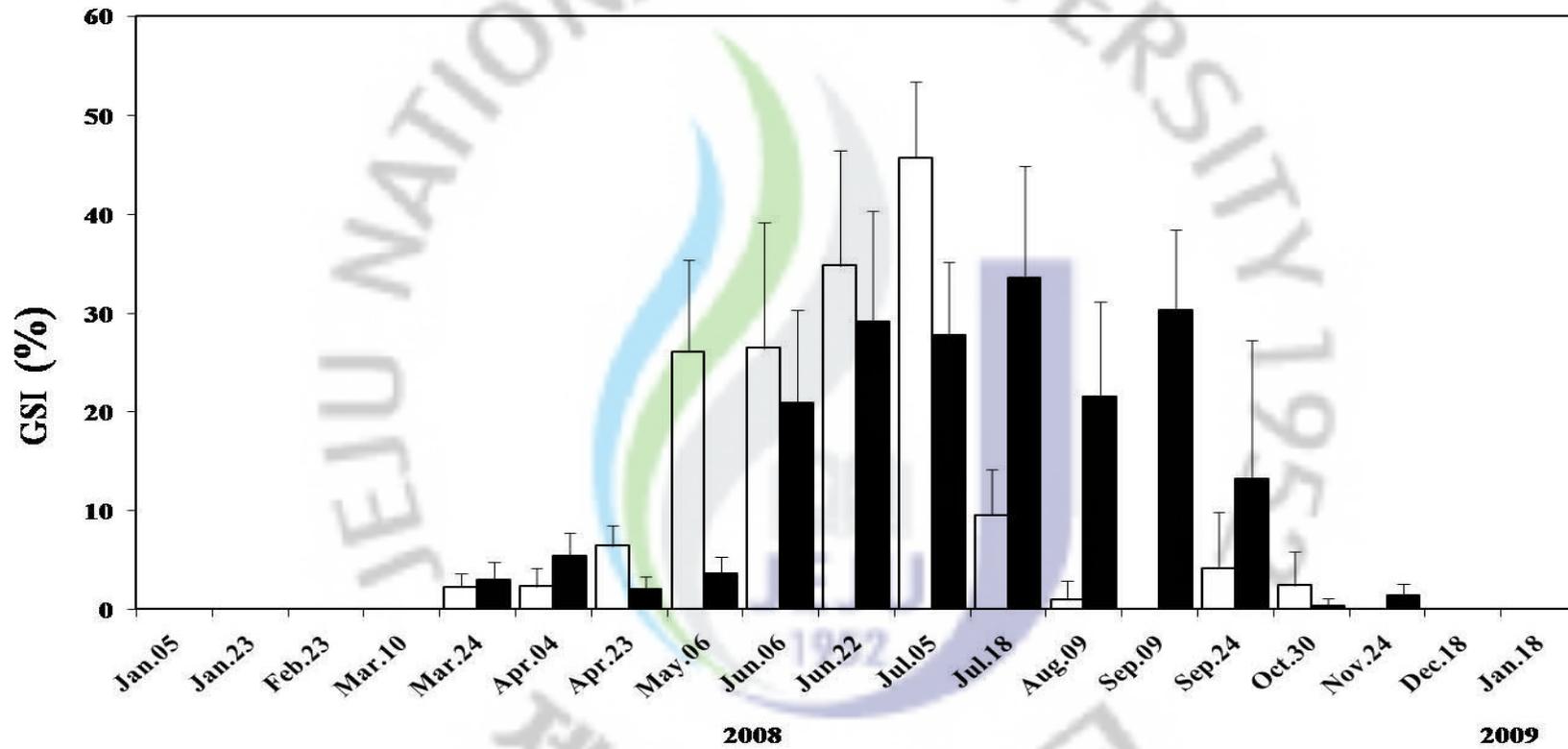


Fig. 12. Monthly variation in GSI of the oysters from spilled area and control area. black bar (spilled area at Sinduri), white bar (Control area at Jonghyun)

5. 효소면역법을 이용한 번식량 측정

참굴 알에 특이적으로 반응하는 다클론 항체를 이용한 ELISA 분석을 통해 두 지역간 번식량을 측정하여 비교하였다 (Fig. 13 and Table 4). 두지역 모두 후기 발달단계가 관찰되는 시기부터 번식량 측정이 가능하였다. 유류유출 지역 참굴의 경우 3월부터 측정이 가능하였으며 5월 이후 급격히 GSI값이 증가하여 7월 33.6%의 GSI를 나타내었고 이후 7월말, 가장 높은 33.6%, 9월초 30.3%로 두 번의 peak를 보이며, 10월 0.3%로 가장 낮게 나타났다. 대조구지역 참굴의 경우에는 4월 이후 증가하다 7월 초 가장 높은 45.7% GSI값을 나타내었고 유류유출 지역에서는 두 번의 peak를 보였지만 대조구 지역 참굴에서는 한번의 peak만을 나타내었으며 8월 1.0%로 가장 낮은 GSI를 나타내었다.

IV. 고찰

CI 는 이매패류의 영양상태와 스트레스에 의한 생리적 변화를 측정하는데 중요한 역할을 하며 (Rainer, J. S. and Mann, R., 1992), 이매패류는 환경오염물질에 대한 영향을 알아보는데 있어 적합한 생물이며, 이매패류의 성장연구에도 널리 쓰이고 있다 (Bayne, 1985; Guolan and Yong, 1995; Dame, 1996; Hummel *et al.*, 1996; Boscolo *et al.*, 2004; Duquesne *et al.*, 2004).

Table 2
 Temporal variations in digestive gland strophy (D), reproductive gland atrophy (R), physiological condition index (PCI) in the Sinduri (spilled area) and Jonghyun (control area) during the sampling period. The number in parenthesis is standard deviation. Sample number (N)

Period	Jonghyun				Sinduri			
	N	R	D	PCI	N	R	D	PCI
08.05-Jan					135	0.2 (0.4)	2.3 (1.2)	2.0 (0.2)
23-Jan					161	0.2 (0.4)	3.0 (1.0)	2.6 (0.6)
23-Feb	40	0.7 (0.5)	2.0 (0.8)	3.0 (0.0)	40	0.4 (0.5)	2.9 (0.9)	2.7 (0.5)
10-Mar	80	0.9 (0.3)	1.8 (0.8)	2.9 (0.3)	80	0.2 (0.4)	2.6 (0.8)	1.8 (0.4)
24-Mar	40	0.9 (0.3)	1.7 (0.9)	2.7(0.6)	40	0.8 (0.5)	2.4 (0.9)	2.0 (0.0)
09-Apr	40	1.4 (0.5)	2.3 (0.7)	2.9(0.3)	40	1.1 (0.5)	1.9 (1.1)	1.7 (0.5)
23-Apr	40	1.9 (0.3)	2.1 (0.9)	3.0 (0.0)	40	1.3 (0.5)	2.2 (0.6)	1.9 (0.4)
06-May	40	1.9 (0.3)	2.2 (0.7)	3.0 (0.0)	40	1.5 (0.5)	2.2 (0.8)	1.8 (0.4)
07-Jun	40	3.0 (0.2)	1.2 (1.0)	3.0 (0.0)	40	2.7 (0.5)	1.1 (0.6)	1.8 (0.4)
22-Jun	40	3.4 (0.5)	2.0 (1.3)	2.1 (0.7)	40	3.0 (0.0)	1.0 (0.7)	1.7 (0.4)
05-Jul	40	3.4 (0.5)	1.6 (0.6)	2.2 (0.7)	40	3.2 (0.4)	2.6 (0.7)	1.9 (0.5)
18-Jul	40	3.5 (0.5)	1.7 (1.2)	2.4 (0.8)	40	3.1 (0.3)	2.7 (1.0)	2.4 (0.7)
09-Aug	40	3.2 (2.1)	2.2 (1.4)	1.8 (0.6)	40	3.5 (0.5)	1.8 (0.8)	1.9 (0.5)
03-Sep	40				40	3.3 (0.5)	0.9 (0.5)	2.9 (0.5)
24-Sep	40	1.4 (2.2)	2.6 (0.9)	2.0 (0.5)	40	3.6 (1.5)	2.1 (0.6)	2.2 (0.4)
30-Oct	40	0.9 (0.9)	1.9 (0.6)	2.6 (0.5)	40	2.3 (2.5)	1.7 (0.8)	2.3 (0.5)
24-Nov	40	0.2 (0.5)	2.1 (0.7)	1.9 (0.4)	40	0.7 (1.1)	2.1 (0.7)	2.2 (0.5)
18-Dec	40	0.3 (0.5)	2.5 (1.0)	1.9 (0.5)	40	0.5 (0.5)	2.0 (0.8)	2.1 (0.4)
09.18-Jan	40	0.4 (0.5)	3.5 (0.7)	1.9 (0.5)	40	0.4 (0.5)	3.5 (0.7)	2.3 (0.5)

Table 3
 Monthly mean shell length in mm (SL), tissue dry weight (TDW), condition index (CI), and gonad somatic index (GSI) of Sinduri (spilled area) and Jonghyun (control area).
 The number in parenthesis is standard deviation. sample number (N)

Period	Jonghyun					Sinduri				
	N	SL	TDW	CI	GSI	N	SL	TDW	CI	GSI
08.05-Jan						161	40.8 (5.0)	0.1 (0.4)		
23-Jan						135	60.5 (10.2)	0.4 (0.2)		
23-Feb	40	89.3 (11.0)	0.9 (0.3)	N.D		40	68.5 (7.1)	0.5 (0.2)	5.7 (1.5)	
10-Mar	80	77.8 (11.0)	1.2 (0.5)	10.2 (2.7)	2.2 (1.4)	80	65.0 (7.0)	0.5 (0.2)	5.7 (1.6)	2.9 (1.9)
24-Mar	40	82.0 (8.6)	1.7 (0.6)	12.2 (3.1)	2.3 (1.8)	40	70.8 (7.1)	0.6 (0.2)	6.9 (1.5)	5.4 (2.3)
09-Apr	40	83.8 (8.3)	1.9 (0.6)	13.7 (2.7)	6.4 (2.1)	40	66.6 (7.3)	0.5 (0.2)	7.1 (2.0)	2.0 (1.3)
23-Apr	40	84.3 (9.3)	1.9 (0.6)	13.4 (3.2)	6.4 (2.1)	40	65.7 (6.4)	0.6 (0.2)	7.5 (1.8)	3.6 (1.7)
06-May	40	86.5 (8.7)	2.0 (0.5)	14.5 (3.4)	26.1 (9.3)	40	71.5 (7.3)	0.9 (0.2)	9.7 (3.3)	3.6 (1.7)
07-Jun	40	81.0 (8.3)	2.3 (0.6)	16.4 (2.3)	26.5 (12.7)	40	79.0 (8.2)	1.1 (0.3)	9.2 (2.5)	20.8 (9.5)
22-Jun	40	80.9 (8.6)	1.2 (0.3)	11.2 (3.2)	34.8 (11.7)	40	65.6 (6.5)	0.7 (0.2)	10.8 (2.9)	29.2 (11.1)
05-Jul	40	77.4 (7.3)	1.4 (0.3)	10.8 (2.3)	45.7 (7.7)	40	69.1 (7.0)	1.1 (0.3)	9.8 (2.2)	27.8 (7.4)
18-Jul	40	83.7 (9.6)	0.8 (0.2)	7.7 (1.6)	9.5 (4.6)	40	69.9 (8.1)	1.1 (0.4)	10.6 (3.2)	33.6 (11.3)
09-Aug	40	78.1 (9.0)	0.5 (0.2)	5.3 (1.2)	1.0 (1.9)	40	68.7 (6.7)	0.8 (0.2)	8.9 (2.2)	21.5 (9.7)
03-Sep	40					40	65.7 (7.3)	1.3 (0.3)	12.4(3.2)	30.3 (8.2)
24-Sep	40	80.2 (6.6)	0.9 (0.2)	8.9 (1.8)	4.2 (5.7)	40	65.6 (6.5)	1.0 (0.3)	10.8 (3.3)	13.2 (10.9)
30-Oct	40	79.6 (8.4)	0.8 (0.3)	10.5 (10.6)	2.4 (3.4)	40	70.9 (7.9)	1.4 (0.4)	10.0 (3.6)	0.4 (0.8)
24-Nov	40	79.2 (7.9)	0.8 (0.3)	5.3 (1.7)		40	65.5 (7.4)	1.2 (0.4)	8.1 (1.7)	1.4 (1.2)
18-Dec	40	82.9 (9.0)	0.9 (0.3)	5.1 (1.4)		40	73.7 (7.1)	1.4 (0.4)	1.4 (0.4)	
09.18-Jan	40	85.0(11.1)	1.0 (0.4)	5.9 (2.2)		40	72.5 (7.1)	1.3 (0.4)	8.4 (1.2)	

Table 4
Temporal variations in total proteins (P), (mg/g DTWT); carbohydrates (C), (mg/g DTWT); lipids (L), (mg/g DTWT); Chlorophyll-a (chl-a), (mg/g DTWT) in the Sinduri (spilled area) and Jonghyun (control area) during the sampling period. The number in parenthesis is standard deviation. Sample number (N),

Period	Jonghyun					Sinduri				
	N	P	C	L	C-a	N	P	C	L	C-a
08.05-Jan						161	54.1 (20.8)	4.2 (2.7)	12.1 (5.9)	1.7 (1.0)
23-Jan						135	291.8 (62.9)	93.5 (41.1)	12.1 (5.9)	2.7 (0.9)
23-Feb	40	416.6 (83.8)	227.5 (81.1)	95.0 (0.8)	5.7 (4.1)	40	244.0 (83.3)	62.2 (38.2)	57.2 (21.5)	2.8 (1.0)
10-Mar	80	780.5 (283.3)	640.6 (204.1)	225.8 (81.5)	3.9 (1.1)	80	318.9 (46.9)	117.4 (71.8)	82.9 (21.5)	3.7 (1.8)
24-Mar	40	873.0 (249.9)	789.0 (341.6)	277.1 (199.6)	3.5 (1.6)	40	326.6 (130.1)	131.6 (55.2)	86.3 (21.7)	8.9 (1.9)
09-Apr	40	877.3 (249.9)	863.8 (306.0)	259.5 (131.4)	1.4 (0.4)	40	294.7 (74.7)	121.2 (40.3)	69.1 (18.3)	12.2 (5.2)
23-Apr	40	890.2 (366.0)	807.1 (397.4)	252.4 (82.1)	1.1 (0.3)	40	276.4 (58.7)	182.5 (48.8)	75.5 (16.0)	6.7 (1.9)
06-May	40	957.3 (243.8)	724.9 (248.1)	299.6 (108.8)	2.3 (0.7)	40	402.2 (75.6)	366.6 (123.1)	124.7 (29.5)	4.5 (1.1)
07-Jun	40	1061.8 (432.0)	402.0 (169.8)	425.9 (100.8)	1.7 (0.3)	40	462.9 (198.2)	287.8 (182.3)	155.8 (94.7)	2.9 (1.2)
22-Jun	40	637.4 (164.7)	290.7 (107.9)	163.3 (185.7)	0.5 (0.2)	40	350.4 (92.3)	164.9 (62.5)	117.2 (34.9)	3.1 (1.0)
05-Jul	40	691.4 (129.1)	260.2 (122.7)	205.8 (40.5)	0.5 (0.2)	40	557.6 (179.8)	239.9 (76.7)	221.4 (107.3)	1.5 (0.5)
18-Jul	40	478.4 (89.1)	141.6 (51.0)	138.8 (30.9)	3.4 (0.6)	40	481.1 (244.1)	95.6 (55.1)	186.2 (126.9)	0.3 (0.2)
09-Aug	40	296.2 (78.9)	47.7 (38.7)	57.6 (13.5)	1.0 (0.2)	40	417.7 (123.4)	135.7 (53.1)	129.6 (37.2)	5.9 (2.9)
03-Sep	40					40	572.1 (123.4)	413.8 (150.7)	194.3 (50.5)	2.7 (1.3)
24-Sep	40	439.4 (88.7)	243.8 (104.8)	130.8 (39.8)	1.2 (0.4)	40	373.3 (79.3)	370.7 (129.3)	108.8 (29.4)	2.0 (0.8)
30-Oct	40	517.4 (140.6)	205.1 (115.3)	139.9 (45.0)	2.6 (1.0)	40	565.7 (111.9)	594.0 (184.8)	201.7 (44.3)	1.6 (0.8)
24-Nov	40	475.8 (118.3)	186.8 (77.3)	138.9 (47.5)	3.4 (1.9)	40	364.7 (141.1)	405.6 (182.2)	182.8 (60.2)	1.8 (0.5)
18-Dec	40	523.2 (131.1)	218.7 (83.0)	140.4 (46.6)	3.9 (0.9)	40	501.8 (180.7)	691.3 (219.7)	271.8 (74.0)	8.6 (2.0)
09.18-Jan	40	465.6 (134.9)	271.6 (115.3)	147.3 (30.5)		40	620.3 (123.0)	601.4 (224.9)	220.9 (56.1)	

또한 Won and Hur (1993)의 연구에 의하면 이매패류의 번식주기는 CI 를 산출하여서 간접적인 산란시기를 추정하는데 이용할 수 있다고 보고 하였다. Kang *et al.* (2004)는 바지락의 CI 와 조직학적 관찰을 통한 산란시기가 관련이 있다고 보고하였고, Yang (2006)의 연구에서는 CI 는 생식소가 발달함에 따라 증가하며 산란 이후 감소한다고 보고하였다. 이번 연구에서 유류유출 지역 참굴의 본격적인 산란은 이른 8 월에 한번 늦은 9 월에 한번 연중 2 회 산란하는 경향을 나타내었는데 Choi *et al.*, (1999)은 우리나라 서해안 격포지역 참굴의 산란기를 수온상승기인 7 월 중순에 한번 수온하강기인 8 월 하순에 한번 총 2 회 산란이 일어난다고 보고한 결과와 동일하게 연중 2 회 산란하였지만 기간은 다르게 나타난 것은 유류유출에 대한 스트레스로 인해 지연되었을 것으로 생각되어진다. Peteiro, *et al.*, (2006)의 연구에 의하면 2002 년 11 월 스페인에서 발생한 Presrige 유류유출 사고로 이 지역에 서식하고 있는 담치 (*Geukensia demissa*) 성장은 다른 지역에 서식하고 있는 담치에 비해 성장이 지연된다고 보고하였다. Jeong, W. G. and Cho, S. M., (2007)은 원유성분의 일종인 PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons)에 노출시킨 참굴의 먹이섭이률이 감소하는 결과를 나타내었으며, 이번 연구에서도 마찬가지로 유류유출에 영향으로 참굴의 먹이 섭이가 활발하지 못하게 되어 더딘 생식소 발달을 나타난 것으로 사료된다.

소화맹낭 위축도는 먹이섭취가 활발할 때에는 소화맹낭의 위벽의 두께가 두꺼워지며 먹이섭취가 원활하지 못 할때에 위축도가 높아지게 되며 이매패류의 먹이섭취와 관련이 있다 (Kim, Y. *et al.*, 2006). 유류유출지역의 참굴은 유류유출이 일어난 1 월에 위축도 지수 3,4 단계의 참굴이 75%를 나타냈고 이후 평균 9.5%씩 감소하면서 6 월에는 위축도 지수 3,4 단계의 참굴이 5%로 위축도가 감소하였고 대조구 지역의 참굴은 2 월부터 6 월까지 위축도 지수 3,4 단계의 참굴이 평균

24.6%로 나타나 유류유출지역의 참굴에 비해 적은 위축도를 나타내었는데, 유류유출이 일어나면서 이로 인한 스트레스로 참굴의 먹이활동이 활발하지 못하여 영양분을 소화맹낭에 저장시키지 못하여 소화맹낭의 위축도 지수가 높게 나타난 것으로 생각되어지며 Usheva *et al.*, (2006)은 소화맹낭 위축도는 해양 이매패류의 기아정도를 판단할 수 있는 척도가 된다고 보고 하였다. 해산 이매패류의 생식소 발달은 섭취한 먹이 에너지의 이용 및 저장, 즉 생체내 체조직 성분의 계절적 변화와 환경적 요인과 밀접한 관련이 있다 (Urrutia, *et al.*, 1999). Berthelin *et al.*, (2000)은 프랑스 서부해안에 서식하는 참굴 (*C. gigas*) 의 번식주기와 체조직 성분 분석연구에서 11 월에서 3 월 사이에 참굴은 글리코젠을 저장하고, 배우자 형성시기에는 단백질 및 지방은 증가하는 반면에 글리코젠은 감소한다고 보고하였으며, Jeong *et al.* (2007)은 PAHs 와 같은 환경오염 물질에 노출되었을 때 참굴은 지방과 탄수화물의 신진대사를 촉진하며 오염물질의 영향으로 폐각을 단계 되며 이후 몸 속의 에너지를 사용하게 되며 그 결과로 성장율이 저하된다고 보고하였다. Yang, (2006) 연구에 의하면 배우자형성시기에 탄수화물이 줄어드는 것은 탄수화물이 단백질로 전환되는 것과 관련이 있다고 보고하였고, 비슷한 연구로 Berthelin *et al.*, (2000)은 프랑스 서부 해안에 서식하는 참굴의 번식주기와 관련된 저장 물질 대사 연구에서 11 월~3 월 사이 외투막에 글리코젠을 저장하고, 배우자형성시기에 단백질, 지질은 증가하고 글리코젠의 감소가 일어난다고 보고 한바 있다. Kang *et al.*, (2003)등의 참굴 (*C. gigas*) 알의 생화학적 분석결과 단백질이 41%, 지방 25.5%, 탄수화물 11.7%라고 보고하였다. 대조구지역 참굴의 경우 3 월 ~ 5 월까지 대체로 높은 탄수화물 함유량을 유지하다가 6 월 산란이후 감소하기 시작하였고, 반대로 단백질이 함유량은 이 시기에는 증가하였으며 지방 역시 단백질과 마찬가지로 증가하는 패턴을 보였고

지방 함유량은 6 월에 최대의 함유량을 나타내었다 (Table 5). 탄수화물이 감소하는 시기에 단백질과 지방이 상승하는 패턴은 산란기가 되면 몸의 80%이상이 생식소가 되는 참굴의 특징에 미루어볼때 알의 체조직 성분중 41% 을 차지하는 단백질과 25.5%를 차지하는 지방의 함유량 때문에 산란기에 접어들면서 단백질 함유량과 지방의 함유량은 증가한것으로 생각되어지며 알 전체의 10%밖에 차지 하지 않는 탄수화물 함유량은 감소한 것으로 생각되어 진다. Encomio *et al.* (2000)은 PCB (polychlorinated biphenyls)와 같은 외부스트레스와 같은 오염물질에 영향을 받은 대서양 굴(*Crassostrea virginica*)은 섭이를 멈추고 몸 속에 있는 탄수화물 에너지원을 사용 하면서 탄수화물 함유량은 줄어들고 이러한 영향은 성장과 번식에 영향을 준다고 보고하였다. 유류유출에 의한 영향으로 봄철 먹이 섭이가 활발하지 못한 유류유출 지역 참굴은 대조구 지역 참굴에 비해 낮은 탄수화물 함유량을 나타내었지만 산란 이후 유류유출지역 참굴이 대조구지역 참굴보다 높은 탄수화물 함유량을 보인 것은 시간이 지나면서 유류유출의 영향으로 저하 되었었던 참굴의 먹이섭이능력이 점차 회복되면서 섭이된 먹이가 글리코젠 성분으로 저장물질인 소화맹낭에 축적되어 유류유출 이후 조금씩 회복 되어가는 경향을 보인것으로 생각되어진다.

이번 연구에서는 anti-OESP rabbit IgG 를 이용하여 난 단백질을 정량화하여 측정하는 면역학적 방법을 이용하여 이때패류의 산란시기를 파악하는 방법으로 (Kang *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003; Park and Choi, 2004; Park *et al.*, 2006)알려져 있다. 이 연구에서의 생식소 중량지수의 변화는 조직학적 관찰을 통한 산란시기와 일치하는 결과를 나타내었고, 유류유출지역 참굴에서는 연중 2 회의 산란시기를 확인할 수 있었는데 GSI 에서도 같은 시기에 2 회 GSI 값의 변화를 확인하였고, 대조구지역 참굴은 7 월에 산란이 끝난 것에 비해 유류유출지역 참굴은

늦은 9 월에 산란을 마친 결과에서도 같은 결과를 나타내었다 (Fig. 12 and Table 4). 면역학적 기법을 통한 산란량을 측정 한 연구로는 Kang, (2000) 의 경상남도 고성의 참굴을 이용하여 4 월~8 월 동안 *C. gigas* 의 평균 GSI 는 0.216 이었다고 보고하였으며, 생식세포의 조직학적 관찰과 일치하는 결과를 얻었다고 보고하였으며, Ngo *et al.* (2006)은 남해 고성만 지역 참굴 양식장에 서식하는 Pacific oyster, *C. gigas* 의 깊이에 따른 비교연구에서 수하연 위쪽의 참굴에서는 산란기인 6 월에 41.1%의 GSI 를 나타내었다고 보고하였다.

결론적으로 유류유출로 인한 스트레스로 참굴의 먹이 섭취는 감소하였고 그로 인한 결과로 낮은 탄수화물 함유량과 높은 소화맹낭 위축도를 확인하였고, 6 월 ~ 7 월 일반적인 참굴의 산란시기와 다르게 8 월부터 늦은 9 월까지 산란을 하였을 것이라 판단되며, 또한 생식세포의 성장과 성숙에 관련하여 탄수화물, 지방, 단백질의 함유량이 영향을 주는 것으로 생각되어진다. 유류유출지역 참굴은 유류유출이 일어난 때로부터 약 6 개월 정도는 낮은 CI 와 낮은 탄수화물 함유량, 낮은 단백질 함유량, 낮은 지방함유량을 보였지만 산란이 끝난 후에는 후반기에 들어서서는 전반기보다 2 배 이상의 탄수화물 함유량을 보이면서 조금씩 회복되어가고 있다고 판단되며 이번 한번만의 연구로 끝나는 것이 아니라 이렇게 불안정한 상태에서 만들어진 참굴 알들이 산란이 되었기 때문에 산란된 참굴의 체내 생화학적인 변화, 체내 육질량의 변화, 산란량의 변화, 같은 장기적인 번식생리학적인 모니터링 연구가 지속되어야 할 것이다.

V. 요약

2007 년 12 월 7 일 충남 태안에서 발생한 Hebei spirt 유류사고로 인해 유류에 노출된 충남 태안군 신두리 지역에서 양식중인 참굴 (*C. gigas*)과 비교지역으로 인천시 중현동에 서식하는 참굴을 매월 1 회 40 개체를 채집하였고 3 월부터 7 월까지는 2 회씩 채집을 실시하였다. 채집된 샘플은 조직학적 방법을 이용하여 소화맹낭 위축도 변화와 생식주기의 변화를 조사하였고, 생화학적 분석방법을 이용하여 체조직 내의 탄수화물, 단백질, 지방의 함유량을 조사하였으며 효소면역 반응 측정 (ELISA)을 이용하여 두지역간의 번식량의 차이를 조사하였다

1. Condition Index (CI)의 변화

지역참굴은 6 월 (16.4 ± 2.3) 이었던 반면에 유류유출지역 참굴은 9 월 (12.4 ± 3.2)에 가장 높은 CI 를 나타내었고 이후 급격히 감소하였다. 7 월부터 12 월까지는 대조구지역 참굴 보다 평균 2.6% 유류유출지역 참굴의 CI 가 높게 나타났다.

2. 조직학적 관찰 비교

유류유출지역 참굴의 주된 산란은 늦은 7 월~이른 8 월에 한번, 늦은 9 월에 한번 총 2 회 산란이 이루어졌으며 대조구지역 참굴은 6~7 월 1 회 산란 하였다. 유류유출지역 참굴에서 대조구지역 참굴보다 더디게 생식소가 발달하였으며, 산란이후 초기난모세포의 출현빈도가 대조구지역 참굴은 25.6%인 반면에 유류유출지역 참굴에서는 45.8%로 산란이후 초기난모세포 출현빈도가 대조구지역 참굴에 비해 높게 나타났다. 해양 이매패류의 기아정도를 판단할 수 있는 척도인 소화맹낭 위축도 지수 결과 1 월부터 5 월까지 대조구지역 참굴의 위축도지수

3,4 단계는 24.5% 나타난 반면에 유류유출지역 참굴은 46.8%였다. 산란기를 기준으로 산란전에는 위축도지수가 낮았지만 산란후에는 위축도 지수가 높아졌다. 조직학적 관찰결과 두지역 모두 조직학 관찰결과 완숙기 시기에 가장 높은 CI 를 보였으나 대조구지역 참굴은 6 월에 가장 높은 CI 를 나타냈으며 유류유출지역 참굴은 9 월에 가장 높은 CI 값을 확인 할 수 있었다.

3. 체조직 성분 분석

1 월부터 5 월까지 유류유출지역 참굴은 평균 14.1%의 탄수화물 함유량을 보인반면에 대조구지역 참굴은 29.2%의 함유량을 보였다. 탄수화물 함유량은 산란기에 접어들면서 감소하였고 이와 반대되는 양상으로 총단백질의 양은 증가하였고 총지질 함유량 역시 산란기에 접어들면서 증가하는 양상을 나타내었다. 총 단백질 함유량은 계절적 변화를 발견하지 못하였고 총 탄수화물과 총지질 함유량은 산란기 이후로 대조구지역 참굴에 비해 총 탄수화물 함유량은 평균 11.4%의 차이를 보였고 총지질은 변화를 나타나지 않았다.

4. 효소면역 반응 측정 (ELISA)

효소면역 반응 측정을 통한 생식소 중량지수의 변화는 조직학적 관찰을 통해 확인했었던 결과와 일치하였다. 생식소 발달이 진행되어짐에 따라 GSI 도 증가하였고 산란기 이후에는 감소하는 GSI 의 값을 확인할 수 있었다. 대조구지역 참굴의 산란은 7 월에 끝난 반면에 유류유출지역 참굴은 7 월부터 더디게 산란이 진행되었고 늦은 9 월이 되서야 산란을 끝마쳤음을 확인 할 수 있었다.

VI. 참고문헌

- Bayne, B. L., 1985. Ecological consequences of stress. In the effects of stress and pollution on marine animals, pp. 141-157. Praeger Publishers, New York. 384 pp.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology* 125 (3), 359-369.
- Bligh, Y. J. and Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 37 (8), 911-917.
- Boscolo, R., Cacciatore, F., Berto, D., Marin M. G., Giani, M., 2004. Contamination of natural and cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the northern Adriatic Sea by tributyltin and dibutyltin compounds. *Applied Organometallic Chemistry* 18, 614-618.
- Choi, Y. R. and Cho, Y. S., 1999. Studies on the culture of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), by rack method in the west coast of Korea. *Bulletin of the Korean Society of Fisheries Technology* 56, 91-99.
- Choi, K. S., 2008. Oyster capture-based aquaculture in the Republic of Korea. In A. Lovatelli and P. F. Holthus (eds). *Oyster capture-based aquaculture. Global overview*. FAO Fisheries Technical paper 508, 271-286.
- Dame, R. F., 1996. Bivalves as components of ecosystem health. In *The Ecology of Marine Bivalves. An Ecosystem Approach*, 213-226. Ed. by R. F. Dame. CRC Marine Science Series, CRC Press, Boca Raton, 254 pp.
- Duquesne, S., Liess, M., Bird, D.J., 2004. Sub-lethal effects of metal exposure: physiological and behavioral responses of the estuarine bivalve (*Macoma balthica*). *Marine Environmental Research* 58, 245-250.
- Disalvo, L. H., Harold, E. G., Hunter, L., 1975. Tissue hydrocarbon burden of mussels as a potential monitor of environmental hydrocarbon insult. *Environmental Science & Technology* 9, 247-251.
- Encomio, V. Chu, E. F., 2000. The effect of PCBs on glycogen reserves in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 50, 45-49
- Ellis, M.S., Barber, R.D., Hillman, R.E., Kim, Y., Powell, E. N. 1998. Histopathology analysis (In) *Sampling and analytical methods of the National Status and Trends Program*

- Mussel Watch Project: 1993-1996 Update. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 130, 198-215
- Fingas, M. F., 2001. Basics of oil spill cleanup (2nd ed.), Lewis Publishers, Washington , 233pp.
- Guolan, H. and Yong, W., 1995. Effects of tributyltin chloride on marine bivalve mussels. *Water Research* 29 (8), 1877-1884.
- Hyun, K. H., Pang, I. C., Klinck, J. M., Choi, K. S., Lee, J. B., Powell, E. N., Hofmann, E. E., Bochenek, E. A., 2001. The effect of food composition on Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) growth in Korea: a modeling study. *Aquaculture* 199, 41-62.
- Hummel, H., Amiard-Triquet, C., Bachelet, G., Desprez, M., Marchand, J., Amiard, J.C., Rybarczyk, H., Bogaards, R. H., Sinke, J., Wit, D. Y., Wolf, D.S., 1996. Sensitivity to stress of the estuarine bivalve *Macoma balthica* from areas between the Netherlands and its southern limits (Gironde). *Journal of Sea Research* 35 (4), 315-321.
- Jokuty, P., Whitar, S., Wang, Z., Fingas, M., Fieldhous, B., Lambert, P., and Mullen, J. 1999. Properties of crude oils and oil products. Environmental Protection Service, Environment Canada, Manuscript report EE-165, 975-981.
- Jeong, W.G. and Choi, M., 2007. Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacificoyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 265, 343-350 .
- Kang, D. H., Ngo, T. T. T., Koh, K. J., Choi, K. S., 2004. Seasonal changes in gonadal development of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* from Shi-Heung-Ri, Jeju, Korea. *Journal of the Korean Aquaculture Society* 17, 81-88.
- Kang, S. G., Choi, K. S., Bulgakov, A. A., Kim, Y., Kim, S. Y., 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 282, 1-21.
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K. A., Powell E. N., 2006. Histological techniques for marine bivalve molluscs: Update. Silver spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 27-76.
- Lee, C. I., Lee, M. C., Kim, H. C., 2009. Temporal variation of chlorophyll a concentration in the coastal waters affected by the Hebei Spirit oil spill in the west sea of Korea, *Marine Pollution Bulletin* 58, 496-502.

- Lee, C. I., Kim, M. C., 2008. Oceanographic and atmospheric conditions on the *Hebei* oil spill in the West sea of Korea. Korean Association of Ocean Science and Technology Societies, 239.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry* 193, 265-275.
- Mearns, A. J., Debra, S.B., 2003. Longer-term Weathering–Research Needs in Perspective. *Spill Science & Technology Bulletin* 8, 223-227 .
- Moran, R., Porath, D., 1980. Chlorophyll determination in intact tissues using N, N-dimethylformamide. *Plant Physiology* 65, 478-479.
- Ngo, T. T. T., Kang, S. G., Kang, D. H., Sorgeloos, P., Choi, K. S., 2005. Effect of culture depth on the proximate composition and reproduction of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* from Gosung Bay, Korea. *Aquaculture* 253, 712-720.
- Ordas, M. C., Albaiges, J., Bayona, J.M., Ordas, A. Figueras, A., 2007. Assessment of in vivo effects of the prestige fuel oil spill on the mediterranean mussel immune system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 200-206.
- Park, K. I., Choi, J.W., Choi, K.S., 2003. Quantification of Reproductive Out put of the Butter Clam, *Saxidomus purpuratus* (Sowerby, 1852) Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Ocean and Polar Research* 25 (3).
- Park, K. I., Antonio, F., Choi, K. S., 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) I. Quantifying eggs. *Aquaculture* 241, 667-687.
- Park, K. I., Figueras, A., Choi, K. S., 2006. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. *Aquaculture* 251, 182-191.
- Peteiro, L. G., Babarro, M. F., Labarta, U., Maria, J. F., 2006. Growth of *Mytilus galloprovincialis* after the *Prestige* oil spill. *Journal of Marine Science* 63, 1005-1013
- Rainer, J.S. and Mann, R., 1992. A comparison of methods for calculating condition index in eastern Oysters, *Crssostrea virginica* (GMELIN, 1791). *Journal of Shellfish Research* 11 (1), 233-237.
- Siddiqui, G., Ahmed, M., 2002. Gametogenic patterns of the larviparous oyster *Ostrea nomades* from Karachi, Pakistan (northern Arabian Sea). *Aquaculture* 33, 1049–1058.

- Tom G., 2002. Joint group of experts on the scientific aspects of the marine environment. In: The state of marine environment. UNEP regional seas reports and studies No. 115
- Urrutia, M. B., Ibarrola, I., Iglesias J. I. P., Navarro, E., 1999. Energetic of growth and reproduction in a high-tidal opulation of the clam *Ruditapes decussates* from Urdaibai Estuary (Basque Country, N. Spain). *Journal of Sea Research* 35-48.
- Usheva, L. N., Vaschenko, M. A., Durkina, V. B., 2006. Histopathology of the digestive gland of the bivalve mollusk *crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from southwestern peter the grea bay, sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology* 32 (3), 166-172.
- Winstead, J. T., 1995. Digestive tubule atrophy in eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), exposed to salinity and starvation stress. *Journal of Shellfish Research* 14 (1), 105-111.
- Weinstein, J. E., 1997. Flouranthene-induced histological alterations in oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal field and laboratory studies. *Marin Environmental Research* 43 (3), 201-218.
- Waddell, J. 2008. Rapid environmental assessment 'Hebei spirit' oil spill-Republic of Korea December 2007. The joint UNEP/OCHA environment unit. [www document]. URL <http://ochaonline.un.org/ochaunep>
- Yang, H. S., 2006. Reproductive cycle and proximate tissue composition of the cockle, *Fulvia mutica* from Anmyeon Island on the West coast of Korea. Master. Thesis, University of Jeju, Korea.
- Won, M. S. and Hur, S. B., 1993. Fatness index and spat occurrence of the short-necked clam, *Ruditapes philippinarum*. *Journal of aquaculture* 6 (3), 133-146 (in Korea with English abstract)

감사의 글

2년이라는 시간이 너무나도 빠르게 지나간 대학원 과정이었던 것 같습니다. 제가 이렇게 이 논문을 쓸 수 있었던 것은 저 혼자만이 아닌 많은 분들의 도움과 격려가 있었기에 가능한 것이었습니다. 이 논문을 통해서 그분들께 감사의 인사를 드리려고 합니다.

먼저, 석사과정 2년간 연구자로서의 열정과 탐구하는 자세, 스스로에게 질문을 던져 답을 찾아가는 방법, 연구자로서의 마음가짐에 대해 마음속 깊이 깨닫게 해주신 최광식 교수님께 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 논문을 쓰는 과정에서 세심한 지적과 충고를 해주신 여인규 교수님께 감사를 드리며, 실험실 선배님이며 해양 연구자로서의 본 모습을 보여주고 계신 한국해양연구원 강도형 박사님의 섬세한 지적과 따끔한 충고 정말 감사 드립니다.

함께 동고동락하며 희로애락을 함께 나눈 실험실 식구들이 있었기에 이 논문이 완성될 수 있었습니다. 항상 말보다는 몸소 실천으로 행동하는 모습을 석사과정 동안 보여주신 양현성 선배님, 친 누나처럼 따뜻한 말과 격려를 해주었던 Yanin Limphanont, 실험실의 실장으로 최선을 다하는 모습이 아름다운 김봉규 선배님, 자신이 힘들었던 지난 과정을 떠올리며 힘들어하고 있는 저에게 먼저 따뜻한 손을 내밀어 주신 강현실 박사님에게 깊은 감사를 드립니다. 또한, 석사학위를 함께한 따뜻한 마음을 지닌 이지연 누나, 말은 없지만 따뜻한 성품을 지닌 홍현기 형, 그리고 싸우기도 가장 많이 싸우고 함께 술 안마시고도 진지한 대화를 할 수 있는 친구 정희도와 우리 실험실 막내 김영민과 박아름이, 지금은 다른 곳에서 저를 응원해 주신 임나래 누나, 최규성, Dr. Ludovic Donaghy, Dr. Md.

Jasim Uddin, 김대경 박사님 정말 감사 드립니다. 대학 학부과정 동안 따뜻한 애정과 조언, 충고를 해주었던 제주대학교 해양과 환경연구소 발생학실험실의 송영보 선배님, 임봉수 선배님, 이치훈 선배님, 김성훈 선배님, 허상우 선배님, 허성표 선배님, 류용운 선배님, 강형철 선배님에게도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 그리고 제가 실험을 하는데 있어 저 대신 추운 바다 바람을 맞으며 인천과 태안을 오가며 현장채집을 해주신 서해수산연구소 전제천 박사님, 백상호 박사님에게 고마움을 전합니다.

고등학교 1학년 때부터 집에서 떨어져 부산에서의 고등학교 시절, 제주에서의 대학생활, 대학원 생활까지 11년이라는 세월 동안 저를 믿고 기도해주신 아버지 어머니께 항상 감사 드리고 부족한 큰형을 대신해서 집에서 장남의 역할을 감당해주고 있는 재중이, 사랑하는 동물들과 함께하는 일이 언제나 행복한 프린세스 수진이, 우리 집 막내 창신이까지 너희들이 있었기에 감당할 수 있었고 해낼 수 있었어. 사랑하고 축복한다.

Hebei sprit 유류 유출 사고로 힘들어하고 계신 태안군 주민 분들과 그 외 피해를 입으신 분들에게 작지만 이 연구로 하여금 그분들에게 조금이나마 힘이 되었으면 좋겠습니다. 꼭! 힘내십시오.

마지막으로, 이 연구를 통해 가치 있는 일을 할 수 있도록 인도해 주신 하나님께 감사합니다.