



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

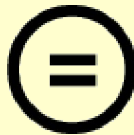
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



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](#)

이 학 박 사 학 위 논 문

넙치 *Paralichthys olivaceus* 의
초기생활사에 미치는 해수 이산화탄소
농도와 수온의 영향

2016 년 8 월

부 경 대 학 교 대 학 원

해양생물학과

김 경 수

이 학 박 사 학 위 논 문

넙치 *Paralichthys olivaceus* 의
초기생활사에 미치는 해수 이산화탄소
농도와 수온의 영향

지도교수 김 수 암

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함.

2016 년 8 월

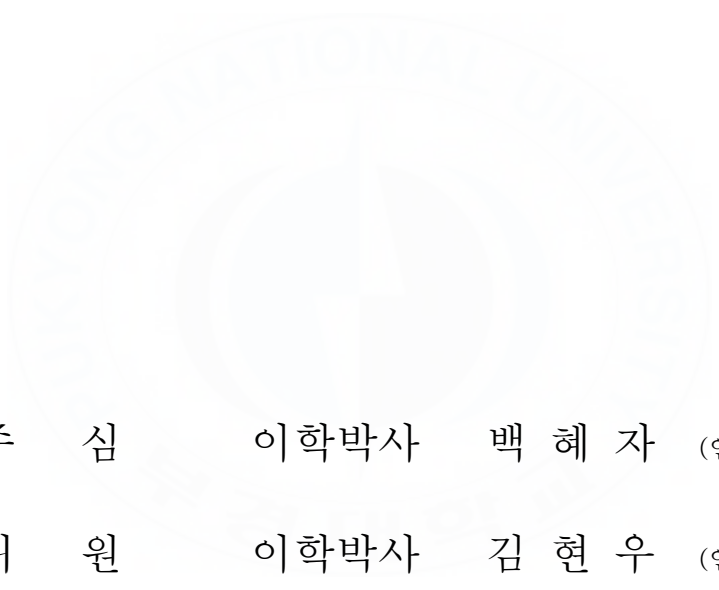
부 경 대 학 교 대 학 원

해양생물학과

김 경 수

김경수의 이학박사 학위논문을 인준함

2016 년 8 월 26 일



주	심	이학박사	백 혜 자	(인)
위	원	이학박사	김 현 우	(인)
위	원	수산학박사	오 승 용	(인)
위	원	이학박사	심 정 희	(인)
위	원	이학박사	김 수 암	(인)

목 차

List of Figures	iv
List of Tables.....	vii
List of Appendix.....	ix
Abstract	x

I. 서론 : 이론적 배경 1

1. 대기 이산화탄소 농도 증가가 해양생태계에 미치는 영향	1
2. 해양산성화가 어류에 미치는 영향.....	7
1) 산-염기 평형	7
가. 세포 pH 조절	8
나. 이온 조절	13
2) 석회화.....	21
가. 이석의 크기와 밀도증가.....	21
나. 소장의 $CaCO_3$ 형성	25
3) 생물학적 파라미터	29
가. 성장과 발달	30
나. 생존.....	36

II. 해수 이산화탄소 농도와 수온의 변화에 따른 넙치 유생의 생물학적

반응 연구	38
1. 서론	38
2. 재료 및 방법	41
1) 실험 대상종	41
2) 넙치 사육실험장치	43
가. 실험장치 개발	43
나. 실험장치 검증	49
3) 생물학적 파라미터	54
가. 부화율과 생존율	54
나. 성장지표	56
4) 조직 및 골격분석	58
가. 조직	58
나. 골격	59
다. 이석성장	62
3. 결과	64
1) 넙치 사육실험장치	64
2) 생물학적 파라미터	69
가. 부화율과 생존율	69
나. 성장지표	71
3) 조직 및 골격분석	89

가. 조직	89
나. 골격	93
다. 이석성장	99
4. 고찰	101
1) 사육장치	101
2) 생물학적 파라미터	103
3) 조직 및 골격분석	112
가. 조직	112
나. 골격	116
다. 이석성장	118
4) 기타	121
Ⅲ. 종합고찰	124
Ⅳ. 요 약	128
Ⅴ. 참고문헌	130
부록	148

List of Figures

Fig. 1. Schematic diagram of the experimental system for this study.	45
Fig. 2. Experimental system designed for the effects of acidification and warming on fish larvae. Part names indicated by number are show in appendix 1.	46
Fig. 3. pH_{NBS} observation at different CO ₂ levels in pilot experiment for 2 weeks. pCO_2 concentrations with standard deviation maintained for control(400 ppm), medium(850 ppm) and high(1550 ppm) conditions were 479.7 ± 51 , 838.0 ± 127 and 1422.7 ± 240 μ atm, respectively.	67
Fig. 4. Concentration of total nitrogen (TN) at different CO ₂ levels in pilot experiment for 2 weeks. pCO_2 concentrations with standard deviation maintained for control(400 ppm), medium(850 ppm) and high(1550 ppm) CO ₂ conditions were 479.7 ± 51 , 838.0 ± 127 and 1422.7 ± 240 μ atm, respectively. ...	68
Fig. 5. Hatching rate (A) and survival rate (B) of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> at different CO ₂ levels during experiment. Experiment were repeated 3 times at each concentration of CO ₂ . (n=9)	70
Fig. 6. Total length of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> larvae reared at different CO ₂ concentration and temperature levels. (A) first, (B) second and (C) third experiment. Significant differences between groups are indicated with different letters. Numbers on the each bar indicate sample size.	74

Fig. 7. Wet weight of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae reared at different CO₂ concentration and temperature levels. (A) first, (B) second and (C) third experiment. Significant differences between groups are indicated with different letters. Numbers on the each bar indicate sample size.75

Fig. 8. Growth of larval olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae reared at different CO₂ concentration and temperature levels. Experiment were repeated 3 times at each concentration of CO₂. Combination of rearing condition on CO₂ concentration and water temperature at each experiment. Asterisks indicate significant differences among control and treatment groups. (A) first experiment, 18°C, (B) first experiment, 22°C, (C) second experiment, 18°C, (D) second experiment, 22°C, (E) third experiment, 18°C and (F) third experiment, 22°C.83

Fig. 9. Condition factor (K) on olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae reared at different CO₂ concentration and temperature levels. (A) first, (B) second and (C) third experiment.88

Fig. 10-1. Histological observation of liver and kidney from olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae (x400). (A)~(C): kidney; (D)~(F): liver; (A) and (D) are from control (400 ppm), (B) ,(C) ,(E) and (F) are from high CO₂ concentration (1550 ppm). Tissues in photo: renal tubuls (RT), glomerulus (G), Bowman's space (BC), hyaline dropet degeneration (HDD), vacuole (V), hepatocytes (H), glycogen vacuole (GV), Blood congestion (BC) and hepatocytes hypertrophy (HH).91

Fig. 10-2. Histological observation of gill and eyes from olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae (x400). (A)~(B): gill; (C)~(D): eyes; (A) and (C) are from control (400 ppm), (B) and (D) are from high CO₂ concentration (1550 ppm). Tissues in photo: chondrocyte (C), chloride cell (Ch), Primary filament

(PF), secondary lamellae (SL), pigment epithelium (PE), photoreceptor layer (cones and rods) (PL) and gap between pigment epithelium and basement membrane (G).92

Fig. 11. SEM photographs for skeleton of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. (A) Control (400 ppm), (B) Medium (850 ppm) and (C) High (1550 ppm) concentration CO₂.94

Fig. 12-1. Photographs for skeleton of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae using double staining method. Larvae reared at 18°C in different CO₂ concentrations. (A) Control (400 ppm), (B) Medium (850 ppm) and (C) High (1550 ppm) concentration CO₂.96

Fig. 12-2. Photographs for skeleton of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae using double staining method. Larvae reared at 22°C in different CO₂ concentrations. (D) Control (400 ppm), (E) Medium (850 ppm) and (F) High (1550 ppm) concentration CO₂.97

Fig. 13. Otolith size of olive flounder larvae reared at different environment conditions. (A) Otolith size (mm) and (B) ratio value for otolith/length. Significant differences between groups are indicated with different letters. 100

List of Tables

Table 1. Ocean acidification effects on fishes relevant to acid-base regulation..	9
Table 2. Ocean acidification effects on fishes relevant to early life stage calcification	22
Table 3. Ocean acidification effects on fishes relevant to growth, development and survival of early life stage of fishes.....	32
Table 4. Information on rearing conditions for olive flounder larvae, June-September, 2013	53
Table 5. Chemical properties for three experimental conditions used in pilot experiment for 2 weeks. Calculated $p\text{CO}_2$ was computed by CO2SYS software (Pierrot and Wallace, 2006) using measurements of pH_{NBS} total alkalinity, and salinity in reservoir and aquaria.....	66
Table 6. The results of two-way ANOVA of total length of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> larvae reared at different CO_2 concentration and temperature. (A) first, (B) second and (C) third experiment	76
Table 7. The results of two-way ANOVA of wet weight of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> larvae reared at different CO_2 concentration and temperature. (A) first, (B) second and (C) third experiment	77
Table 8. The results of two-way ANOVA of skeleton malformation of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> larvae reared at different CO_2 concentration	

and temperature	98
-----------------------	----



List of Appendix

Appendix 1. Names of the equipment used in the experimental system..... 148

Appendix 2. Concentration of chemical elements of olive flounder larvae.

Values indicate mean $\pm$ SD. (unit: mg/kg) (n=4)..... 149



**The combined effects of elevated CO₂ and temperature in seawater
on early life stage of olive flounder *Paralichthys olivaceus***

Kyung Su Kim

*Department of Marine Biology, The Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Since the industrial revolution, CO₂ in atmosphere has been increased rapidly from 280 ppm to 400 ppm. Greenhouse effect caused by enhanced atmospheric CO₂ has resulted in global warming, and about one third of CO₂ in atmosphere dissolved into the ocean, which causes ocean acidification. Due to the high rate of CO₂ increase, therefore, marine ecosystem in world ocean have seriously been influenced by global warming and ocean acidification. Oceanic pH already decreased 0.1 unit compared to the pre-industrial times and these impacts were observed around the ocean. In this study, we investigated the effects of ocean

acidification and global warming on the early life stage of marine fishes, olive flounder *Paralichthys oliveceus*. To figure out biological response to environmental changes, olive flounder were reared from fertilized egg to metamorphosis stage for four weeks in the various carbon dioxide concentration (479, 838, 1422 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$) and water temperature (18 and 22°C). The result of this study indicated that total length and wet weight (i. e., growth) had a tendency of increase with enhanced CO₂ concentration at 18°C ($p < 0.05$). However, at 22°C, this tendency reversed. Condition factor (K) was not changed significantly by the various level of CO₂ concentration and water temperature. Otolith size was increased with enhanced CO₂ concentration. At the present CO₂ concentration, total length, wet weight and growth rate display a tendency of increase with temperature increase. At the enhanced CO₂ concentration, however, this tendency was weak or reverse. Furthermore, the incidence of skeleton malformation was increased with enhanced CO₂ concentration. Also, frequency of malformation was high at both temperature conditions (18 and 22°C). It means that the synergistic impact of high temperature and low pH seems to be negative for olive flounder larvae.

I. 서론 : 이론적 배경

1. 대기 이산화탄소 농도 증가가 해양생태계에 미치는 영향

산업혁명 이후, 화석연료 사용의 증가에 따라서 지구환경의 변화가 극심하게 이루어지고 있는데, 이러한 지구환경 변화의 대표적인 사례로서 주목하고 있는 현상이 바로 지구온난화와 해양산성화이다. 이 두 현상은 18세기 이래 꾸준히 증가한 대기 이산화탄소의 증가가 원인으로, 이로 인해 온실효과가 유발되어 지구온난화를 가속화시키고 있으며, 대기 이산화탄소가 해수에 용해되는 양이 증가하면서 산성화되어 해양생태계에 미치는 영향이 증폭되고 있다 (IPCC, 2007; IPCC, 2013). 이 두 가지 현상 중 지구온난화에 대해서는 비교적 오랫동안 연구가 진행되어 왔으며, 그 영향과 해결방안에 대해 많은 학자들의 연구와 대중의 관심이 있었다. 그에 반해 해양산성화 문제는 최근에 들어서야 학계에 알려지기 시작했고, 산성화가 해양생태계에 미치는 영향에 대한 연구의 필요성이 21세기에 들어와서 심각하게 인식되기 시작하였다.

지구온난화에 대한 인식은 1972년 로마클럽 보고서에서 처음 지적된 이래

꾸준히 그 중요성이 다양한 국제기구를 통해 알려져 왔다. 이에 대한 결정적인 증거로는 미국 하와이 Mauna Loa에서 Dr. Keeling이 관측한 대기 이산화탄소 농도 변화를 나타낸 'Keeling curve'가 있다. 이 관측 결과에 따르면, 1950년에 315 ppm이었던 이산화탄소 농도는 2011년 391 ppm을 넘어 60년 만에 24% 이상의 농도 증가를 나타내었다(IPCC, 2013). 이 정도 수준의 이산화탄소 농도는 지구가 최소 지난 80만년간 경험하지 못한 높은 농도로 여겨지고 있다(IPCC, 2013). 또한 이산화탄소뿐만 아니라 메탄, 질소산화물과 같은 온실기체 또한 산업화 이전과 비교했을 때, 각각 150% 와 20% 더 증가한 상태이다. 이러한 급격한 이산화탄소와 기타 온실기체의 증가는 지구 온난화를 유발하며, 이와 같은 기후변화에 따라 해수면 상승과 이로 인한 육지 침식, 극지 빙하의 감소와 연관된 극지 생태계 변화, 평균기온 상승으로 인한 생물분포 변화와 같은 현상이 나타나고 있다(IPCC, 2013). 그리고 이러한 기후변화 현상은 전 세계 곳곳에서 관찰되고 있으며, 그로 인해 심각한 경제적 손해를 입고 있거나, 국토가 침식되어 지도에서 사라질 위기에 처한 국가도 나타났다(IPCC, 2014).

우리나라 역시 이러한 해양환경의 변화로부터 자유롭지 못하는데, 제주 해안 지역의 침식, 해수면 상승으로 인한 연안 저지대의 잦은 침수현상, 평균수온 증가로 인한 해양생물 분포의 변화와 이에 따른 어업구조 변화, 냉수성 어족 생산량 감소와 같은 다양한 영향이 나타나고 있다(전 등, 2005; 이 등, 2011; Ju et al., 2012). 이러한 해양환경의 변화에 대처하기 위해 각 국가별로 다양한 연

구 및 노력을 진행중에 있는데, 국제적으로는 이산화탄소와 같은 온실기체 감축을 위한 협의, 이산화탄소 저감기술 개발, 친환경 에너지 개발, 탄소세 부과 등이 논의되고 있다.

대기 이산화탄소 증가에 기인한 또 하나의 중요한 해양변화로 지목되고 있는 해양산성화는 대기 내에 꾸준히 증가하고 있는 이산화탄소가 지속적으로 대양(ocean)의 해수로 녹아 들어가는 현상이 그 원인으로 알려져 있으며, 일반적으로 인류에 의해 배출된 이산화탄소 총량의 약 30% 가 매년 해양으로 흡수되고 있다고 알려져 있다(IPCC, 2013). 인간의 산업활동에 의하여 대기중으로 배출되는 이산화탄소의 양이 증가함에 따라 매년 해양으로 녹아 들어가는 이산화탄소의 양도 급격하게 증가하고 있는데, 1750년 경에는 연간 2억 톤 가량의 이산화탄소가 대기중으로 배출되어 그 중 30% 정도인 6천만톤 가량이 해양으로 녹아 들어갔지만, 최근 10년간(2002-2011) 평균을 보면 연간 약 83억톤 가량의 이산화탄소가 매년 대기중으로 배출되고 있는 것으로 밝혀져 그 양이 40배 이상 증가하였으며 그에 따라 해양으로 용해되는 이산화탄소의 양도 급격하게 늘고 있다(IPCC, 2013). 그 결과, 해수의 수소이온 농도가 증가하여 액체의 산성도를 지시하는 pH에 변화가 생겼는데, 이미 해양의 pH는 산업혁명 이전과 비교했을 때 약 0.1가량 감소하여 산성화되었고, 이는 H^+ 의 농도가 약 26%가량 증가된 것을 의미한다. 또한 이러한 산성화 추세가 계속된다면 21세기 말에는 지금보다 0.3가량 더 pH의 감소가 나타날 것으로 예상되고 있다(IPCC, 2014).

최근 학계에 보고된 대부분의 해양산성화 관련 연구는 무척추동물의 생존이나 성장에 관한 것이 대부분이었다(Doney et al., 2009; Wittmann et al., 2013). 특히 외골격이 탄산칼슘(CaCO_3)으로 구성된 동물플랑크톤이나 산호, 패류의 경우, 산성화된 해수는 패각에 직접 작용하여 패각을 용해시키거나 그 형성을 지연시켜 이들의 생존에 큰 영향을 미칠 수 있음을 보고하고 있는데(Delille et al., 2005; Talmage and Gobler, 2010), 최근까지의 연구 결과에 따르면 각 생물군, 종에 따라서 산성화에 대한 반응이 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있다(Rise, 2011). 생물종에 따라 이산화탄소 농도의 증가가 성장에 1) 긍정적인 영향을 미치거나(positive), 2) 어느 한계까지는 아무런 영향을 받지 않다가 일정수준 이상의 이산화탄소 농도에서 긍정적인 영향을 미치거나(threshold-positive), 3) 전혀 영향을 주지 않거나(neutral), 4) 일정수준까지는 긍정적인 영향을 받다가 한계를 넘어가면 부정적인 영향을 미치거나(parabolic), 5) 아무런 영향을 받지 않다가 일정수준 이상에서 부정적인 영향을 미치거나(threshold-negative), 6) 부정적인 영향을 미치는(negative) 총 6가지의 특징적인 경향으로 분류할 수 있는데, 이는 해양산성화에 대한 각 생물종의 적응능력이 모두 다르게 나타나는 것을 의미한다. 또한, 해양산성화가 어느 정도 진행되고 나면 최종적으로 생태계 구조 및 구성요소에서 큰 변화가 나타나게 될 것을 암시한다(Rise, 2011).

전복을 대상으로 진행된 실험에서는 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*) 유생의 패각 표면이 용해되는 현상이 나타났

으며 성장 또한 저해되는 것으로 나타났다(Kimura et al., 2011). 또한, 산호의 일종인 *Montipora capitata*를 대상으로 한 실험에서도 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 석회화율이 감소되고 성장이 저해되는 현상이 나타났다(Jokiel et al., 2008). 이와는 반대로, 해양생태계에서 생산자 역할을 담당하는 식물플랑크톤 및 해조류의 경우, 일정수준의 이산화탄소 농도 증가는 이들의 성장을 촉진하기도 하였다. 하지만, 이산화탄소 농도 증가와 함께 영양염류의 양도 함께 증가하지 않으면 성장이 정지되는 현상을 나타냈고(Hama et al., 2015), 영양염 중에서도 철과 같은 특정 성분에 대해서는 이산화탄소 농도 증가로 인한 pH의 감소가 식물플랑크톤이 철을 흡수하는 것을 저해시켜 오히려 성장이 감소한다는 연구결과도 발표되었다(Shi et al., 2010). 또한, 연체동물 중 두족류에 속하는 홈볼트 오징어 (*Dosidicus gigas*)의 경우 어류에 비해 높은 산소 소비율을 나타내는데, 1000 $\mu\text{atm CO}_2$ 및 용존산소량 감소 환경에 24시간 노출되었을 때 이들의 대사활동량이 평균 31% 감소하는 것으로 나타났으며, 이러한 현상은 저수온일 때 보다 고수온 환경일 때 더 강하게 나타났다(Rosa and Seibel, 2010). 또한, 갑오징어 (*Sepia officinalis*)를 대상으로 한 산성화 실험에서는 산성화 환경(6000 $\mu\text{atm CO}_2$)에 40일간 노출시킨 갑오징어의 경우 대조구에 비해 약간의 성장 저해가 관찰되었으나, 유의한 차이는 나타나지 않았다(Gutowska et al., 2008). 하지만 이들의 cuttlebone을 SEM으로 촬영한 결과 cuttlebone형성이 촉진되는 현상이 나타났다(Gutowska et al., 2010).

이러한 개별 생물종에 대한 연구 이외에도 최근에 많이 이루어지고 있는

연구는 mesocosm을 이용한 생태계 군집에서 해양산성화에 대한 반응이 어떻게 나타나는지 확인하는 방법이다. 기존에 단일종을 대상으로 진행된 연구를 통해 밝혀진 생물의 반응양상이 mesocosm 연구에서는 종간 상호 작용에 의해 그 반응 양상이 반대로 나타나거나, 기존의 결과와 다르게 나타나는 경우가 많이 관찰된다(Park et al., 2014; Kim et al., 2008). 예를 들어, 동물플랑크톤의 경우 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 섭식율이 감소하여 mesocosm내 식물플랑크톤의 생물량이 증가하거나, 식물플랑크톤 군집 내에서도 규조류는 성장이 촉진되고 쌍편모조류는 성장이 저해되는 정반대의 양상이 나타나는 경우도 있다(Park et al., 2014). 이 외에도 생산자와 1차 소비자보다 더 상위 영양단계의 생물(2차 소비자)을 함께 mesocosm에서 사육하면서 기후변화의 영향을 알아보는 실험은 아직까지 보고되고 있지 않지만, 기후변화가 복잡한 해양생태계에 어떠한 영향을 미치는지 좀 더 정확하게 파악하기 위해서는 향후 mesocosm을 이용한 생태계 단위에서의 기후변화 연구가 필요하다. 이러한 연구를 통하여 단일종에서 나타나는 기후변화의 영향뿐만 아니라 기후변화로 인해 발생하는 영양단계(생산자와 소비자)간의 관계가 어떤방향으로 변화하는지 파악할 수 있을 것이다.

2. 해양산성화가 어류에 미치는 영향

아직 해양산성화 현상이 해양생태계의 생물들에게 구체적으로 어떠한 영향을 미치고 있는지 잘 알려져 있지 않다. 지난 10년간 해양무척추동물을 대상으로 하여 활발한 연구가 진행되었고 그 결과가 보고되었지만, 어류에 대해서는 아직 심도깊은 실험이 많이 수행되지 못했다. 본 장에서는 해양산성화 현상이 해양 어류에 미치고 있는 영향을 최근까지 학계에 보고된 내용을 중심으로 요약하였다.

1) 산-염기 평형(Acid-base balance)

어류를 비롯한 대부분의 수생 동물은 외부 환경의 이산화탄소 증가에 대하여 체내의 이산화탄소 배출을 조절함으로써 체내와 서식 환경 간의 P_{CO_2} 경사도(P_{CO_2} gradient)가 새로운 균형 상태에 도달하도록 한다(Janssen et al., 1975). 하지만, 외부 환경의 이산화탄소 농도의 증가는 어떠한 경우든지 체내 P_{CO_2} 수준을 증가시킬 것이며, 특별한 보상작용이 일어나지 않는 한 내부 유체 저장소(즉, 체내)의 산성화는 필연적으로 발생하게 될 것이다. 이러한 불균형 상태를 균형 상태로 회복시키기 위한 어류의 적응기작이 바로 산-염기 평형 기작이며, 미래의 산성화 환경에서 어류가 살아남기 위해서 필수적인 체내 기작이

라고 할 수 있다. 현재까지 알려진 바로는, 산성화 영향에 대한 각 어종의 산-염기 반응기작은 모든 어류에서 일관성을 보이는 것이 아니라, 종별로 다르게 나타나는 경향을 보이고 있다(Table 1).

가. 세포 pH 조절(cellular pH regulation)

경골어류는 온도 변화와는 무관하게, 세포외 환경(extracellular fluid)의 pH를 약 알칼리성(pH7.7~8.1)으로 유지하고 있다(Marshall et al., 2006). 이들은 아가미 표면을 통과하는 단방향의 수류와 이와는 반대방향으로 흐르는 아가미 내의 혈류에 의해 이산화탄소를 순조롭게 물 속으로 배출하기 때문에, 공기호흡을 하는 척추동물에 비해 낮은 체액 P_{CO_2} 를 유지할 수 있다(예: 어류의 동맥 P_{CO_2} 는 2,600 $\mu\text{atm } CO_2$, 인간의 동맥 P_{CO_2} 는 53,000 $\mu\text{atm } CO_2$) (Claiborne et al., 1998; Evans et al., 2005; Heisler, 1988; Perry et al., 2006). 그러나, 이와 같이 수중호흡을 하는 생물의 경우 공기호흡을 하는 동물에 비해 상대적으로 낮은 범위에서 P_{CO_2} 교환이 이루어지기 때문에 수중생물의 산-염기 평형을 조절하기 위한 호흡기관의 적응은, 공기호흡을 하는 생물에 비해 상대적으로 비효율적이라고 여겨지고 있다(Evans et al., 2005; Perry et al., 2006). 하지만, 어류는 산-염기 평형에 교란이 발생하였을 때, 혈장 내의 HCO_3^- 의 농도 조절을 위해 H^+ 와 HCO_3^- 분비율을 변화시키는 대사적 적응을 함으로써 체내 산-염기 평형을 유지한다(Cameron et al., 1978; Evans et al., 2005; Marshall et al., 2006;

Table. 1. Ocean acidification effects on fishes relevant to acid-base regulation

Species	Experimental condition	Exposure duration	Process impacted	References
Demersal marbled rockcod (<i>Notothenia rossii</i>)	0, 7°C/356, 2179 μ atm pCO ₂	Adult fish (29~36 days)	increased white muscle intracellular HCO_3^- , extracellular HCO_3^- concentrations	Strobel et al., 2012
Eelpout (<i>Zoarces viviparus</i>)	10°C/control, 10,000 μ atm pCO ₂	Adult fish (42 days)	altered NBC1, AE1, NHE1A, NHE1B mRNA expression	Deigweiher et al., 2008
European seabass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	22°C/control, 10,000 μ atm pCO ₂	Adult fish (4 days)	reduced NHE1 expression in gills and kidney	Rimoldi et al., 2009
gulf toadfish (<i>Opsanus beta</i>)	22~25°C/380, 560, 750, 1,000, 1,900 μ atm pCO ₂	Adult fish (1 day)	increased plasma HCO_3^- , pCO ₂ increased intracellular white muscle pH (pHi)	Esbaugh et al., 2012
	22~25°C/1,000, 1,900 μ atm pCO ₂		reduced blood carbonic anhydrase expression	
	22~25°C/control, 1,900 μ atm pCO ₂	Adult fish (3 days)	increased rectal base excretion rate	Heuer et al., 2012
Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	28°C/412, 1,218, 4,155 μ atm pCO ₂	Embryos and hatchlings (0~10 days)	altered expression changes of NHEs, proton pumps, carbonic anhydrase isoforms, bicarbonate transporters, ATPase subunits and rhesus proteins	Tseng et al., 2013
	28°C/393, 7,081 μ atm pCO ₂	Adult fish (2 days)	altered expression changes of NHEs, proton pumps, carbonic anhydrase isoforms, bicarbonate transporters, ATPase subunits and rhesus proteins	
Midshipman (<i>Porichthys notatus</i>)	13°C/control, 21.9(approximately 50,000) mmHg pCO ₂	Adult fish (1hour~3 days)	increased plasma HCO_3^- , pCO ₂ , carbonic anhydrase activity, carbonic anhydrase protein expression, branchial net acid excretion, total CO ₂ rectal fluid	Perry et al., 2010

Perry et al., 2006, 2010; Randall et al., 1982). 담수어와 해수어의 산-염기 평형과 관련된 연구에서는 호흡성 산 과다증(respiratory acidosis)을 유도해내기 위해 과탄산(hypercapnia)조건이 빈번하게 적용되었다(Cameron et al., 1972; Haswell et al., 1980; Janssen et al., 1975; Loyd et al., 1967; Randall et al., 1976). 대부분의 연구들은 몇 시간에서 몇 일 사이에 확실하면서도 효과적으로 산 과다증상을 발현시키기 위해 10,000 $\mu\text{atm CO}_2$ 이상의 과다하게 높은 이산화탄소 농도 조건에서 지속적인 실험을 실시해왔으며, 이들 실험에서는 증가된 순 산 배출이나 세포외부 HCO_3^- 의 흡수 또는 유지를 통해 산 과다증상이 재현되었다(Cameron et al., 1978, 1989; Claiborne et al., 2002; Evans et al., 2005; Goss et al., 1992; Heisler, 1993, 1989; Larsen et al., 1997; Marshall et al., 2006; McDonald et al., 1989; Michaelidis et al., 2007; Perry et al., 1982, 2003, 2006; Randall et al., 1982; Toews et al., 1983; Wheatly et al., 1984; Wood et al., 1984). 이들 연구에서 명백하게 나타나는 것처럼, 어류는 아주 효과적으로 산-염기 조절이 가능하며, 고농도 이산화탄소 환경에 노출된다고 하더라도 넓은 이산화탄소 범위에 대하여 잠재적인 내성을 발현시킬 수 있다(Gutowska et al., 2008; Kroeker et al., 2010; Melzner et al., 2009b; Portner, 2008). 최근의 연구에서 나온 결과를 종합해보면, 500~1000 $\mu\text{atm CO}_2$ 범위에서는 이산화탄소의 영향이 어류에게 치명적이지 않다는 것을 알 수 있으며, 세포외 pH 상태를 유지하기 위한 다른 후속 적응 기작들 또는 이온교환이 나타날 것이라는 것을 알 수 있다. 실제 자연 환경에서 나타날 가능성이 높은 P_{CO_2} (560~1,900 μatm

CO_2)수준에서 아열대 어류의 산-염기 평형반응을 조사한 연구에서는, P_{CO_2} 가 750 μatm CO_2 보다 클 때 체액의 HCO_3^- 를 증가시킴으로써 몇 시간 이내에 대사적 보상반응이 나타나는 초기 호흡성 산 과다증(respiratory acidosis)과 유사한 패턴을 나타내었다(Esbaugh et al., 2012). 또 다른 연구에서는 2,000 μatm CO_2 에 노출된 남극 어류의 경우 체액 HCO_3^- 의 증가를 통해서 세포외 pH가 완벽하게 유지되는 것을 보여주었는데, 이러한 남극 어류의 체액 pH조절 작용은 수온이 낮을수록 더 많은 시간이 요구되는 것으로 나타났다(Strobel et al., 2012).

이처럼 증가된 이산화탄소 환경에 노출된 어류는 효과적으로 체액의 pH를 조절하지만, 그 대신 P_{CO_2} 와 HCO_3^- 의 세포외 환경의 농도가 지속적으로 고농도로 유지되는 현상을 나타낸다. 세포외부의 pH가 정상화되는 동안, 증가된 P_{CO_2} 및 HCO_3^- 농도는(비교적 낮은 외부 P_{CO_2} 조건이라 할지라도) 어류의 행동(behavior), 이석 성장(otolith growth), 삼투조절(osmoregulation)에 현저한 영향을 줄 것으로 예상된다(Heuer et al., 2014).

세포 내 pH가 약간만 감소해도 대부분의 생물은 유산소 대사활동에 장애를 받고, 해당작용의 감소라는 심각한 영향을 받게 된다(Hazel et al., 1978; Somero et al., 1985). 따라서, 대부분의 동물들이 자신의 세포 내 pH를 매우 정교하게 조절하며, pH에 큰 변화가 일어나지 않도록 일정하게 유지한다(Wood et al., 1991). 대부분의 조직내에서 세포내 pH의 조절은 부분적으로는 Cl^-/HCO_3^- 교환(Brauner et al., 2009; Concepcion et al., 2013; Roos et al., 1981;

Stewart et al., 2007) 또는 Na^+/H^+ 교환(Claiborne et al., 2002; Krumschnabel et al., 2001; Orlowski et al., 2004; Parks et al., 2010; Pärt et al., 1996; Roos et al., 1981)을 통한 산의 배출에 의해 이루어지기도 하며, 어류의 적혈구 세포 내에서 활성화된 Na^+/H^+ 교환 카테콜아민에 의해 조절되기도 한다(Baker et al., 2009; Berenbrink et al., 2005; Brauner et al., 2004). 어류가 적당히 증가된 P_{CO_2} 에 노출되었을 때 어류의 세포 내 pH가 약하게 산성화되는 것뿐만 아니라, 몇몇 경우에는 세포 외 pH의 보상과 관련하여 세포 내 pH가 지나치게 변화하는 현상이 나타나기도 한다. 이러한 내부 pH의 지나친 변화는 24시간동안 1,900 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출된 아열대 gulf toadfish(*Opsanus beta*)의 백색근에서 나타났고(Esbaugh et al., 2012), 48시간동안 15,000 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출된 온대 white sturgeon(*Acipenser transmontanus*)의 적혈구, 뇌, 간, 심장에서 관찰되었다(Baker et al., 2009).

한편, 이와는 대조적으로 남극 marbled rockcod(*Notothenia rossii*)의 백색근과 간은 2,000 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출된 상황에서도 세포내부 pH의 조절이 가능하기 때문에 pH의 큰 변화가 없는 것으로 나타났다(Strobel et al., 2012). 생물의 기관과 조직을 대상으로 한 직접적인 검사와 별개로, 위에서 예를 든 3종에 대한 실험에서는 모두 상당한 양의 (추정 또는 계산된) 세포 내부의 HCO_3^- 를 축적하는 것과 동시에, 세포내 pH가 조절되거나 큰 폭으로 변화하였으며, 그와 함께 P_{CO_2} 의 증가도 나타났다. 이러한 연구결과는 기후변화 시나리오를 기반으로 한 미래 환경의 P_{CO_2} 수준(500~2,000 $\mu\text{atm } CO_2$)에서는 세포내 pH

의 변화가 어류의 생리적 현상에 큰 문제를 야기할 가능성이 거의 없는 것처럼 착각하게 할 수 있다. 하지만, 세포 HCO_3^- 농도(이것은 또한 세포 Cl^- 농도에도 영향을 줄 수 있다)의 변화는 pH 조절 이외에도 다른 세포적 기작에도 영향을 미치는 것으로 추정하고있기 때문에, 이러한 기후변화에 의한 P_{CO_2} 혹은 세포내 pH의 변화가 어류에게 미치는 영향에 대해서는 지속적인 관심과 연구가 필요하다(Heuer et al., 2014).

나. 이온 조절(ion regulation)

아가미에 존재하는 H^+ 수송체를 중심으로 한 산-염기 조절기작의 관점에서 살펴보면, 적어도 3개의 Na^+ / H^+ 교환체 동형단백질(transporter isoform)들(NHE1, NHE2, NHE3)과 액포의 H^+ 펌프가 어류의 산-염기 균형에 관여하고 있다. Claiborne et al.(1999)에 의해 처음으로 시작된 산-염기 조절기작에 대한 연구는 대사적 산 과다증에 대한 보상기작과 관련된 basolateral NHE1 동형단백질에 대한 것이었다. 그 이후 비교적 높은 수준의 P_{CO_2} (10,000 μ atm ~ 52,000 μ atm CO_2)에서 이루어진 다른 연구에서는, 이 NHE 동형단백질(NHE1a 과 NHE1b)은 과탄산현상에 의해 유발된 호흡성 산 과다증이 발생된 동안 일어나는 산-염기 균형 조절과 연관되어있는 것으로 알려졌다(Deigweiher et al., 2008; Edwards et al., 2005; Rimoldi et al., 2009). 과탄산현상의 영향에 대해 조사한 모든 연구에서 NHE1 mRNA 발현량은 일반적으로 하향 조절되었으며,

이는 아가미 상피에서 혈장으로 일어나는 basolateral 동형 단백질의 H^+ 수송 감소현상과도 일치한다. 어류가 10,000 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출되었을 때 2 개의 apical NHE 동형단백질 중 NHE3는 아가미에서 풍도가 증가하는 것으로 나타났다(Edwards et al., 2005), 최소 1,200 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출된 초기생활사 시기의 어류에서도 NHE3의 mRNA 발현량은 증가되었다(Tseng et al., 2013). 과탄산현상에 노출되는 동안의 apical NHE3 mRNA 발현량과 NHE단백질의 증가는 산의 순 배출에 대한 필요성과 일치되는 결과이다. 그러나 NHE3와는 달리 현재로서는 과탄산에 의해 발생하는 산 과다증과 해수어의 아가미 내의 NHE2와의 상관관계를 나타내는 정보는 아무것도 없다. 담수 환경에서 어류가 20,000 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출되는 동안 아가미 H^+ 펌프(V-type ATPase)의 일관된 발현량 감소를 보여주는 초기의 연구들과 달리, 최근의 연구들은 해양 환경에서 4,200 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출된 어류의 mRNA 발현과 1,900 $\mu\text{atm } CO_2$ 에서 H^+ 펌프 효소 활성도의 감소 경향을 보여준다(Esbaugh et al., 2012; Tseng et al., 2013). 해양 경골어류 중에서도, longhorn sculpin(*Myoxocephalus octodecimspinosus*)에 대해서만 아가미 H^+ 펌프의 위치 측정이 이루어졌으며, H^+ 펌프는 이들의 세포질 또는 basolateral에 위치하는 것으로 밝혀졌다(Catches et al., 2006). 이것은 앞에서 언급한 것처럼, H^+ -mRNA 풍도의 하향조절 현상이 과탄산 현상에 의해 유발된 호흡성 산 과다증이 발생하는 동안 나타나는 것과 일치하며, 이러한 현상은 아가미에서 산의 순 배출을 증가시키는 역할을 하게 될 것이다. 그러나, 다른 어종에 대해서도 H^+ 펌프의 위치를 측정

하는 문제가 남아있으며 아마 추후에 밝혀질 것으로 예상되지만, 이 위치는 어종에 따라서 틀려질 가능성이 있다.

최근의 여러 연구에 의하여 H^+ 수송체 뿐만 아니라, 해수어의 아가미에 존재하는 SLC26(a3, a4(pendrin단백질), a6)와 SLC4(a1(AE1), a2, a4(NBC)) 집단에 속하는 무수히 많은 HCO_3^- 운반체가 계속해서 식별되고 있다(Esbaugh et al., 2012; Grosell et al., 2009a; Kurita et al., 2008; Piermarini et al., 2002; Taylor et al., 2008; Tseng et al., 2013). 1,900 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출된 toadfish(*Neighbours character*)의 아가미 apical SLC26a3과 SLC26a6는 비 전사적 반응을 나타내었으나(Esbaugh et al., 2012), 아직까지 apical SLC26a4의 발현 및 풍도에 이산화탄소가 미치는 영향을 연구한 결과는 없다. 이와는 대조적으로, SLC4 집단에 속하는 단백질들은 증가한 이산화탄소의 영향에 의해 어떤 변화가 나타나는지 알려져 있는데, 7000 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출된 medaka(*Oryzias latipes*)는 2개의 아가미 AE1 동형단백질(AE1a, AE1b)의 상향조절 현상을 나타냈다(Tseng et al., 2013). 이것은 medaka가 과탄산 환경에 노출되는 동안 나타나는 AE1 동형단백질의 발현량 증가는 아가미 세포의 세포질에서 혈장으로의 HCO_3^- 의 이동을 담당하는 AE1 단백질이 basolateral에 위치하고 있다는 것을 암시하는 결과이다. 실제로, 담수 제브라피쉬(*Danio rerio*)를 이용한 연구에서 이 음이온 교환체는 미토콘드리아 풍부 세포(Mitochondria rich cell: MRC)의 basolateral 막을 통한 HCO_3^- 의 이동을 책임지고 있다는 것을 확인할 수 있었다(Lee et al., 2011). 그러나, 이 음이온 교환체는 mRNA 분리에 사용되는 아가미 조직 내에서만

나타나는 게 아니라, 적혈구 내에서도 높게 발현되는 경우가 있기 때문에, 아가미 내에서 염기 운반에 관여하는 AE1의 기능만을 평가하는데 사용 할 수는 없다(Romero et al., 2004). 흥미롭게도, 1,900 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에 72시간동안 노출된 toadfish의 아가미 조직은 SLC4 AE2 mRNA의 발현을 나타내었다. 어류의 산-염기 생리학에서 이 음이온 교환체의 역할에 대해 거의 알려진 것이 없음에도 불구하고, 위의 연구들은 AE2가 apical 막에만 존재하며, 이 막을 통해 주위 해수로 HCO_3^- 를 배설하는 기능을 수행한다는 것을 보여주고 있다. 일반적으로 이 음이온 교환체는 대부분 basolateral 막에 위치한다(Romero et al., 2004).

basolateral 막을 통해 혈장 내로 Na^+ 와 HCO_3^- 를 밀어내는 아가미의 MRC를 작동시키는 것으로 추정되는 SLC4a4 (NBC1) $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ 공수송체(co-transporter)는 증가된 P_{CO_2} 에 대해 노출된 수준, 노출된 기간, 노출된 발달단계, 연구 대상종에 따라 반응에 차이가 있는것으로 보인다. 1,900 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에 72시간 노출된 아열대 toadfish가 증가된 P_{CO_2} 에 대한 대사적 보상을 위해 물로부터 HCO_3^- 를 흡수하는 것을 생각하면, 이들의 아가미 NBC1 mRNA 발현량이 일정하게 유지되는 현상은 놀라울 뿐이다(Esbaugh et al., 2012). 하지만, NBC1에 비해 아가미를 거쳐 일어나는 수송체의 해수에서 혈액으로의 HCO_3^- 이동 작용에 제한이 있다는 사실을 반영하는 것 같다.

이와 대조적으로 10,000 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에 노출된 온대 eelpout(*Gymnelus hemifasciatus*)와 1,200~7,000 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에 노출된 아열대 medaka의 NBC1

mRNA 발현량은 노출 초기에 일시적으로 저해되지만, 그 후에는 증가하는 것으로 나타났다. 10,000 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에 42일간 노출된 eelpout의 경우 초기의 일시적인 발현량 저해 이후에 basolateral 막을 통한 아가미 상피로 HCO_3^- 의 수송에 대한 필요에 의해, NBC1 mRNA의 발현량 또한 증가하는 것으로 나타났다(Deigweier et al., 2008). 이것은 1,200 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 이상의 P_{CO_2} 에 노출된 갯 부화한 medaka에서 체내 전체의 NBC1a 동형단백질 mRNA 발현량의 증가와 1,000 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에 노출된 성체 medaka 아가미 조직 내의 NBC1b mRNA 발현량이 증가한 실험 결과와도 일치한다(Tseng et al., 2013).

한편, 7,000 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에서의 성체 medaka 아가미 조직 내의 NBC1a 동형단백질 및 1,200과 4,200 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에서 배아내의 NBC1a 동형단백질 발현량은 반대로 억제되는 것으로 나타났다. NBC1b 동형단백질 역시 마찬가지로 4,200 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에 노출된 medaka의 배아에서 발현이 억제되는 현상을 나타내었다. 그러나, 1,200 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에 노출된 배아나 1,200과 4,200 $\mu\text{atm } \text{CO}_2$ 에 노출된 갯 부화한 유생에서는 이 동형단백질 mRNA 발현량의 변화는 나타나지 않았다(Tseng et al., 2013). 이처럼 다양한 NBC1 조절 반응들은 아마도 노출된 이산화탄소 농도, 노출된 시간, 종에 따라 이에 대한 세포적 조절 기작이 다양한 전략으로 나타난다는 것을 의미한다.

이처럼 아가미 상피 내에서 이산화탄소의 수화에 의해 부분적으로 나타나는 어류의 뛰어난 산-염기 조절능력은 구별된 apical 또는 basolateral를 통하여 일어나는 외부 환경 또는 혈액으로의 H^+ 와 HCO_3^- 의 배출에 의해 조절된

다. 세포질의 이산화탄소 수화는 탄산무수화효소(CA) 동형단백질에 의해 촉진되며, 이 동형단백질 중에서도 세포질 CAc(포유류의 CAII와 유사)는 가장 특징적이다(Esbaugh et al., 2005; Georgalis et al., 2006; Sattin et al., 2010). 이 CA 동형단백질은 염분이 일반적인 환경조건 보다 높은 약 60 ppt 이상의 조건에서 효소 활성반응이 증가하며, 최종적으로 아가미 산 분비의 순 증가를 이끌어낸다. 이처럼, 아가미 산-염기 조절 및 이온조절 기능들을 수행하는 효소들의 중추적 역할에도 불구하고, 증가된 이산화탄소가 아가미와 다른 조직내의 CA 동형단백질에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 연구결과는 아직 적은 편이다.

최근, 환경적으로도 나타날 가능성이 있는 P_{CO_2} 수준의 이산화탄소 노출에 대한 CA의 반응에 관해 지속적으로 연구가 수행되어 왔다(Esbaugh et al., 2012; Tseng et al., 2013). 이들의 실험에서 1,900 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 8~72시간동안 노출된 gulf toadfish의 아가미 CAc mRNA는 강한 하향 조절 반응을 나타내었으며(Esbaugh et al., 2012), 이러한 현상은 또한 1,200 $\mu\text{atm } CO_2$ 이상의 P_{CO_2} 에 노출된 medaka 의 배아와 4,200 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출된 medaka의 유생에서도 동일하게 나타났다(Tseng et al., 2013). 탄산 무수화 효소에 대한 연구에서, 증가된 P_{CO_2} 가 CAc에 미치는 영향에 대한 연구만 이루어지고 있는 것은 아니며, 적어도 medaka 배아에서는, 증가된 P_{CO_2} 에 의해 CAc 이외의 또 다른 동형단백질인 CA15 mRNA 역시 하향조절되는 반응을 나타내었다(Tseng et al., 2013).

매우 높은 P_{CO_2} 수준(50,000 $\mu\text{atm } CO_2$)에서 아가미 조직 내의 CA단백질의 풍도와 효소적 활성이 증가한 연구 결과에도 불구하고, 그보다 더 낮은 P_{CO_2} 수준에서는, 증가된 P_{CO_2} 에 대한 반응으로서 H^+ 배출보다 HCO_3^- 흡수를 수반하는 보상적 반응에 의한 하향조절이 더 높게 나타나는 것으로 관찰되었다(Esbaugh et al., 2012). 주위의 HCO_3^- 흡수에 의하여 세포질 HCO_3^- 가 증가한 이후에는 상대적으로 HCO_3^- 농도가 더 낮아진 해수로부터 아가미 조직 내의 CA를 통한 HCO_3^- 흡수로 인해 별 이득을 얻지 못할 것이다. 더 높은 P_{CO_2} 수준에서 아가미 CA의 증가는 H^+ 배출을 요구하는 더 극한 상황을 반영할 것이며, 따라서 아가미CA는 체액의 pH를 유지하는 작용을 할 것이다.

앞에서 거론된 H^+ 또는 HCO_3^- 의 조절에 영향을 주는 다양한 요소들 이외에도 다양한 효소 및 막 단백질들이 이온 조절에 관여하는데, 그 중 하나인 $Na^+ - K^+ATPase$ 에 대한 연구들을 조사한 결과, 하나의 연구에서 효소 활성의 일시적인 하향조절(1,900 $\mu\text{atm } CO_2$)이 나타나긴 했지만(Esbaugh et al., 2012), 그 외의 많은 연구들에서는 증가된 P_{CO_2} (6,000, 10,000 $\mu\text{atm } CO_2$)에 노출된 어류의 아가미 조직내의 NKA subunit의 증가된 발현 또는 NKA 활성 증가가 나타나고 있다(Melzner et al., 2009a; Deigweier et al., 2008). 이러한 $Na^+ - K^+ATPase$ 활성의 증가는 이산화탄소에 노출된 어류의 소장에서 나타나는 증가된 염분 흡수에 대한 보상의 필요성과도 일치하며, 그와 동시에 Na^+ 와 Cl^- 경사도에만 의존해 일어나는 산과 염기 운반체의 활성도를 증가시키기 위한 효소 활성의 필요성을 드러낸다고 할 수 있다(Heuer et al., 2012).

이들 운반체들은 NHEs, 음이온 교환체, 그리고 위에서 언급된 공수송체를 포함한다.

이와 대조적으로, 아가미 Rh 단백질들은 H^+ 또는 HCO_3^- 의 수송에 직접적으로는 관여하지는 않지만, 아가미 상피를 통해서 일어나는 암모니아 수송에 관여하는 것처럼 산-염기 조절에도 어느 정도 기여할 것으로 생각된다. 몇몇 연구에서는 이들 단백질들이 특정 세포 타입에서 이산화탄소를 수송할 수 있다는 증거들을 제시하고 있다(Nawata et al., 2008; Perry et al., 2010b). 해수에 순치된 복어의 아가미 표면의 apical 경계면에서 NH_4^+ 수송을 담당하는 apical Rhcg 동형단백질은 NHE3와 협력하여 각각 NH_3 와 H^+ 를 배출하기 위해 작동하며 암모니아가 지속적으로 외부로 확산되는 것을 용이하게 해 준다(Nawata et al., 2010). 이 기작은 산-염기 등가이동(동일 분량의 이동)에는 관여하지 않음에도 불구하고, medaka를 대상으로 한 실험에서 증가된 P_{CO_2} (1,200~7,000 $\mu\text{atm } CO_2$)환경 조건에서 다수의 Rh 단백질의 mRNA들(Rhag, Rhbg, Rhcg)의 발현량이 증가와 감소(배아), 증가(유생), 감소와 증가(성어의 아가미)와 같은 다양한 반응을 나타냈다는 사실만으로도 충분히 흥미를 끈다(Tseng et al., 2013). 이 Rh 단백질의 발현량 변화가 산-염기 평형 조절에서 Rh단백질이 기능적 측면에서의 직접적인 작용을 반영하는 것인지, 또는 증가된 P_{CO_2} 에 의한 암모니아 배설 기작의 변화를 반영하는 것인지 정확한 규명을 위해서 앞으로 더 연구되어야 한다.

2) 석회화(Calcification)

어류는 전통적으로 석회화 생물로 취급되지 않았지만, 사실 어류는 소장 내 막에서 $CaCO_3$ 를 생성하며, 내이 속에서도 이석을 생산해낸다. 이석은 $CaCO_3$ 응결체로서 주로 소리 감지와 중력 감지라는 기능을 수행하는 한편(Tohse et al., 2004; Tohse et al., 2001), 소장내의 $CaCO_3$ 석출물은 소장 내의 수분 흡수와 그에 따른 삼투조절을 제공하기 위해 생성된다(Grosell et al., 2006, Grosell, 2011a, 2011b; Wilson et al., 2002). 어류 유생이 산성화 환경에 노출되었을 때 나타나는 이석의 크기변화에 대한 관찰실험으로부터, 대부분의 치어 이석의 크기는 산성화된 환경에서 커짐을 알 수 있다(Table 2).

가. 이석의 크기와 밀도증가

해수의 CO_2 가 증가하면 해수 내 아라고나이트(aragonite, 선석) 포화도가 감소하여 이석의 성장을 저해할 것이라는 기존의 가설은 Sea bass를 대상으로 한 연구 결과에 의해 정면으로 반박되었다(Checkley et al., 2009). 실제로 이 연구에서는 환경적으로 실제 나타날 가능성이 높은 수준인 $993 \mu atm CO_2$ 에서 sea bass 유생의 이석 크기가 증가한 것을 보여준다. 이러한 현상은 $1721 \mu atm CO_2$ 에 노출된 clownfish(Munday et al., 2011a), $800 \mu atm CO_2$ 에 노출된

Table 2. Ocean acidification effects on fishes relevant to early life stage calcification

Species	Experimental condition	Exposure duration	Process impacted	References
Alaska Pollock (<i>Theragra chalcogramma</i>)	8,8°C/414, 478, 815, 1,805 $\mu\text{atm pCO}_2$	Juvenile yearlings(28 weeks)	increased otolith size	Hurst et al., 2012
Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	5~10°C/ 370, 1,800, 4,200 $\mu\text{atm pCO}_2$	0~46 dph (47 days)	increased otolith size	Maneja et al., 2013
Baltic cod (<i>Gadus morhua</i>)	7.4°C/380, 1,400, 4,000 $\mu\text{atm pCO}_2$	Fertilized egg~hatching (12 days)	no effect otolith size	Frommel et al., 2012
Cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)	27°C/305, 796, 2,123 $\mu\text{atm pCO}_2$	2dph larvae~22dph larvae(20 days)	increased otolith size	Bignami et al., 2013b
	27~30°C/305, 800, 2,000 $\mu\text{atm pCO}_2$	2dph larvae~22dph larvae(20 days)	increased otolith mass	
Orange anemonefish (<i>Amphiprion percula</i>)	30°C/404, 1,050, 2,042 $\mu\text{atm pCO}_2$	Fertilized egg~11dph (17~19 days)	increased otolith size	Munday et al., 2011a
Spiny damselfish (<i>Acanthochromis polyacanthus</i>)	28~29°C/455, 598, 723, 841 $\mu\text{atm pCO}_2$	Newly hatched juvenile (21 days)	increased otolith size	Munday et al., 2011b
White seabass (<i>Atractoscion nobilis</i>)	18°C/430, 1,000, 2,500 $\mu\text{atm pCO}_2$	Fertilized egg~7dph (7~8 days)	increased otolith size	Checkley et al., 2009

cobia(*Rachycentron canadum*)(Bignami et al., 2013b), 1800 $\mu\text{atm CO}_2$ 에 노출된 Atlantic cod(Maneja et al., 2013) 그리고 478 $\mu\text{atm CO}_2$ 에 노출된 명태(Hurst et al., 2012)에서도 유사하게 나타났으며, 심지어 800 $\mu\text{atm CO}_2$ 에 노출된 cobia에서는 이석 무게의 증가까지 관찰되었다(Bignami et al., 2013b).

그러나, 증가된 CO_2 가 이석 성장에 아무런 영향을 주지 않는 경우도 여러 연구에서 나타났는데, 900 $\mu\text{atm CO}_2$ 에 노출된 spiny damselfish(*Acanthochromis polyacanthus*)(Munday et al., 2011b; Simpson et al., 2011), 최대 4,000 $\mu\text{atm CO}_2$ 에 노출된 eastern BalticCod(*Gadus morhua*)(Frommel et al., 2012), 그리고 최대 4,635 $\mu\text{atm CO}_2$ 에 노출된 대서양 청어(Franke et al., 2011)의 경우 이석 성장에 아무런 영향이 나타나지 않았으며, 이는 이산화탄소 영향에 의한 이석 성장은 종 특이적인 민감도의 차이를 나타낸다는 것을 의미한다.

종 간의 이런 차이와는 별개로, 이석 성장이 증가한다는 것은 증가된 체액 P_{CO_2} 와 HCO_3^- 수준을 반영하는 것으로 보이며, 이러한 현상은 이석 내에 탄산염이 집적될 수 있는 기질을 제공한다. 어류의 이석은 내임파액으로 가득 찬 낭상 상피 내부에 위치하는데, 이곳은 혈장 농도보다 5~10배 더 높은 최대 32mM의 총 이산화탄소 농도를 나타낸다(Payan et al., 1997, 1999). 생리학적인 혈장 HCO_3^- 농도 내에서 상피 바깥의 전해질 매질 내의 HCO_3^- 농도가 증가될 때, HCO_3^- 가 내임파액 뿐만 아니라 이석 내로 합입되는 것은 체외에서의 포화 동역학을 보여준다(Tohse et al., 2001). 이러한 관찰은 HCO_3^- 운반체가 혈액으로

부터 내임파액으로 바뀌었음을 나타내며, 체액 HCO_3^- 농도 증가에 의해 이산화탄소 배출에 대한 어류의 보상작용이 일어날 때, 이석의 크기가 증가하는 현상이 관찰되는 것을 어느정도 설명해 줄 수 있다. 실제로, 전해조 용액 내의 HCO_3^- 농도가 증가함에 따라 탄산염이 내임파액과 이석 내부로 합입되는 양은 증가하며 각각 25mM, 10mM에서 포화상태에 이른다(Tohse et al., 2001). 이런 현상은 1,000 $\mu\text{atm } CO_2$ 와 1,900 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 각각 노출된 toadfish에서 체액 HCO_3^- 농도가 1~3mM 증가하는 현상으로 확인되었으며, 이것은 이석내부로 탄산염의 합입이 증가되는 결과를 가져왔다(Esbaugh et al., 2012). 이처럼, 실제로 환경적으로 나타날 가능성이 높은 이산화탄소 수준에 노출된 어류들로부터 측정된 체액 HCO_3^- 의 증가는 이석 내부로 CO_3^{2-} 의 유입을 증가시키기에 충분한 규모이다. 어류가 고농도의 이산화탄소에 노출된 상황에서 pH의 감소를 바로잡고 효과적으로 보상하기 위해 체액 HCO_3^- 의 증가가 나타나는 동안에도 혈장 P_{CO_2} 는 높게 유지된다(Esbaugh et al., 2012). 혈장 HCO_3^- 뿐만 아니라, 내이 임파액 내에서 발생하는 이산화탄소의 수화 역시 이석 형성에 대한 기질로서 HCO_3^- 를 공급하는 것으로 추측된다. 이러한 이론은 내이 상피의 세포질 일부에서 관찰되는 이산화탄소 수화율을 조정하는 CA 및 CAII 항체의 높은 면역반응성을 통해 이 효소의 존재와 그 기능을 암시하고 있다(Tohse et al., 2004). 내임파액과 이석 내로 CO_3^{2-} 유입 억제제가 기낭에서 분리된 CA 억제제 acetazolamide의 사용을 통해 나타나는 것은(Tohse et al., 2001), 내부기원 이산화탄소의 수화를 일으키는 세포질 CA의 이석 형성을 위한 기질을 공급하기

위한 기능을 보여준다. 세포 외부 이산화탄소의 증가가 세포 내부 이산화탄소의 증가에 의해 발생할 것이라는 추정이 타당해 보이는 것은 낭상 상피내의 CAII 수화를 통해 생성된 세포 HCO_3^- 를 내임파액 속으로의 수송 현상에 의해 이석 내부로 공급할 수 있기 때문이다. 그러나, 낭상 상피에 의해 일어나는 세포외부의 CO_2 와 HCO_3^- 의 분비와 이석 내로의 유입 간의 상관관계는 좀 더 규명되어야 한다. 게다가, 2가지 경우를 제외하고(Esbaugh et al., 2012; Strobel et al., 2012), 실제로 나타날 가능성이 높은 이산화탄소 수준($2000 \mu atm CO_2$ 이하)에 노출된 어류의 혈액 산-염기 상태는 관찰되고 있지 않으며, 이석 성장에 이산화탄소가 미치는 영향에 대한 반응이 관찰된 종의 차이는 종에 따른 혈액 산-염기 상태 또는 다른 생리적 특성의 차이를 반영한다고 할 수 있다.

나. 소장의 $CaCO_3$ 형성

해수어는 해수의 섭취와 소장에서 용질과 결합된 물의 흡수에 의해 수분 밸런스를 유지한다(Grosell, 2011b). 공수송체(cotransporter)인 $Na^+ - K^+ - 2Cl^-$ (NKCC2)와 $Na^+ - Cl^-$ (NCC)는 Na^+ 와 Cl^- 의 흡수에 기여하는데, 소장의 Cl^- 흡수량 중 최대 70%는 이들 공수송체에 의해 일어나는 Cl^-/HCO_3^- 음이온교환에 의해 설명이 가능하다(Grosell et al., 2006). 이러한 음이온 교환의 결과는 소장 내강의 HCO_3^- 농도를 높이며(최대 100mM), 소장 내강의 알칼리성

환경(몇몇 실험에서는 pH 9.0에 이르기도 함)은 소장 내에서 섭취한 해수로부터 육안관찰이 가능한 정도의 $CaCO_3$ 덩어리를 형성하게 한다(Wilson et al., 2002). $CaCO_3$ 형성은 100 mosM 정도의 내강 삼투압에서는 감소하며, 이를 통해 소장에 의한 삼투적 유체 흡수가 용이하게 된다(Anderson et al., 2010; Grosell et al., 2007, 2011; Wilson et al., 2002).

실제로, $CaCO_3$ 석출 반응에 의해 유발되는 내강 삼투압의 감소는 성공적인 삼투조절에도 중요하지만, 더 나아가 해수어의 생존에 있어서도 대단히 중요하다(Genz et al., 2011). 소장 상피의 높은 대사율로부터 초래된 내생기원 이산화탄소의 수화와, 혈액에서 소장 내강으로의 상피전위 HCO_3^- 수송은 소장 내강으로 HCO_3^- 분비를 위한 2가지 공급원으로서 중요하다(Taylor et al., 2009). 거의 예외 없이, 이들 2개의 공급원은 전반적인 소장 HCO_3^- 분비를 감당하는데 기여한다(Grosell et al., 2006; Wilson et al., 2003). 적어도 지금까지 확인된 중에서는, 상피전위 HCO_3^- 수송은 생물발전 basolateral $Na^+ - HCO_3^-$ 공수송체 (SLC4a4)(Chang et al., 2012; Kurita et al., 2008; Taylor et al., 2010)와 생물발전 apical Cl^-/HCO_3^- 교환체(SLC26a6)(Grosell et al., 2009b; Kurita et al., 2008)에 의해 영향을 받으며, 이들은 basolateral step에 의해 주로 제한되는 것으로 보인다(Taylor et al., 2010).

활성화된 소장 상피의 대사량 증가로부터 유발되는 내생기원 이산화탄소의 수화는 세포질 CA(CAc: 포유류의 CAII에 상응)의 촉매작용에 의해 촉진된다. 이 수화 반응은 apical SLC26a6을 통한 음이온 교환에 HCO_3^- 과 NHE1과 유사

하게 주로 Na^+ 의존적 pathway를 통해 basolateral 막을 지나 분비되는 H^+ 를 제공한다(Grosell, 2007; Grosell et al., 2006, 2009a; Sattin et al., 2010). 해수어에 의한 소장 HCO_3^- 분비는 세포외부 소장막 이산화탄소와 소장막 HCO_3^- 의 증가에 의해 유도된다(Grosell et al., 2005, 2006; Somero et al., 1985; Wilson et al., 2003). 이처럼, 증가된 외부 이산화탄소는 체액 P_{CO_2} 와 HCO_3^- 의 증가를 유발하는 보상적 반응을 나타내며, 소장의 HCO_3^- 분비를 자극한다는 가설을 성립시킨다. 실제로 이 가설은 매우 높은 외부 이산화탄소 수준(50,000 $\mu atm CO_2$)에 노출된 midshipmen(*Porichthys notatus*)과 환경적으로 나타날 가능성이 높은 이산화탄소 수준(1,900 $\mu atm CO_2$)에 노출된 toadfish에 의해 입증되었다(Perry et al., 2010a; Heuer et al., 2012).

소장에서 일어나는 탄산칼슘 석출 및 외부로의 배출은 소장이 전반적으로 HCO_3^- 분비를 담당하고 있다는 것을 보여준다(Genz et al., 2008). 이처럼 증가된 이산화탄소 환경에 노출된 어류가 $CaCO_3$ 를 방출한 것이라는 예측은 타당하게 여겨진다. 그리고 해양산성화의 맥락에서 볼 때, 어류의 $CaCO_3$ 방출은 아라고나이트에 대해 포화도가 감소한(즉, 산성화된) 외부환경에 대한 반응으로 석회화와 $CaCO_3$ 생산이 증가된다고 하는 약간 특이한 시나리오를 대변하고 있다. 특히, 어류기원 $CaCO_3$ 는 해양 무기탄소 사이클과 $CaCO_3$ 퇴적물 생성의 주요 원인으로 여겨진다(Perry et al., 2010a; Salter et al., 2012; Wilson et al., 2009). 실제로 50,000 $\mu atm CO_2$ 에 노출된 midshipmen에서 이러한 $CaCO_3$ 배출 증가가 관찰되었다(Perry et al., 2010a). 그러나 이와는 대조적으로 1,900 $\mu atm CO_2$

에서 진행된 toadfish에 대한 연구에서는 소장 HCO_3^- 분비가 33%나 유의하게 증가했음에도 불구하고, $CaCO_3$ 배출량 증가는 유의하게 나타나지 않았다 (Heuer et al., 2012). 실험수준의 큰 격차(50,000 대 1,900: 최대 25배 이상의 차이)를 고려하여 이산화탄소 농도 증가에 내성이 있는 종을 어떻게 구분할 것인가에 대한 문제를 해결하기 위해서라도, 실험에 사용된 종 이외의 다른 종에 대해서도 $CaCO_3$ 석출이 증가될 가능성에 대한 조사가 진행되어야 하며, 위 실험에서 나타난 $CaCO_3$ 형성은 과탄산 현상에 대한 반응으로 잠시 나타나는 현상일 뿐이라는 것을 드러낸다. 해양산성화 환경에서 $CaCO_3$ 생산이 최소화 되는 변화에도 불구하고, 증가된 이산화탄소 환경에서 나타나는 최대 염기 분비량의 증가는, 소장 조직 그리고 아가미와 같이 혈액pH를 유지하기 위해서 HCO_3^- 유지가 요구되는 곳에서는 오히려 역효과를 낳는다(Heuer et al., 2012). 장기간에 걸친 이산화탄소 노출에 의해 나타나는 소장 HCO_3^- 분비의 대사비용 변화, 삼투조절 기작과 이와 연관된 잠재적 상호작용 등과 같은 실제 나타날 가능성이 높은 순응 반응에 대해서도 앞으로 집중적인 연구가 필요하다.

위에서 언급한 바와 같이, 어류기원 $CaCO_3$ 는 세계 해양 CO_3^{2-} 생산에 상당량 기여한다(Perry et al., 2011; Salter et al., 2012; Wilson et al., 2009). 환경적으로 나타날 가능성이 높은 이산화탄소 수준 정도의 외부 이산화탄소 증가에 의한 영향은 실제로 어류의 $CaCO_3$ 배출율에 그다지 대단한 영향을 미치지 않는다 하더라도 미래 이산화탄소 시나리오 조건에서의 해양의 탄산염 플럭스

를 이해하는데 있어 이 사실은 중요하다. 어류에 의해 생산된 Mg^{2+} 이 풍부한 $CaCO_3$ 이 일반적인 $CaCO_3$ 에 비해 비교적 높은 용해도를 가지고 있다고 밝힌 최근의 연구(Woosley et al., 2012)는 해양 탄산염 플럭스에 영향을 미칠 수 있다는 것을 강조하지만, 최근에 와서는 다시 이러한 주장에 대해 의의가 제기되고 있다.(Faggio et al., 2011; Foran et al., 2013). 게다가, 어류에 의해 생성된 $CaCO_3$ 의 Mg^{2+} 비율이 종에 따라 상당히 차이가 난다는 사실은(Salter et al., 2012), 어류기원 $CaCO_3$ 이 퇴적물로 침전되거나 해수 중으로 용해되는 현상은 이들이 가지는 용해도의 차이에 따라 종 특이적 반응으로 나타날 것을 암시한다.

3) 생물학적 파라미터

이산화탄소에 노출된 어류의 발달, 성장, 사망을 조사한 연구들은 연구별로 매우 변동이 심한 결과를 보이고 있는데, 심지어 비슷한 성장단계의 어류를 대상으로 한 실험에서나 비슷한 노출 기간을 가지는 실험조건에서도 상당한 차이를 나타낸다. 또한 몇몇 어종은 17,000 $\mu\text{atm } CO_2$ 에서 최대 50,000 $\mu\text{atm } CO_2$ (2300년 경 나타날 것으로 예측되는 이산화탄소 농도의 8~25배)의 이산화탄소 농도에서도 성장 감소, 비만도, 사망률 증가에 대한 저항력을 나타내기도 한다(Fivelstad et al., 1998; Foss et al., 2003; Hayashi et al., 2004; Ishimatsu et al., 2004; Kikkawa et al., 2004; Petochi, 2011). 동일 조건에서 실험

시된 몇몇 연구들에서 공통적으로 나타나는 약간의 결과 차이는 섭이율 차이와 같은 에너지 공급과 관계가 있으므로 실험을 수행할 때 세심한 주의가 요구된다. 하지만, 성장, 생존, 발달측정을 위해 실시된 2개의 최근 연구는 실험에 사용된 개체들의 부모의 이산화탄소 노출 유무 및 특정 생활사 시기의 노출이 이러한 다양한 변화에 더 큰 영향을 미친다는 사실을 강조하고 있다(Baumann et al., 2012; Miller et al., 2012). 지금까지 조사된 어류의 초기생활사 시기의 생물학적 파라미터에 영향을 미치는 해양산성화의 영향에 대한 결과들은 <Table 3>에 요약하였다.

가. 성장과 발달

지금까지 연구된 결과에 따르면, 어류의 성장에 미치는 이산화탄소의 영향은(영향이 있든지 없든지 관계없이) 정해진 패턴이 없다는 것이다. 갯 부화한 개체 또는 배아에 초점을 둔 연구 결과를 살펴보면, 780 $\mu\text{atm CO}_2$ 에서 실험한 염하구역 silverside(*Menidia beryllina*)와 1,032 $\mu\text{atm CO}_2$ 에서 사육한 cinnamon anemonefish 두 종에서 성장의 감소가 나타났으며, 대서양 대구 (Atlantic cod)의 경우에는 비만도의 투여의존적(즉, 먹이 투여 많으면 비만도 증가, 적으면 감소)현상이 나타났으나 이 경우에는 앞의 두 종보다 더 높은 이산화탄소 수준인 1,000, 3,800, 8,500 $\mu\text{atm CO}_2$ 에서 실험이 진행되었다 (Baumann et al., 2012; Miller et al., 2012; Moran et al., 2011).

Baltic cod(*Gadus morhua*)(Frommel et al., 2012), 대서양 청어(*Clupea harengus*)(Franke et al., 2011), spiny damselfish (Munday et al., 2011b), coral trout 미성어(*Plectropomus leopardus*)(Munday et al., 2012), 명태 미성어(Hurst et al., 2012), cobia (Bignami et al., 2013b)를 포함한 몇몇 어종의 유생들은 2,000 $\mu\text{atm } CO_2$ 이하의 이산화탄소 농도에서는 어떠한 성장변수의 변화도 나타내지 않았다. 그리고, 성어에 대한 실험 또한 이들이 CO_2 노출에 민감하지 않음을 보여주는데, 900 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출된 three-spined stickleback는 성장에 아무런 변화가 없었으며(Jutfelt et al., 2013), 심지어 1,030 $\mu\text{atm } CO_2$ 에

Table 3. Ocean acidification effects on fishes relevant to growth, development and survival of early life stage of fishes

Species	Experimental condition	Exposure duration	Process impacted	References
Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>)	10°C/ 380, 1,800, 4,200 µatm $p\text{CO}_2$	Newly fertilized egg~ 7 weeks post hatch (44-51 days)	increased dry weight (Transient response : dph32-39)	Frommel et al., 2012
			increased lipid content (Transient response : dph32)	
			tissue damage	
	5~10°C/ 370, 1,800, 4,200 µatm $p\text{CO}_2$	0~46 dph (47 days)	standard length (different among groups)	Maneja et al., 2013
	10°C/1,000, 3,800, 8,500 µatm $p\text{CO}_2$	Juvenile stage (55 days)	reduced body weight	Moran and Støttrup, 2011
			reduced specific growth rate	
			reduced condition factor	
			mortality	
Atlantic herring (<i>Clupea harengus</i>)	12°C/480, 1,260, 1,859, 2,626, 2,903, 4,635 µatm $p\text{CO}_2$	Newly fertilized egg~hatching(8 days)	decreased RNA : DNA ratio	Franke and Clemmesen, 2011
			increased malformation eggs and egg mortality	
			decreased hatch rate	
			increased otolith size	
			increased dry weight	
Baltic cod (<i>Gadus morhua</i>)	6.7°C/380, 560, 840, 1,120, 1,400, 4,000 µatm $p\text{CO}_2$	Newly fertilized egg~hatching(10 days)	no effects egg survival and hatching success	Frommel et al., 2012
	6.6°C/380, 840, 1,400, 4,000 µatm $p\text{CO}_2$	Hatched larvae(11 days)	no effects standard length, growth rate, yolk sac area	
	7.4°C/380, 1,400, 4,000 µatm $p\text{CO}_2$	Fertilized egg~7days old (19 days)	no effects RNA : DNA ratio	
Inland silverside (<i>Menidia beryllina</i>)	24°C/390, 410~780, 1,100 µatm $p\text{CO}_2$	Hatched larvae(1~7 days)	reduced survival and length increased malformations	Baumann et al., 2012

Table 3(continued).

Species	Experimental condition	Exposure duration	Process impacted	References
Cinnamon anemonefish (<i>Amphiprion melanopus</i>)	28.5, 30, 31.5°C/430, 581, 1,032 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$	Hatched larvae~juvenile(32 days)	decreasing standard length, weight and survival (no parental exposure high CO ₂)	Miller et al., 2012
			increasing weight (parental exposure high CO ₂)	
			no significant different standard length and survival (parental exposure high CO ₂)	
	36.4°C/430, 584, 1032 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$	Hatched larvae(7~8 days)	no effects hatching length and embryonic duration	Miller et al., 2013
		Breeding pair(9 months)	increased clutches number, eggs number, reproductive output	
Cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)	27~30°C/305, 800, 2,000 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$	2dph larvae~22dph larvae(20 days)	no effect mortality	Bignami et al., 2013b
	27~30°C/533, 500, 5,400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$	2dph larvae~14dph larvae(12 days)	delayed development and size at age	
Coral trout (<i>Plectropomus leopardus</i>)	28.5°C/490, 570, 700, 960 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$	Juvenile stage (28 days)	on effect length, weight and survival	Munday et al., 2012
Orange anemonefish (<i>Amphiprion percula</i>)	30°C/660, 1,000, 1,700 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$	Newly hatch larvae~end of pelagic phase(11 days)	increased larval length and weight	Munday et al., 2009
Walleye Pollock (<i>Theragra chalcogramma</i>)	8,8°C/414, 478, 815, 1,805 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$	Juvenile yearlings(28 weeks)	no effect mortality, length, weight	Hurst et al., 2012
	8.3°C/596, 828, 1,285, 2,894 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$	Juvenile sub-yearling(28 weeks)	increased growth	
	2.4°C/225, 386, 643, 1543 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$	Juvenile sub-yearling(28 weeks)	no effect consumption rate, growth, condition factor	

9개월간 노출된 cinnamon anemonefish도 역시 몸 상태에 아무런 영향이 없었을 뿐만 아니라 오히려 산란량이 증가하는 것을 보여주었다(Miller et al. 2013). 마지막으로, orange clownfish 유생(Munday et al., 2009b)과 cinnamon anemonefish 유생(부모 역시 1,032 $\mu\text{atm } CO_2$ 에 노출됨)의 경우에는 성장이 증가하는 것으로 나타났다(Miller et al., 2012).

명태 미성어의 경우에서도 성장이 증가하는 현상을 보였으나 비만도는 아무런 변화가 나타나지 않았으며, 체중 특이적 섭이율의 증가 또한 나타나지 않았는데, 이것은 이들의 성장이 증가한 것은 먹이 섭이율이 증가했기 때문이 아니라 에너지 배분에 변화가 나타났기 때문이다(Hurst et al., 2012). Cinnamon anemonefish 역시 CO_2 노출에 의한 섭이율의 변화는 나타나지 않았다(Nowicki et al., 2012).

지금까지 관찰된 실험에서 나타난 몇몇 결과들을 이용하여 특정 종에서의 성장의 영향을 설명하는 것은 가능하지만, 모든 어류에 적용하여 일반화 하기는 어렵다. Miller와 colleagues(2012)는 부모 개체가 경험한 이산화탄소 농도가 새끼의 성장에 영향을 미칠 수 있다는 결과를 보여 주었으며, 그 결과를 이용하여 초기생활사 성장 파라미터의 차이를 설명하였다. 또 다른 연구에서는, 성장은 체장, 체중, 비만도와 같은 최종 단계의 결과뿐만 아니라 다른 다양한 결과들과 함께 조사되어야 한다는 것을 보여준다. 감소된 RNA/DNA ratio(Franke et al., 2011), 증가된 cortisol, 감소된 혈액 P_{CO_2} , 증가된 혈청 글루코즈(Petochi et al., 2011)와 같은 다양한 실험 결과에서 볼 수 있는 것 처럼,

성장에 유의한 영향이 없을수도, 반대로 성장이 증가될 수도 있다.

성장과 마찬가지로, 발달(development)에 대한 측면을 평가하는 연구들 또한 다양한 결과들을 보여준다. 3,500 μatm CO_2 에 노출된 cobia와 1,200 μatm CO_2 에 노출된 Japanese ricefish를 포함한 몇몇 종에서는 이에 따른 발달의 지연이 나타났다(Bignami et al., 2013b; Tseng et al., 2013). 그러나 ricefish에서 나타난 발달 지연은 실험기간이 지남에 따라 보상작용(아미노산 이화작용 증가를 나타내는 결과로서)이 일어나 최종 체장 측정 결과에는 유의한 영향을 보이지 않았다. 또한, Cinnamon anemonefish를 9개월 동안 이산화탄소에 노출하더라도 만약 부모가 1,030 μatm CO_2 이상의 이산화탄소 농도에 노출되는 경험을 했을 경우, 배아에서부터 발달 기간의 길이 또는 부화체장에 아무런 변화가 나타나지 않는 결과를 볼 때, 부모의 노출에 의한 영향으로 발달 지연에 대한 약간의 보상현상이 나타나는 것 같아 보인다. 하지만 부화자어의 난황영역은 이산화탄소 노출에 의해 감소되는 것을 보여주었다(Miller et al., 2013). Orange clownfish 역시 마찬가지로 배 발생기간과 난황 크기에는 이산화탄소의 영향이 나타나지 않았으나, 이산화탄소에 노출된 경우 표층 부유시기가 종료될 때의 유생 체장은 증가하였다(Munday et al., 2009b).

또한, 일부 종에서는 이산화탄소 노출에 따른 발달 이상현상이 증가되는 결과가 관찰되기도 하였다. 이산화탄소에 민감한 inland silverside의 경우 960 μatm CO_2 에서 기형 발생빈도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Baumann et al., 2012). 또한 two-spotted goby(*Gobiusculus flavescens*)에서는 배 발달 기간

자체에는 차이가 없었음에도, 불구하고 발달 저해와 배아 역전 현상이 관찰되었다(Forsgren et al., 2013). 그리고 Frommel et al. (2012)은 대서양 대구의 성장 증가와 조직 손상이 동시에 나타났는데, 4,200 $\mu\text{atm CO}_2$ 에 노출된 대서양 대구 치어는 과다한 CO_2 노출에 따른 지방 합성량 증가와 조직의 손상이 부화 32일째에 관찰되었다. 비록 성장은 증가하였으나 조직의 손상이 나타난 것은 성장에서 기관 발달로 에너지 흐름을 적절하게 우회시키지 못한 결과인 것으로 보인다. 몇 가지 주목할만한 예외가 존재하긴 하지만, 지금까지 수행된 연구들을 기반으로 전체적인 흐름을 살펴보면, 어류의 발달은 이산화탄소 노출에 의해서 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그러므로 향후에 진행될 연구들은 발달하는 배아들에서 산-염기 조절 기구의 개체발생 타이밍을 상세하게 밝혀내어 발달에 미치는 이산화탄소 영향을 예측하고, 영향의 일반화를 정립하는데 도움을 줄 수 있는 방식으로 진행되어야 할 것이다(Tseng et al., 2013).

나. 생존

해양산성화가 어류의 사망에 영향을 미치고 있다는 연구결과는 매우 제한적이다. 온대 silverside를 이용한 연구에서 배아 시기에 이산화탄소에 노출되는 것이 사망에 중요하다는 사실이 나타났음에도 불구하고(Baumann et al., 2012), 온대 Baltic cod(Frommel et al., 2012), 온대 Atlantic herring(Franke et al.,

2011), 열대 orange crownfish(Munday et al., 2009b)를 포함하는 다른 종들에서는 초기생활사 시기의 노출에 대해 동일한 민감성이 나타나지 않았다. 배 발달 후기와 성어기에 대한 연구들은 상대적으로 앞의 두 연구들에 비해 더 낮은 민감도를 나타내지만, spiny damselfish(Munday et al., 2011b), 명태(Hurst et al., 2012), cobia(Bignami et al., 2013b), 대구(Frommel et al., 2012; Moran et al., 2011), three-spined stickleback(Jutfelt et al., 2013)를 포함하는 몇몇 종에 대한 연구에서는 역시 이산화탄소 농도 변화가 사망률에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 하지만, 이러한 실험은 종에 따라 달리 나타나는 넓은 이산화탄소 노출 내성 범위를 강조하기 위해서 여전히 중요하다. Baumann et al. (2012)의 연구에서는 inland silverside의 사망률이 부화 후에 이산화탄소에 노출되었을 때 보다 알 시기에서부터 노출되었을 경우 유의하게 증가하는 것으로 나타났다.

Ⅱ. 해수 이산화탄소 농도와 수온의 변화에 따른 넙치 유생의 생물학적 반응 연구

1. 서론

인류의 과도한 이산화탄소 배출로 인해 발생한 기후변화와 그로 인하여 생태계 전반에 걸쳐 나타나는 다양한 반응에 대한 연구들이 전 세계적으로 많이 진행되고 있다. 이러한 대기 이산화탄소 농도 증가로 인해 나타나는 다양한 환경변화 중 해양 생태계의 경우에는 해수온 상승과 pH 감소로 나타나는 영향이 대표적이다. 과거에는 자연적인 지구환경의 변화에 따른 생물의 반응은 장기간에 걸쳐 천천히 이루어져 왔으며, 생물이 적응할 수 있는 시간적 여유가 충분하였지만, 최근에 진행되고 있는 인간활동에 근거한 기후변화는 그 진행속도가 빨라 생물이 적응할 수 있는 시간이 절대적으로 부족하여 다양한 부정적인 영향들이 관측되고 있다(Lejeusne et al., 2010; Petitgas et al., 2013).

이러한 환경변화에 대한 실험실 내에서의 검증을 위한 다양한 실험들이 진행되고 있으며, 실험의 특수성으로 인해 정밀한 실험장치의 개발이 필요하다. 실제로 많은 산성화 관련 논문에서 확인할 수 있듯, 저자가 직접 고안한 실험장치를 이용하여 실험을 수행하고 있는 경우가 대부분이다(Gazeau et al., 2007;

Munday et al., 2009b; Hurst et al., 2012; Hoegh-Guldberg et al., 2007). 또한, 이러한 각각의 실험장치의 정밀도에 관한 문제가 최근에 와서 중요하게 인식되고 있으며 그리하여 최근의 산성화 관련 논문에서는 사육환경이 얼마나 일정하게 유지되었는가에 대한 증거를 반드시 제시하도록 되어있다(Hurst et al., 2012; Kim et al., 2015). 이는 대기 및 해수 내의 이산화탄소 농도를 일정하게 유지하는 것이 어렵고 그 유지 방법이 고도의 기술을 요구하기 때문이며, 최소한의 오차 및 편차를 가지는 사육장치의 개발이 해양산성화 실험의 성패를 좌우하는 중요한 요인이 되고 있다(Munday et al 2009b; McGraw et al., 2010; Fangue et al., 2010).

본 논문에서는 실내에서 산성화 및 온난화 환경을 재현할 수 있는 실험장치를 제작하여 단순하면서도 정확도 높은 결과를 얻을 수 있는 장치의 개발을 통해 해양의 변화에 대한 어류의 반응을 연구하였다. 특히, 어류의 여러 생활사 단계 중에서도 초기생활사 시기에 집중된 연구를 수행하였는데 그 이유는, 일반적으로 해양생물의 경우 치어기(juvenile stage)나 성어기(adult stage)에 비해서 알이나 유생시기(egg and larval stage)가 환경의 변화에 더 취약한 것으로 알려져 있기 때문이다. 이는 해양산성화나 해수온 상승과 같은 환경변화에도 동일하게 적용되는 것으로, 치어기나 성어기의 물고기들은 알이나 유생에 비해 산-염기 조절능력과 가스교환 시스템이 매우 발달해 있기 때문에, 환경이 산성화로 인해 변화될 경우 그들이 가지고 있는 능력을 이용하여 그 영향을 상쇄시킬 수 있다(Melzner et al., 2009b). 예를 들어, 경골어류는

일반적으로는 체내의 pH가 외부의 영향에 의해 감소되면 즉시 중탄산 이온 (HCO_3^-)의 분비를 통해 수소이온 농도를 감소시켜 혈액의 pH 감소를 상쇄시키는 등의 항상성 기작을 나타내게 된다. 하지만 알과 유생은 그러한 조절능력이 완전히 갖추어지지 않은 상태이기 때문에 환경변화에 더 민감하게 반응하게 되는 것이다(Ishimatsu et al., 2008).

본 연구에서는 어류가 가지는 생태학적, 산업적 중요성에 입각하여, 어류 중 현재 상업적 어업과 양식업에서 많이 이용되고 있는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 실험어종으로 선택하여 산성화 및 온난화의 영향을 연구하였다. 넙치의 초기생활사 시기의 성장과 생존, 부화율 등이 수온과 산성도의 영향에 의하여 어떻게 변화하는지 확인하여 넙치 유생이 해양산성화에 대해 어떠한 생태학적, 생리학적 반응을 나타내는지 조사하고, 그 연구결과를 바탕으로 향후 기후변화에 대비한 미래 수산, 양식업의 대응방안을 마련하는 기초자료로 활용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 실험 대상종

본 연구에서는 해양산성화와 온난화의 영향을 살펴보기 위해 넙치를 이용하여 사육실험을 수행하였다. 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 가자미목(Pleuronectiformes) 넙치과(Paralichthyidae) 넙치속(*Paralichthys*)에 속하는 어류로 우리나라에 서식하는 주요 종을 보면 넙치, 별넙치(*Orhombus cinnamomeus*) 및 풀넙치(*Citharoides macrolepidotus*) 외 4종이 있고, 전 세계에 22종이 있다. 넙치는 우리나라 전 연안, 쿠릴열도, 사할린, 일본 및 발해, 황해, 중국해 연안에 분포하며(정, 1986), 넙치류 중에서 가장 대형이고, 암컷의 성장이 수컷보다 빠르다(손 등, 2006). 넙치는 저서성 어류로서 체형이 납작하여 그 형태가 특이한데, 특히 다른 어류와의 차이점은 두 눈이 머리의 한쪽 방향으로 몰려있다는 것이다. 이러한 형태는 넙치 이외에도 가자미류에서도 나타나는 현상으로 두 종의 형태적 특징만으로는 구분하는 것이 어렵지만, 어류의 유영 진행방향(꼬리에서 두부방향)으로 볼 때, 넙치는 눈이 왼쪽으로 몰려 있고, 가자미는 오른쪽으로 몰려 있는 것이 차이점이다(손 등, 2006). 넙치는 주로 해저면에 서식하며, 주위 환경에 맞춰 보호색을 띤다. 또한 이들은 광염성(27.7~35.7 psu) 어류로서 수온, 수심감소 등에 따른 스트레스가 적은

것으로 보고되고 있는데, 이를 통해 넙치는 다른 어류에 비해 스트레스에 대한 운동성 및 생리, 생태학적으로 종 특이성을 갖는다(허 등, 2003). 또한 넙치는 일반적으로 수심이 220m 정도 되는 해저에 서식하나, 산란기에는 20~70m 정도의 얕은곳으로 이동한다고 알려져 있다. 서식 온도는 일반적인 성어의 경우 10~27°C 범위이며, 수온 10°C 이하와 27°C 이상에서는 거의 먹이를 섭취하지 않는다(옥, 2007). 자연산란은 보통 5~6월에 이루어지며 최근에는 양식기술 및 친어관리 기술의 발달로 인공 종묘 생산이 연중 이루어지고 있다. 알의 종류는 분리 부성난이며, 난경은 0.94~0.98mm 전후이고 유구는 1개이다. 수온에 따라 부화에 소요되는 시간에는 차이가 있으며, 18~20°C에서 약 48시간이 소요된다. 부화된 어린 자어는 10일 전후로 머리 뒤쪽의 등 부분에 돌기가 생기기 시작하고, 20일경에는 6개의 긴 가시로 자라는데, 그 중 4~5째 가시가 특히 길다. 사육수온이 18°C 전후일 때, 부화 후 약 30일 정도에서 체장 11mm 정도로 자라게 되며, 좌우 상칭형이 변형되면서 오른쪽 눈이 머리의 등 뒷선을 따라 왼쪽으로 옮겨 가는 변태(metamorphosis)가 진행된다. 부화 후 약 35일 정도가 되면 체장이 약 14mm 로 자라고 변태가 완료된다(한과 김, 1997). 일반적으로 넙치양식장에서는 착저기 이전까지 사육환경을 수온 17~22°C, 염분 27.7~35.7 psu, pH 7.7~8.42로 유지하고 있으며 먹이공급, 환수량 등에 따라 환경조건을 조금씩 조절한다(손 등, 2006).

2) 넙치 사육실험장치

가. 실험장치 개발

최근에 진행된 해양산성화 영향 실험에서 이산화탄소 농도 조절 방법으로 주로 사용하는 두 가지는 다음과 같이 요약할 수 있다. 첫째, 기체 이산화탄소를 포화상태로 녹인 해수와 자연상태의 해수를 적절한 비로 혼합하여 목표하는 해수의 pH를 만들고 이 해수를 이용하여 사육실험을 진행하는 것이다. 이와 동시에 pH 이외의 해수 용존 이산화탄소 계산을 위한 수치(Total Alkalinity, 수온 등)도 함께 측정하여 계산식을 이용하여 계산된 이산화탄소 농도를 참고로 하여 사육해수 내의 이산화탄소 농도를 조절하는 방법과, 둘째, 목표하는 이산화탄소 농도를 가지는 혼합기체를 MFC(Mass Flow Controller)를 이용하여 제조한 후 이 기체를 직접 해수에 주입하여 해수의 이산화탄소 농도를 조절하는 방법이다. 첫번째 방법의 경우 실시간으로 해수의 pH를 분광광도계(Spectrophotometer)를 이용하여 측정함으로써 사육수의 pH를 0.001단위까지 정말하게 측정하는 것이 가능하지만 기기의 운용을 위한 노력 및 비용적인 측면에서 효율이 좋지 않다는 단점이 있었다. 반면에 두번째 방법에서는 실험장치 자체의 설계는 복잡하지만 운용을 위한 노력이 첫번째 방법에 비해

적게 들고, 비용적인 측면에서도 한번 실험장치가 완성되고 나면 유지, 보수에 큰 비용이 들지 않는다는 장점을 가지고 있었다.

본 실험에서 사용된 실험장치는 원하는 혼합기체 농도를 MFC를 이용하여 제조하고 제어된 이산화탄소 농도와 수온을 가지고 해양산성화와 지구온난화에 대한 실험을 실내에서 수행할 수 있도록 제작되었다. Fanguet al.(2010)의 논문을 참고하여 실험장치의 개념도를 작성하고(Fig. 1), 이와 같은 기본 개념도를 바탕으로 하여 좀 더 구체적인 실험장치를 설계하였다(Fig. 2). 설계도에 나타나는 각 실험장치별 상세 설명은 <Appendix 1>에 수록하였다.

이산화탄소 농도를 일정하게 유지하기 위한 장치를 설계할 때 가장 중요하게 생각해야 하는 부분은 실험에서 설정한 농도가 큰 변화 없이 일정하게 유지될 수 있도록 하는 것이다. 그리하여 아주 미세한 기체의 흐름을 제어하여 기체의 농도를 조절할 수 있는 장치인 Gas MFC(KOKLOK Co., Model 3660 Series, Japan, 0-10ml/min flow)를 사용하여 고순도 이산화탄소의 흐름을 제어하였다. 원하는 이산화탄소 농도를 임의로 조성하기 위해 soda lime을 이용하여 대기 중의 일반 공기에서 이산화탄소와 수분을 제거하였으며, MFC를 이용하여 고순도 이산화탄소(99.9% CO₂)를 mixing chamber에 5.5L/min씩 지속적으로 주입하였다.

계산식을 이용하여 3 개의 원하는 이산화탄소 농도(400, 850, 1550 ppm CO₂)를 만들었으며, 본 논문에서는 세 농도를 대조구(control, 400 ppm), 중간농도

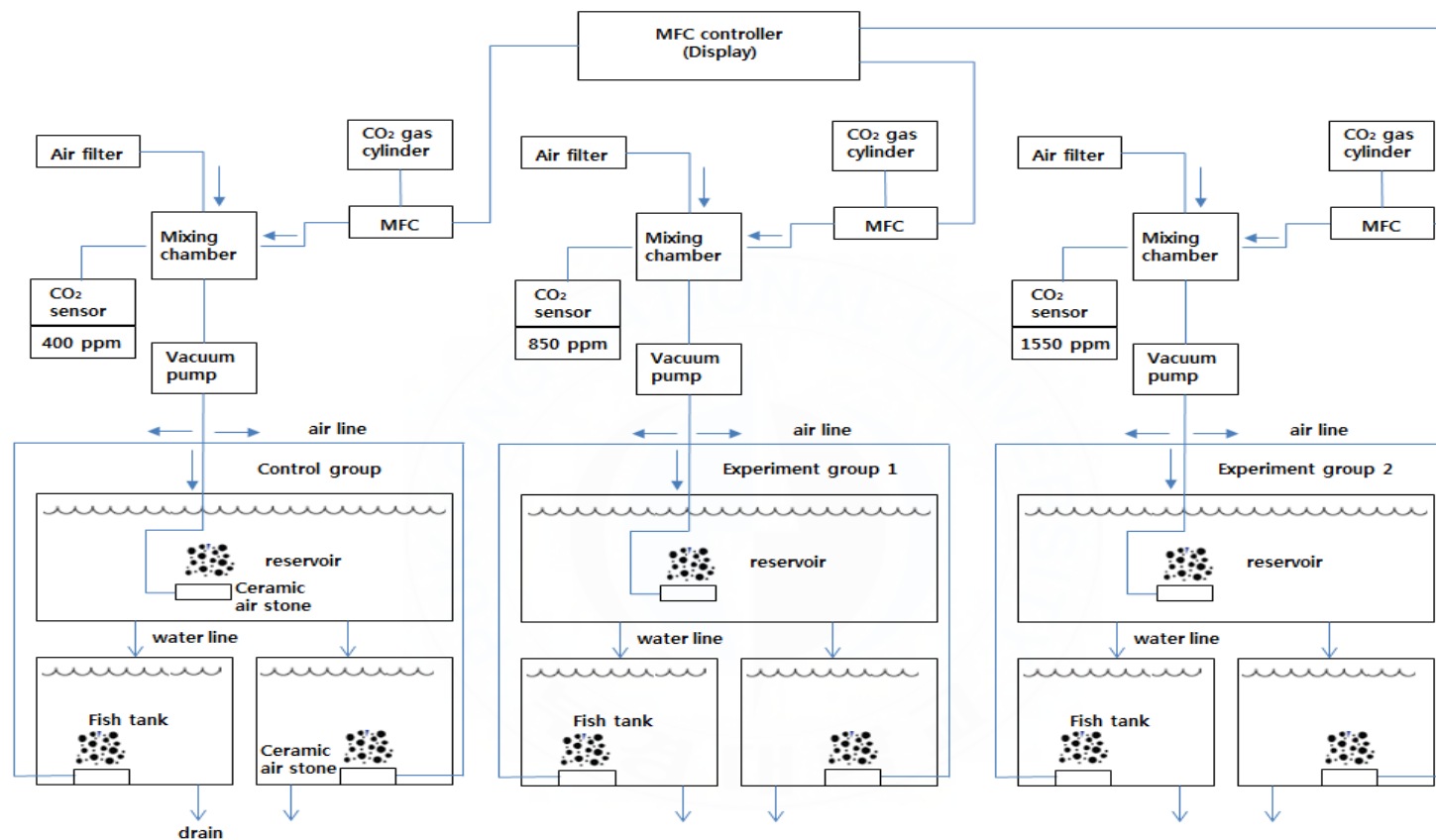


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental system for this study.

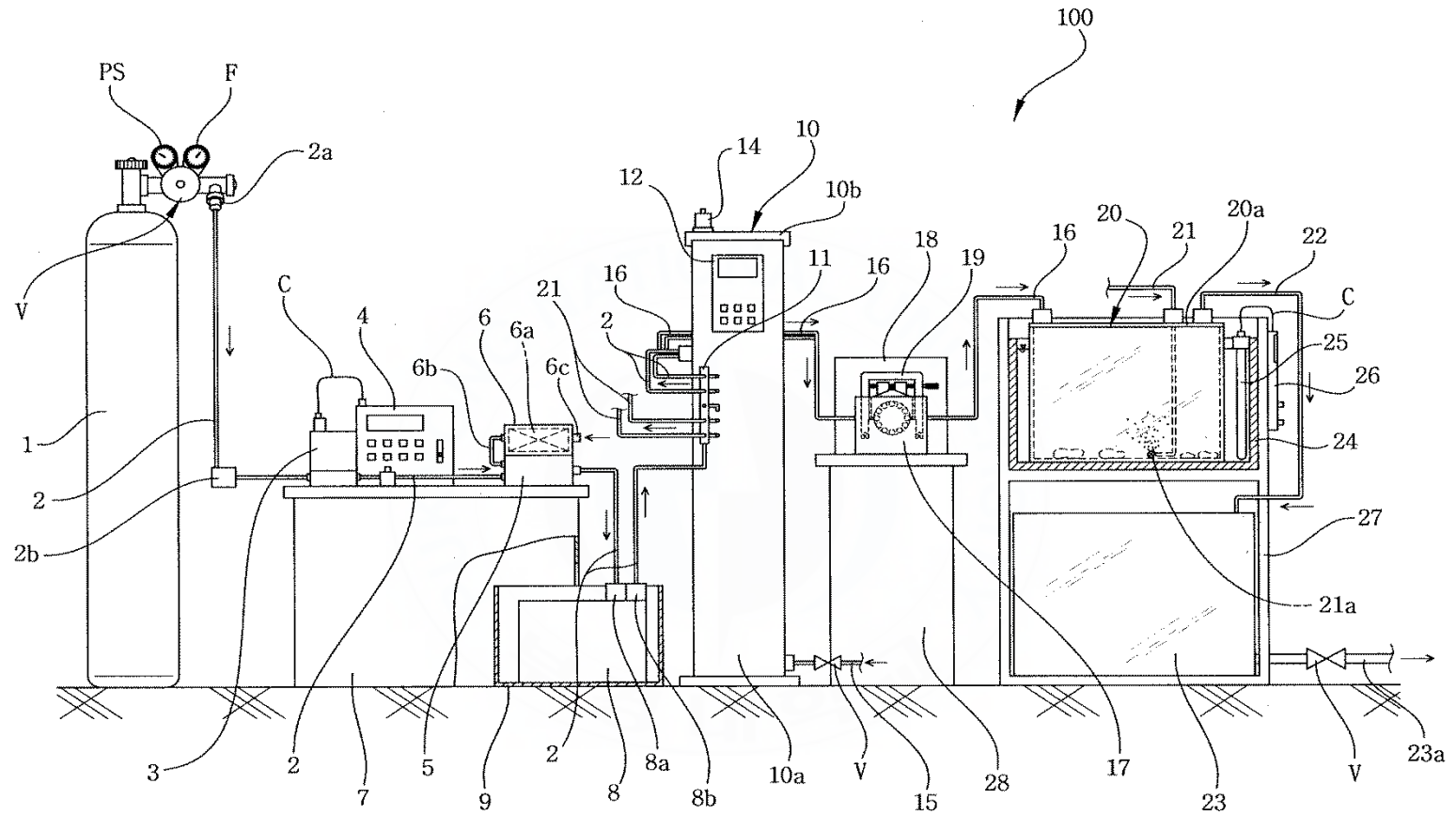


Fig. 2. Experimental system designed for the effects of acidification and warming on fish larvae. Part names indicated by number are shown in appendix 1.

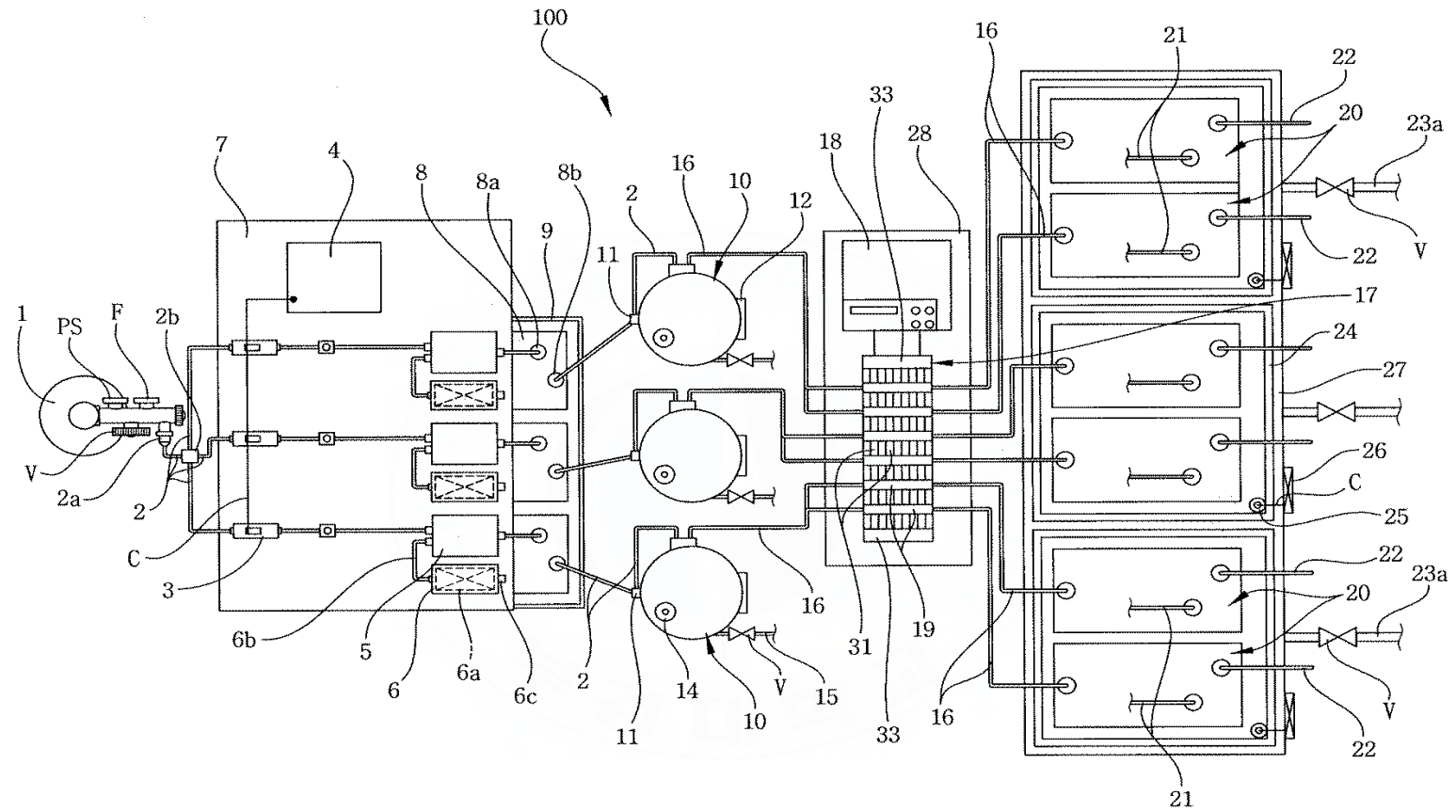


Fig. 2. (Continued).

(medium, 850 ppm), 고농도(high, 1550 ppm)로 표기하였다. 이렇게 만들어진 3가지 이산화탄소 농도의 공기는 진공 펌프(KnF Co., N86KT18. France)를 이용하여 해수로 가득 채워진 해수 저장수조(reservoir)와 사육수조 (aquaria)에 각각 가스 상태로 공급되었다. 공급된 공기는 미세 에어스톤을 통해 해수로 녹아들어가 해수의 이산화탄소 농도가 조절되도록 하였다. 해수 저장수조는 인위적으로 공급되는 공기 이외의 실내 공기와 같은 외부 환경에 의한 교란을 방지하기 위해서 밀폐형으로 제작되었으며, 내부에서 압력에 의해 여분의 공기는 배출되면서 외부의 공기는 유입되지 않도록 역류방지밸브를 설치하였다. 또한 저장수조의 내부에 이산화탄소 센서(SOHA Tech., SH-VT250, Korea, 0~3000 ppm/1 ppm CO₂)를 부착하여 저장수조 내부의 대기 이산화탄소 농도를 외부에 부착된 display/controller를 통해 실시간으로 확인할 수 있도록 했다. 또한, mixing chamber내의 혼합 기체는 저장수조뿐만 아니라 사육수조에도 연속적으로 공급될 수 있도록 장치하였다. 이는 사육수의 지속적인 교환만으로는 부족할 수 있는 사육수조 내부의 산소 공급을 원활하게 하기 위한 조치이다. 그리고 저장수조 내 해수는 유체정량펌프(Masterflex, L/S Cartridge pump systems, USA, 10~50ml/min flow)및 유체수송용 실리콘 튜브(Saint-Gobain, tygon tubing, USA, inner 2.38mm)를 이용하여 시간당 1000ml 의 해수가 교환될 수 있도록 조절하였다. 또한 정량펌프를 통해 해수가 주입되고 배출됨과 동시에 사육수조 내의 각종 유기물(유생이 배출한 노폐물, 먹고 남은 먹이 등)도 함께 배출될 수 있도록 사육수조의 하단에 배출구를 설치하였

고 배출구를 통한 유생의 유실방지를 위해 배출구 부분에 망목 1mm 의 그물망을 부착하였다. 또한, 사육수조에도 밀폐식 뚜껑을 설치하여 외부 대기와 사육수 사이의 기체교환이 최소화될 수 있도록 하였으며, 뚜껑에는 저장수조와 마찬가지로 역류방지 밸브를 설치하여 사육수조 내부의 여분의 공기는 배출되면서, 외부의 공기는 유입될 수 없도록 설계하였다. 또한 사육수조의 사면을 검은색으로 처리하여 야간에 실험을 수행하면서 발생할 수 있는 빛에 의한 교란 등의 사육생물에 미칠 수 있는 영향을 최소화하였다. 또한, 수온구배를 두기 위하여 동일한 이산화탄소 농도의 사육수조 2개를 각각 별도의 대형 수조에 집어넣고 대형 수조 내부를 물로 채운 후 그 속에 히터와 온도조절장치(OKE, OKE-6422, Korea, 0~80°C/0.5°C)를 설치하여 본 실험에서 요구하는 온도가 유지될 수 있도록 설정하였다. 히터를 사육수조의 외부에 설치한 이유는 직접적인 가열 방식으로 인해 유생이 받을 수 있는 피해를 최소화 하며, 급격한 온도변화를 간접적 가열방식을 통해 방지할 수 있기 때문이다.

나. 실험장치 검증

실험장치를 위의 내용대로 설계한 이후에 실험장치의 정확도 및 정밀도를 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 2주간 실시하였다.

우선, 생물을 사육하지 않는 상태에서 실험장치를 운전하며 하루에 5번씩 저장수조 및 사육수조의 pH를 pH meter(Thermo Scientific Orion, 5 star-pH meter with DO sensor, USA)를 이용하여 측정하였다. 그리고 저장수조 내부의 대기 이산화탄소 농도를 CO₂ sensor를 이용하여 pH측정과 동일하게 하루 5회 실시하였다. 그리고 하루에 1번씩 사육수조 내부의 해수를 채수하여 해수 내부의 ρ CO₂ 측정에 필요한 각종 수치들(Total Alkalinity, pH, Salinity, Temperature)을 측정할 샘플을 수집하였다. 샘플로 채수된 해수는 우선 pH, Salinity, Temperature를 측정한 후 100ml 용량의 유리 광구병에 가득 채워넣었다. 이렇게 해수로 채워진 광구병 내부에 포화 상태의 염화수은(HgCl₂)용액 0.05ml 을 넣어 세균과 같은 생물의 활동을 정지시켰다. 이렇게 채수된 해수 샘플은 2주간의 예비실험이 종료된 후 개방형 용기 적정법을 이용하여 Total Alkalinity를 측정하였으며, Dr. Andrew G. Dickson(Scripps Institute of Oceanography, University of California, San Diego, USA)실험실에서 제작한 표준물질(reference materials)로 검정하였다. 해수 탄소계 인자 중 총용존 무기탄소와 이산화탄소는 실험실에서 측정한 pH와 Total Alkalinity를 이용하여 CO₂SYS 프로그램(<http://cdiac.ornl.gov/ftp/co2sys>, Pierrot and Wallace, 2006)으로 계산하였다.

두번째 예비 실험으로 사육수조 내부에 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 유생을 넣고 실제로 사육하면서 내부 총질소 농도의 변화를 측정하였다. 이를 위해 3일에 1회 사육수조 내부의 해수를 500ml 씩 채수하여 해수 내부에 5ml 의

질산(HNO_3)를 넣어 고정시켰다. 이렇게 채수된 해수는 즉시 -24°C 의 냉동고에 보관되었다. 이렇게 보관된 해수 샘플은 2주간의 실험 종료 후, 전처리를 거친 후 흡광광도법을 이용하여 총질소(TN)를 분석하였다.

이러한 예비실험을 마친 후, 본 실험은 2013년 7~10월에 걸쳐 총 3회 반복 수행되었으며, 실험 1회 당 4주간의 사육기간 동안 3구배의 이산화탄소 농도(400, 850, 1550 ppm) 및 2구배 수온(18°C , 22°C)에서 넙치를 수정란 단계에서 변태기까지 사육하면서 다양한 실험을 수행하였다(Table 4).

넙치의 수정란은 총 12개의 20L 수조에 수조당 800개씩 수용하였다. 최초 수정란 수용온도는 21°C 로 유지되었으며 배체 발생 후에 대형 수조에서 사육 수조로 옮겨졌다. 이는 배체 발생 전에는 수정란이 죽어 사란이 될 확률이 높기 때문에 사육수의 수질 유지 및 각 수조별 사란 발생으로 인한 오차를 최소화 하기 위함이다. 사육수조에 수용 후 12시간 경과 후부터 부화가 시작되어 만 24시간 후에는 모든 수정란이 부화되었다. 부화 후 2일부터 농축 *Chlorella* (*Chlorella* spp., Chloland. Co., Ltd., Power-Chlo, Korea)를 사육수의 색이 약한 연두빛으로 보일 정도로 풀어주었다. 이는 빛의 투과율 조절과 동시에 부화자어가 강한 광선에 의해 받을 수 있는 나쁜 영향을 최소화하기 위해서이다. 또한, 향후 먹이생물로 투입될 Rotifer가 *Chlorella*를 먹이로 사용하여 사육수조에 투입된 후에도 먹이활동을 계속 하며 생존할 수 있도록 하기 위한 이유도 있다(손 등, 2006). 부화 2일 후에는 Rotifer(*Brachionus rotunditormis*)를 먹이로 공급하였다. Rotifer 공급량은 넙치가 성장함에 따라

점점 증가시켰으며, 초기에는 Rotifer를 1일 3회 공급하면서 2~4마리/ml 로 밀도가 유지될 수 있도록 하였고, 부화 후 18일경에는 12마리 이상/ml 로 유지하였다. 부화 후 18일 경과 후부터는 Rotifer를 Brine shrimp의 nauplius와 함께 혼합 급이 하다가 부화 20일 경과 후부터는 Brine shrimp만을 급이 하였으며 이 시기 동안은 부화 후 18일에 사육수 내에 nauplius를 0.1~1마리/ml 밀도로 공급하면서 시간이 지남에 따라 점차 공급량을 증가시켜 부화 후 25일 경에는 3마리 이상/ml 밀도로 nauplius를 공급하였다. 25일 경과 후부터는 자치어용 초미립자 배합사료를 nauplius와 혼합 급이 하였다. 또한 광주기는 사육기간 동안 계속해서 14L:10D로 조절되었다. <Table 4>는 본 실험이 진행되는 동안 조절된 외부 환경요인, 즉 이산화탄소 농도, pH, 수온, 염분에 대한 평균값과 분산 정보를 보여주고 있다.

Table 4. Information on rearing conditions for olive flounder larvae, June-September, 2013. Values indicate mean±SD (n=28)

	Period	CO ₂ concentration (ppm)	pH_{NBS}	Temperature (°C)	Salinity
1st. exp.	June 11 - July 8	400±25(Control)	8.04±0.03	22±0.5/18±0.5	32.5±0.1
		850±30(Medium)	7.83±0.05	22±0.5/18±0.5	32.4±0.1
		1550±30(High)	7.63±0.06	22±0.5/18±0.5	32.2±0.1
2nd. exp.	July 10 - August 6	400±25(Control)	8.04±0.03	22±0.5/18±0.5	32.5±0.1
		850±30(Medium)	7.83±0.05	22±0.5/18±0.5	32.4±0.1
		1550±30(High)	7.63±0.06	22±0.5/18±0.5	32.2±0.1
3rd. exp.	August 16 - September 13	400±25(Control)	8.04±0.03	22±0.5/18±0.5	32.5±0.1
		850±30(Medium)	7.83±0.05	22±0.5/18±0.5	32.4±0.1
		1550±30(High)	7.63±0.06	22±0.5/18±0.5	32.2±0.1

3) 생물학적 파라미터

가. 부화율과 생존율

본 실험에서 사용된 사육 수조의 크기가 커서 수정란 및 사란의 정확한 계수에 어려움이 많고, 조사에 시간이 많이 걸리는 단점을 가지고 있기 때문에, 대기 이산화탄소 농도 변화에 따른 넙치 수정란의 부화율과 생존율 변화를 확인하기 위한 수조를 아래와 같이 별도로 제작하였다. 수정란 상태에서는 운동성이 없기 때문에 많은 공간이 필요하지 않아 100ml 용량의 작은 밀폐용기를 준비하였다. 용기의 뚜껑 부위에 구멍을 2개 뚫어 하나는 공기가 공급되는 관을 연결하고 다른 구멍 하나에는 역류방지 밸브를 설치한 관을 연결하여 내부의 공기는 빠져나가고 외부의 공기는 유입되지 않도록 장치하였다. 이렇게 제작된 장치에 여과해수를 용기의 2/3가량 채운 후, 각 용기당 수정란 100개체를 수용하였다. 이후 매일 아침과 저녁 2회에 걸쳐 바닥에 가라앉은 사란을 수거하여 계수하였으며, 그 수치를 이용하여 각 이산화탄소 농도별 (400, 850, 1550 ppm CO₂)로 나타나는 부화율을 조사하였다. 부화율 측정에 사용된 수치는 해당 수조에서 모든 수정란이 부화할 때까지 측정된 수치만 사용하였다. 본 실험은 3반복(three replicate) 실험을 월별로 3회 실시하여 그

결과를 확인하였다. 결과를 확인하기 위해 실험 시작시에 넣은 수정란의 개수와 부화하지 못하고 죽은 사란의 개수를 이용하여 부화율을 계산해 내었다. 부화율을 구하는데 사용된 수식은 다음과 같다.

$$H(\%) = \frac{(I-D)}{I} \times 100$$

(H : hatching rate, I : initial number of fertilized eggs, D : Dead number of fertilized eggs)

생존율 추정의 경우, 정확한 실험결과를 얻기 위해 생존율 측정 기간 동안에 먹이를 공급하지 않았다. 본 실험은 3반복(three replicate) 실험을 월별로 3회 실시하였으며 1회 실험당 4~8일이 소요되었다. 결과를 확인하기 위해 처음에 실험 시작시에 넣은 알의 개수에서 부화하기 전에 죽은 알의 숫자를 제외한 후(=부화된 개체수) 매일의 측정 결과간의 비를 이용하여 생존율을 계산하였으며 계산식은 아래와 같이 작성되었으며 이 계산식을 이용하여 각 배치별로 생존율을 측정한 후 통계학적 유의성을 검증하였다.

$$S(\%) = \frac{(H-D)}{H} \times 100$$

(S : survival rate, H : hatched number of larvae, D : Dead number of larvae)

나. 성장지표

28일간의 사육실험 종료 후, 생존개체 전량을 채집하여 체장 및 체중을 측정하였다. 체장분석은 채집된 모든 개체를 얼음으로 마취한 후 실체현미경 (Discovery V8, Carl Zeiss Co., Germany)을 이용하여 관찰 후, 현미경에 연결된 카메라((ICC 1, Carl Zeiss Co., Germany))로 유생의 전체 모습을 촬영하였다. 이렇게 촬영된 유생사진은 이미지 분석 프로그램(Axiovision 4.7, Carl Zeiss Co., Germany)을 이용하여 유생 체장의 0.01mm 단위까지 측정되었다.

체중분석에는 분석의 용의성을 위해 PCR micro tube가 사용되었다. 우선, 체중분석에 사용될 모든 tube에 번호를 매긴 후, 각 tube의 무게를 측정하여 야장에 기록하고 번호가 메겨진 tube 하나당 넙치 유생을 한마리씩 수용하였다. 이때, 유생에 묻어있는 물기를 최대한 제거하여 체중 측정오차를 최소화했다. 유생을 tube에 넣은 후 전자저울(AB204-S, Mettler Toledo Co., Switzerland)을 이용하여 0.1mg 단위까지 무게를 측정하였다. 이렇게 micro tube와 넙치 유생 무게가 더해진 값에서 미리 유생을 넣기 전에 측정된 tube의 무게를 뺀 값을 사용하여 순수한 유생의 무게를 구하였다. 이렇게 측정된 체장 및 체중의 결과치는 one-way ANOVA 및 two-way ANOVA를 이용하여 통계학적 유의성을 검정하였다.

또한, 성장률 측정을 위해 사육 실험중인 수조에서 3~10일 간격으로 샘플로 사용할 넙치의 유생을 각 실험구당 5~10마리씩 채집하였다. 채집된 넙치의 유생은 실체현미경(Discovery V8, Carl Zeiss Co., Germany)을 이용하여 관찰 후 현미경에 장착된 카메라(ICC 1, Carl Zeiss Co., Germany)를 이용하여 사진을 촬영하였다. 이렇게 촬영된 사진은 이미지 분석 프로그램(Axiovision 4.7, Carl Zeiss Co., Germany)을 통해 샘플의 전장을 측정한 후 체장-일령에 따른 성장률을 조사하였다. 성장률 분석은 부화에서부터 실험이 종료되는 시점까지 수집된 체장 데이터를 이용하여 선형 성장식을 도출하여 각 실험 조건별로 비교하였다. 실험구 간의 성장률의 차이에 대한 통계학적 유의성을 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA)를 실시하였으며 통계 프로그램으로는 SPSS 23을 사용하였고 사후분석(Post-hoc Analysis)을 위해 일반적으로 많이 사용되는 사후분석방법인 Bonferroni법을 사용하였다.

또한 측정한 넙치의 체장 및 체중결과를 활용하여 넙치 유생의 비만도를 계산하여 그 차이를 비교하였다. 비만도는 넙치 유생의 체장에 대한 체중비를 이용하여 계산하는데 다음과 같은 공식을 이용하였으나(Froese, 2006), 기존의 공식은 성체를 대상으로 사용하는 것이기 때문에, 본 실험에서 사용된 공식은 약간의 변형이 이루어졌다. 그리고, 비만도 또한 결과 분석을 위해 통계처리가 이루어졌다(one-way ANOVA 및 two-way ANOVA).

$$K = \frac{W}{L^3} \times 100$$

(K= condition factor, W= weight(gram), L= length(cm))

4) 조직 및 골격분석

가. 조직

이산화탄소 농도 증가와 조직 이상현상 출현과의 상관관계를 밝히기 위해 기존에 비슷한 내용을 병리조직학(Histopathology)적 관점에서 다룬 몇 가지 논문들을 참고하였으며 (Chambers et al., 2014; Frommel et al., 2012; Hadi et al., 2012), 7, 8, 9월 3회에 걸쳐 각각 4주간 사육한 넙치 유생 샘플을 무작위로 선정하여 각 실험구별로 눈, 신장, 간, 아가미, 장, 근육등에 대한 조직절편을 제작하였다. 우선 포르말린으로 고정한 넙치 유생 샘플을 48시간 동안 흐르는 물로 수세한 후 tissue processor를 이용하여 dehydration 과정 및 embedding 과정을 embedding process를 자동화로 수행하였다. 이후 파라핀에 molding 시킨 어체를 microtome을 이용하여 두께 4 μ m 로 whole body section한 후 슬라이드글라스에 부착시켜 Mayem's hematoxylin-eosin(H x E) 비교 염색법을 이용하여 조직 절편을 제작하였다. 제작된 슬라이드는 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 조직관찰을 통해 이상이 발견된 부

위는 현미경에 장착된 카메라(Moticam Pro205, Motic, Taiwan)을 이용하여 촬영 후 이상부위를 표시하여 정상 조직과 비교하였다.

나. 골격

골격 분석은 2가지 방법을 이용하여 수행되었다. 첫째, 주사전자현미경 (Scanning Electronic Microscope, SEM) 을 이용하여 넙치 유생의 척추골 표면을 촬영한 사진을 비교하였다. 둘째, 어류의 이중 골격 염색법(skeleton double stain method)을 활용하여 전체 골격을 관찰하면서 골격의 이상을 확인하였다. 주사전자현미경을 이용한 골격 분석 방법은 다음과 같은 순서로 진행되었다.

- (1) 넙치의 척추골을 살과 분리하기 위해, 실체현미경 아래에서 전자 핀셋 (Super fine tweezer)과 미세 해부침(fine needle)을 이용하여 척추골을 분리해 내었다.
- (2) 이렇게 살과 분리된 척추골은 여분의 단백질성 이물질 제거 및 탈회작업을 위해 1% KOH용액에 24시간 가량 침지시켰다.
- (3) 탈회과정이 끝난 후, 전자현미경용 생물시료 전처리 고정액을 사용하여 시료를 고정하였다. 고정 방법은 2% Glutaraldehyde 용액에서 2시간, 1% Osmium tetroxide 용액에서 2시간의 순서로 고정하였다.

(4) 고정이 끝난 시료는 진공 동결 건조기에 넣고 건조를 시킨 후, 탄소 테이프(Carbon Tape)를 이용하여 금속으로 만들어진 전자현미경 촬영판에 고정을 시켰다.

(5) 단단하게 고정을 시킨 후 Osmium 입자 코팅기(WO-001, Meiwafoysis Co., Japan)로 표면을 코팅한 시료를 저진공주사전자현미경(Low Vacuum Scanning Electron Microscope)(JSM-6490LV & MONO CL3+, JEOL & GATAN, Japan & U.K)에 넣고 촬영하였다.

촬영용 시료 분리 및 전처리는 실험실에서, Osmium 입자 코팅 및 전자현미경 촬영은 부경대학교 공동실험실습관에서 진행되었다. 촬영은 각 시료별로 다수의 사진을 찍은 후 육안으로 선명하게 구분이 가능한 사진을 선택하여 분석에 사용하였으며 각 실험 그룹별로 7개의 사진을 선택한 후 각 사진별로 3번의 골밀도 계산을 위한 측정을 한 후 그 평균값을 이용하여 통계분석을 실시하였다.

골밀도 측정에는 Image J 분석 프로그램을 사용하였으며, 실제 골밀도의 감소를 수치로 표현하기 위해 Gutowska et al(2010)의 방법을 변형하여 척추골의 골밀도를 계산하였다. 전체 촬영 사진에서 골밀도의 감소로 보이는 골격이 거칠어진 부분의 면적을 측정하여 전체 사진의 pixel에서 비율로 표현한 값을 골밀도 측정치로 나타내었다.

골격 이상현상을 구분하기 위하여 다수의 논문을 참고하였으며, 넓치의 골격이상을 관찰하기 위해 이중 염색을 실시하였다. 우선 10% 포르말린에 고정

된 샘플을 24시간동안 세척하여 포르말린을 제거하였다. 세척이 끝난 후 멜라닌 색소 제거를 위해 표피를 핀셋을 이용하여 벗겨내고, 에탄올을 이용하여 탈수를 실시하였다. 탈수는 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 에탄올에 각각 24시간씩 침지하여 샘플내의 수분이 완벽하게 제거될 수 있도록 하였으며 탈수가 완전히 끝난 샘플은 염색시약을 이용하여 24시간 염색하였다. 염색 시약으로는 Alcian blue 와 Alizalin Red S 가 사용되었는데 각각 연골과 경골을 파란색과 빨간색으로 염색시키는 작용을 하는 시약이다. 염색용 시약에 침지하고 24시간 경과 후 1%KOH + 0.85%NaCl 혼합액을 이용하여 조직의 투명화를 수행하였다. 조직의 투명화는 위의 혼합액을 24시간마다 교체하면서 조직이 투명하게 변하여 내부에 있는 골격이 그대로 관찰될 수 있을 때까지 실시되었는데 평균적으로 5일 가량 경과 후 투명화가 완료되었다. 투명화가 완료된 샘플은 추가적인 조직의 용해를 막기 위해 순수한 글리세린에 침지되었으며 투명화 표본의 부패를 막기 위해 방부제로 사용되는 티몰을 소량 첨가하였다. 이렇게 보존처리된 샘플을 실체현미경(Discovery V8, Carl Zeiss Co., Germany)을 이용하여 관찰하면서 골격 이상을 확인하였다. 각 실험구별로 5마리의 샘플을 무작위로 추출하여 분석이 진행되었으며, 어체 전체를 관찰하면서 이상이 나타난 부위를 카메라(ICC 1, Carl Zeiss Co., Germany)를 이용하여 촬영하였다. 모든 샘플의 관찰이 끝난 후 촬영된 사진을 바탕으로 통계분석 및 골격 이상의 종류를 구분하는 작업을 수행하였다.

다. 이석성장

사육환경의 수온과 이산화탄소 농도가 이석의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 2차 실험에서 사육된 넙치 유생의 이석을 다음과 같은 방법으로 분석하였다. 첫째, 각기 다른 이산화탄소 및 수온 환경에서 4주간 사육된 넙치의 유생을 실험구별로 6마리씩 추출하였다. 이때, 다양한 외부적 요인에 의한 오차를 최소화 하기 위해 비슷한 체장(12~13mm)을 가지는 유생들만 선택하였으며, 각 개체의 체장은 실체현미경(Discovery V8, Carl Zeiss Co., Germany) 및 카메라(ICC 1, Carl Zeiss Co., Germany)를 이용하여 0.01mm 단위까지 측정되었다. 체장 측정이 완료된 후에는 각 개체의 이석을 추출하는 작업을 수행하였다. 일반적으로 어류는 평형감각기관인 내이(inner ear)내부에 소낭(sacculus), 통낭(utricle) 그리고 호(lagena)가 존재하며, 이 속에는 편평석(sagitta), 역석(lapillus), 성상석(asteriscus) 3종류의 이석이 존재하는데 이 중 sagitta의 크기가 가장 크기 때문에 본 실험에서도 sagitta를 분석에 사용하였다. 이석 추출을 위해 우선 넙치 유생을 petri dish에 넣고 약간의 증류수를 첨가하여 어체가 물 속에 잠길 수 있도록 한 후, 실체현미경(Discovery V8, Carl Zeiss Co., Germany)의 최대 배율에서 관찰하면서 넙치의 두부에 위치하고 있는 내이를 분리하였다. 이렇게 분리된 내이는 낭상형으로 쉽게 구분이 가능하며, 현미경 아래에서 관찰하면 이석이 존재하는 것을 육안으로 확인할 수 있다. 이렇게 관찰된 이석은 전자핀셋(#5 Electronic quality, Dumont Tweezers,

Switzerland)과 해부침을 이용하여 내이에서 슬라이드글라스 위로 옮겨졌다. 이후, 이석의 주위에 묻어있는 조직과 유기물들을 핀셋과 해부침을 이용하여 조심스럽게 제거한 후, 에폭시 수지로 만들어진 몰딩 용액을 얇게 도포한 슬라이드글라스 위에 깨끗해진 이석을 살짝 올려서 고정시켰다. 이렇게 고정된 이석은 실체현미경(Discovery V8, Carl Zeiss Co., Germany)에 장착된 카메라(ICC 1, Carl Zeiss Co., Germany)를 이용하여 전체적인 촬영을 하고, 촬영된 사진을 이용하여 이석의 장축과 단축 지름 중 장축 지름을 0.01mm 단위까지 측정하였다. 이렇게 측정된 결과는 통계처리(one-way ANOVA 및 two-way ANOVA)에 사용되어 이산화탄소 농도 변화와 이석성장(지름)간에 어떠한 상관관계가 나타나는지 확인하는데 활용하였다. 또한, 사육환경의 수온 및 이산화탄소 조건에 따른 이석의 크기를 비교하기 위해 2가지 방법을 이용하였다. 첫번째로는 비슷한 체장조건(12~13mm)을 가진 넙치 유생의 이석(sagitta)을 추출한 후 타원형의 이석에서 긴 쪽의 지름을 측정하여 그 측정치를 이용하여 통계처리 후 결과를 확인하였으며, 두번째로는 이석의 상대성장을 비교하기 위해, 이석의 크기와 넙치 유생의 체장간의 비율을 계산한 후 동일하게 통계처리를 하여 결과를 비교하였다.

3. 결과

1) 넙치 사육실험장치

실험장치를 제작하고 시운전을 수행한 결과, 저장수조와 사육수조 내부의 해수 pH 및 여러 환경인자의 변화가 관측되었다(Table 5). 2주간의 예비실험기간 동안에 400 ppm, 850 ppm, 1550 ppm 의 이산화탄소 농도에서 나타난 해수의 pH를 매일 측정하였는데, 상기 이산화탄소의 농도에서 각각 8.04 ± 0.03 , 7.83 ± 0.05 , 7.63 ± 0.06 의 범위 내에서 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 그리고, 수온도 18°C와 22°C 실험구에서 각각 $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 범위 내에서 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. $p\text{CO}_2$ 의 경우 채수한 해수를 이용하여 TA(Total Alkalinity)값을 구한 후 그 값을 이용하여 다시 계산 프로그램(CO2SYS)을 이용하여 계산하였다. 그 결과 실험 기간 동안 나타난 각 실험구별 $p\text{CO}_2$ 농도는 400 ppm 의 경우 $479.7 \pm 51 \mu\text{atm CO}_2$, 850 ppm 의 경우 $838.0 \pm 127 \mu\text{atm CO}_2$, 1550 ppm 의 경우 $1422.7 \pm 240 \mu\text{atm CO}_2$ 으로 각각 나타났다. 이는 수온(18, 22°C)구배와 상관없이 이산화탄소 농도에 따라 동일하게 나타났으며 설정된 이산화탄소 농도와 약간의 편차는 있었으나 각

실험구간에 확실한 $p\text{CO}_2$ 구배가 나타나는 것을 본 실험을 통하여 확인할 수 있었다.

두번째 예비실험은 생물 사육을 통해 발생한 노폐물이 잘 처리되어 적정 수준의 수질이 유지되는지 확인하기 위한 목적에서 수행되었는데, 사육일수가 경과함에 따라 사육해수 내의 Total nitrogen(TN)값이 약간 상승하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이는 사육해수 내에 용존상태로 존재하는 질소성 유기물(배설물, 먹이 찌꺼기, 사체 등)이 증가하기 때문에 나타나는 현상으로 일반적으로 밀폐된 환경에서 사육이 진행되는 실험이나 양식장에서 흔히 나타나는 현상으로 알려져 있다(손 등, 2006). 본 실험에서는 11일에 측정된 TN수치가 다른 날짜에 측정된 수치보다 높게 나타났는데, 이러한 현상은 사육수를 채수하면서 수조 바닥에 침전되어 있던 유기물들이 함께 채수병으로 들어갔기 때문으로 여겨진다. 비록, 11일째 약간의 증가가 있었으나 그 증가폭이 크지 않고(최대 0.6mg/L 증가) 일반적으로 양식장에서 생물이 서식하는 환경의 TN값과 비교했을 때(양식장 평균 TN 농도: 1~1.5mg/L) 생물이 생활하는데 지장을 줄 정도로 높은 수치를 나타내지 않았기 때문에 비교적 사육환경의 유지는 잘 이루어진 것으로 평가할 수 있었다

Table 5. Chemical properties for three experimental conditions used in pilot experiment for 2 weeks. Calculated $p\text{CO}_2$ was computed by CO2SYS software (Pierrot and Wallace, 2006) using measurements of pH_{NBS} , total alkalinity, and salinity in reservoir and aquaria. Values indicate mean $\pm$ SD. (n=12)

Air CO_2 in mixing Chamber (ppm)	pH_{NBS}	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Salinity	Total Alkalinity ($\mu\text{mol kg-SW}^{-1}$)	Calculated $p\text{CO}_2$ in tank water (μatm)
400(Control)	8.04 $\pm$ 0.03	22.0 $\pm$ 0.5	35.8 $\pm$ 0.3	2477.0 $\pm$ 32.0	479.7 $\pm$ 51
	8.04 $\pm$ 0.03	18.0 $\pm$ 0.5	35.8 $\pm$ 0.3	2477.0 $\pm$ 32.0	479.7 $\pm$ 51
850(Medium)	7.83 $\pm$ 0.05	22.0 $\pm$ 0.5	35.0 $\pm$ 0.8	2452.7 $\pm$ 58.7	838.0 $\pm$ 127
	7.83 $\pm$ 0.05	18.0 $\pm$ 0.5	35.0 $\pm$ 0.8	2452.7 $\pm$ 58.7	838.0 $\pm$ 127
1550(High)	7.63 $\pm$ 0.06	22.0 $\pm$ 0.5	36.1 $\pm$ 0.2	2521.6 $\pm$ 46.7	1422.7 $\pm$ 240
	7.63 $\pm$ 0.06	18.0 $\pm$ 0.5	36.1 $\pm$ 0.2	2521.6 $\pm$ 46.7	1422.7 $\pm$ 240

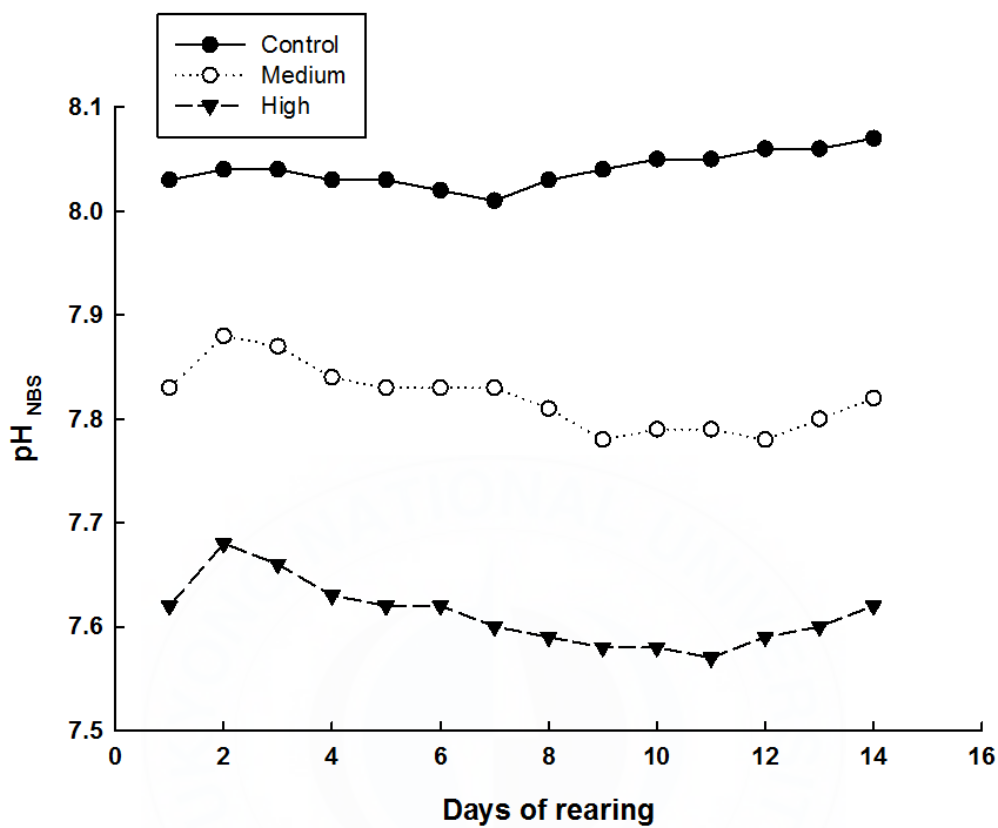


Fig. 3. pH_{NBS} observation at different CO₂ levels in pilot experiment for 2 weeks. pCO_2 concentrations with standard deviation maintained for control(400 ppm), medium(850 ppm) and high(1550 ppm) conditions were 479.7 ± 51 , 838.0 ± 127 and 1422.7 ± 240 μatm , respectively.

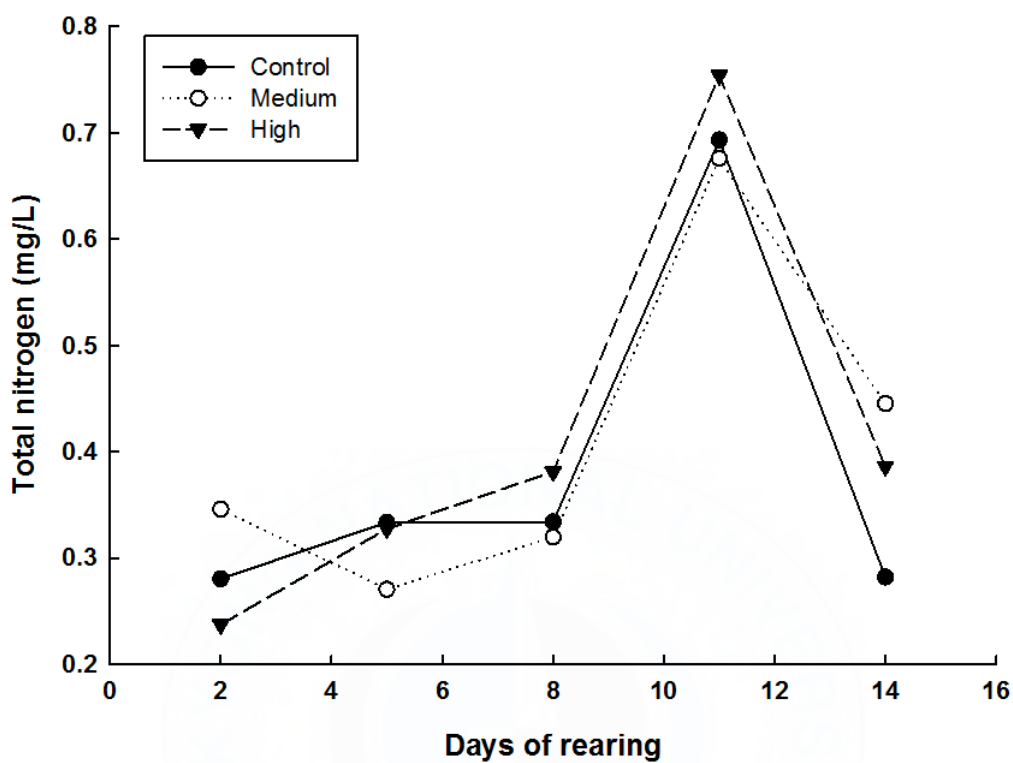


Fig. 4. Concentration of total nitrogen (TN) at different CO₂ levels in pilot experiment for 2 weeks. CO₂ concentration with standard deviation maintained for control(400 ppm), medium(850 ppm) and high(1550 ppm) CO₂ conditions were 479.7±51, 838.0±127 and 1422.7±240 μ atm, respectively.

2) 생물학적 파라미터

가. 부화율과 생존율

총 3회에 걸친 부화율/생존율 실험의 결과, 부화율의 경우, 대조구(400 ppm)는 $68.6 \pm 11\%$, 중간농도구(850 ppm) $71 \pm 11.8\%$, 고농도구(1550 ppm) $70.6 \pm 12.1\%$ 로 나타났으며, 이에 대한 통계분석 결과, 이산화탄소 농도에 따른 유의한 부화율의 차이를 나타내지 않았다(df=2, F=0.233, P>0.05). 또한 동일한 방법으로 생존율을 분석한 결과, 대조구(400 ppm)의 경우 $58.3 \pm 8.8\%$, 중간농도구(850 ppm) $59.3 \pm 9.1\%$, 고농도구(1550 ppm) $60.7 \pm 10.3\%$ 으로 나타났으며 통계분석 결과, 부화율과 마찬가지로 이산화탄소 농도 차이에 따른 생존율의 유의한 차이는 나타나지 않았다(df=2, F=0.012, p>0.05). 따라서 결과는 전체 실험 데이터를 pooling 하여 하나의 그래프로 나타내었다(Fig. 5).

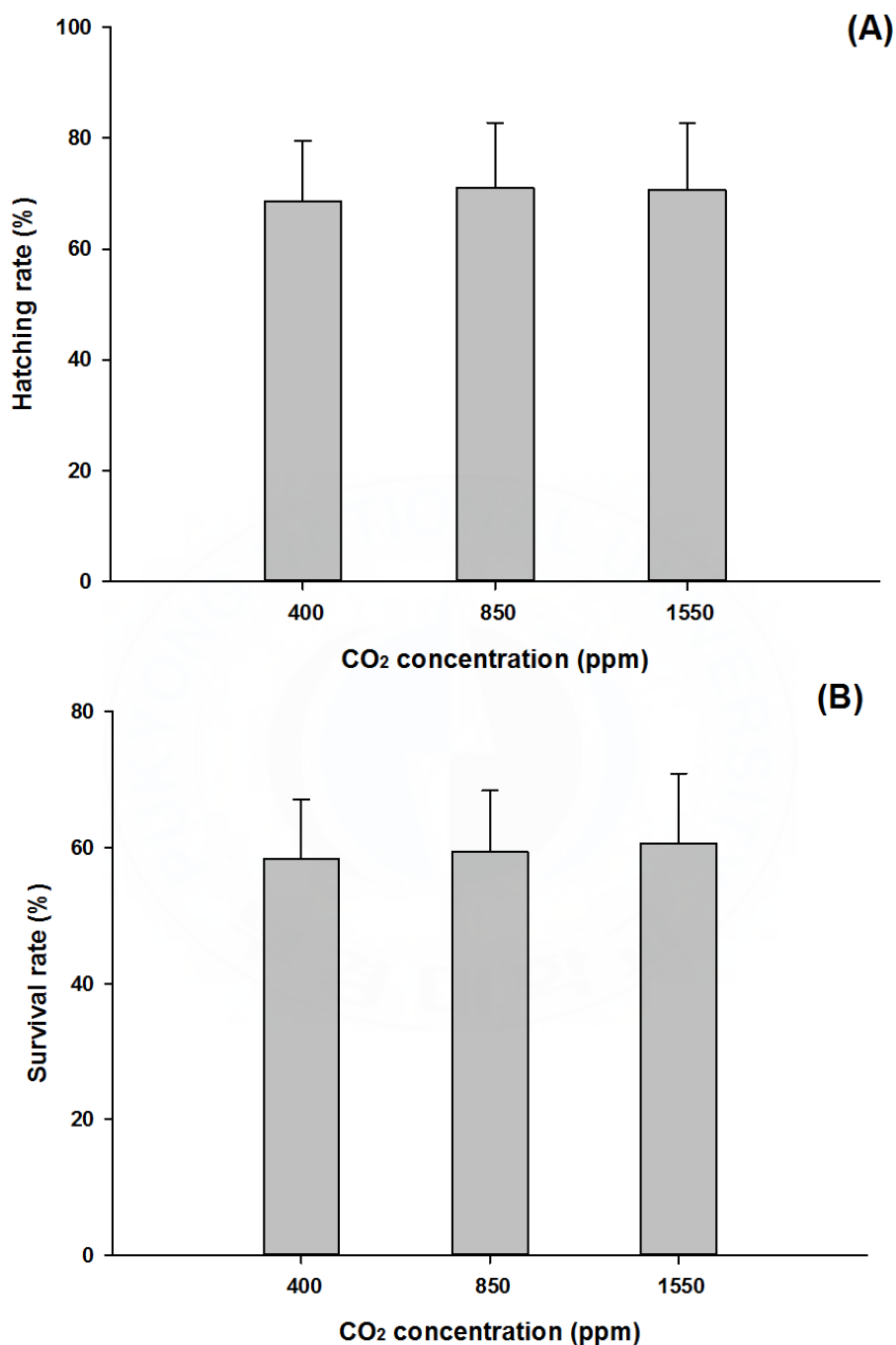


Fig. 5. Hatching rate (A) and survival rate (B) of olive flounder *Paralichthys olivaceus* at different CO₂ levels during experiment. Experiment were repeated 3 times at each concentration of CO₂. (n=9)

나. 성장지표

① 체장

체장 분석결과, 3회에 걸친 실험에서 통계학적으로 유의한 차이가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 1차 실험에서 수온 18°C 일때 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 넙치 유생의 체장이 통계학적으로 유의하게 증가하는 현상이 나타났다($p<0.05$). 하지만, 22°C에서는 이러한 경향성이 나타나지 않았다. 또한, 400 ppm 대조구에서는 18°C보다 22°C에서 체장이 더 증가하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 그리고 수온과 이산화탄소의 복합적인 영향을 확인하기 위해 two-way ANOVA를 실시한 결과, 통계학적으로 유의한 영향을 주는 것으로 나타났다($p<0.05$).

2차 실험에서도 1차 실험과 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 수온 18°C 일때 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 넙치 유생의 체장이 통계학적으로 유의하게 증가하는 현상이 나타났다($p<0.05$). 반면에, 22°C에서는 이러한 경향성이 나타나지 않았다. 또한, 400 ppm 대조구에서는 18°C보다 22°C에서 체장이 더 증가하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 그리고 수온과 이산화탄소의 복합적인 영향을 확인하기 위해 two-way ANOVA를 실시한 결과, 통계학적으로 유의한 영향을 주는 것으로 나타났다($p<0.05$).

3차 실험은 앞의 두 실험과는 약간 다른 결과를 나타내었는데, 수온 18°C일

때, 400 ppm 대조구보다 850, 1550 ppm 의 실험구의 체장이 더 크게 나타났지만, 850 ppm 보다 1550 ppm 의 평균 체장이 더 낮게 나타났다. 하지만, 22°C 에서 나타나는 무경향성과 수온 증가에 따른 체장 증가는 앞의 두 실험과 동일하게 나타났다($p < 0.05$). 하지만 two-way ANOVA를 실시한 결과, 통계학적으로 유의한 영향이 없는 것으로 나타났다($p > 0.05$)(Fig. 6). 또한, 본 실험에 대한 통계학적 검정 결과는 <Table 6>에 나타내었다.

② 체중

체중 분석결과, 체장과 마찬가지로 3회에 걸친 실험에서 통계학적으로 유의한 차이가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 1차 실험에서 수온 18°C 일때 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 넙치 유생의 체중이 통계학적으로 유의하게 증가하는 현상이 나타났다($p < 0.05$). 하지만, 22°C에서는 이러한 경향성이 나타나지 않았다. 또한, 400 ppm 대조구에서는 18°C보다 22°C에서 체중이 더 증가하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 그리고 수온과 이산화탄소의 복합적인 영향을 확인하기 위해 two-way ANOVA를 실시한 결과, 통계학적으로 유의한 영향을 주는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

2차 실험에서도 1차 실험과 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 수온 18°C 일때 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 넙치 유생의 체중이 통계학적으로 유의하게 증가하는 현상이 나타났다($p < 0.05$). 반면에, 22°C에서는 이러한 경향성이 나타나지 않았을 뿐만 아니라, 오히려 이산화탄소 농도 증가에 따라 체중이

감소하는 현상이 나타났다. 하지만, 400 ppm 대조구에서는 18°C보다 22°C에서 체장이 더 증가하는 현상은 동일하게 나타났다($p < 0.05$). 그리고 수온과 이산화탄소의 복합적인 영향을 확인하기 위해 two-way ANOVA를 실시한 결과, 통계학적으로 유의한 영향을 주는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

3차 실험은 앞의 두 실험과는 약간 다른 결과를 나타내었는데, 수온 18°C일 때, 400 ppm 대조구보다 850, 1550 ppm 의 실험구의 체장이 통계학적으로 유의하게 크게 나타났지만, 850와 1550 ppm 사이에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그리고, 22°C에서는 이산화탄소 농도에 따른 체중 변화에 일정한 경향성이 나타나지 않았고, 수온에 따른 체중 증가의 영향은 모든 이산화탄소 농도에서 동일하게 나타났다. 하지만 two-way ANOVA를 실시한 결과, 통계학적으로 유의한 영향이 없는 것으로 나타났다($p > 0.05$)(Fig. 7). 또한, 본 실험에 대한 통계학적 검정 결과는 <Table 7>에 나타내었다. 실험 전체적으로 18°C 실험구에 비해 22°C 실험구의 이산화탄소에 대한 반응경향이 약해지거나 전혀 나타나지 않는 것을 알 수 있는데 이는 이산화탄소와 수온의 상승작용에 의한 성장저해가 원인인 것으로 추측된다.

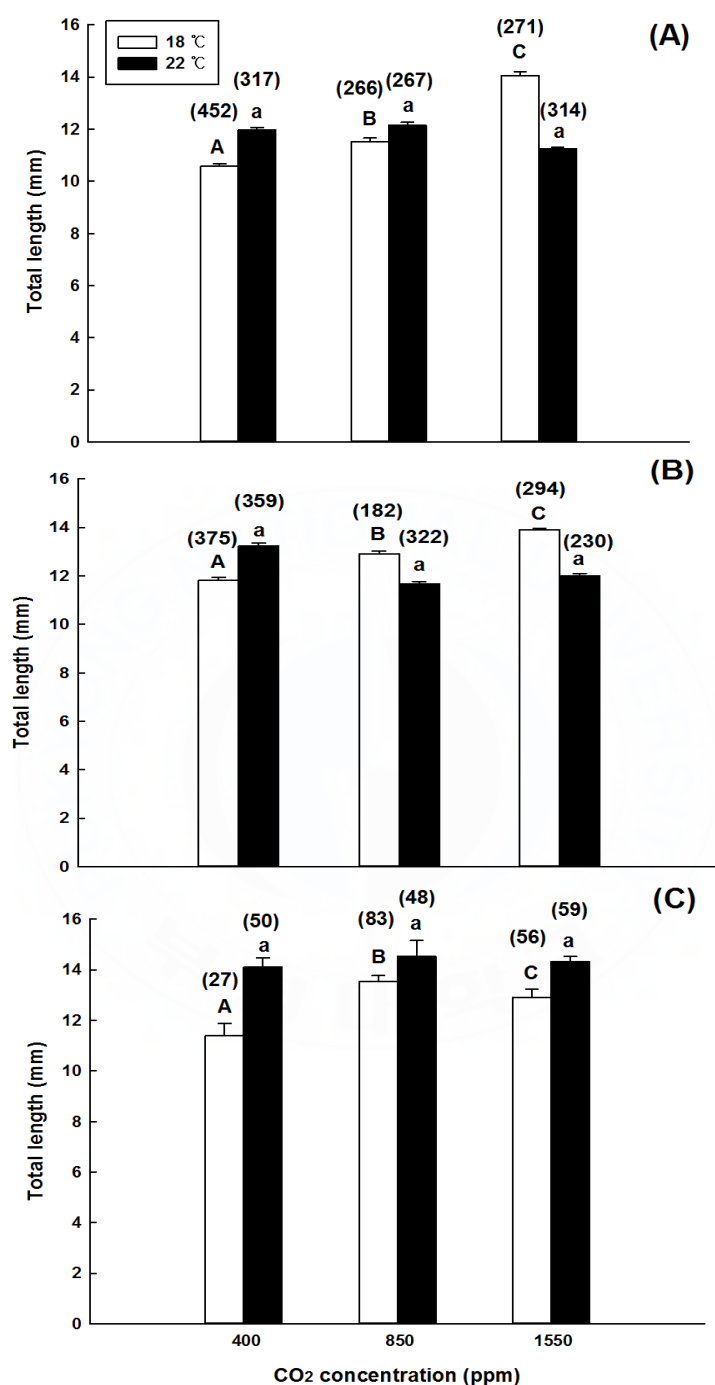


Fig. 6. Total length of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae reared at different CO₂ concentration and temperature levels. (A) first, (B) second and (C) third experiment. Significant differences between groups are indicated with different letters. Numbers on the each bar indicate sample size.

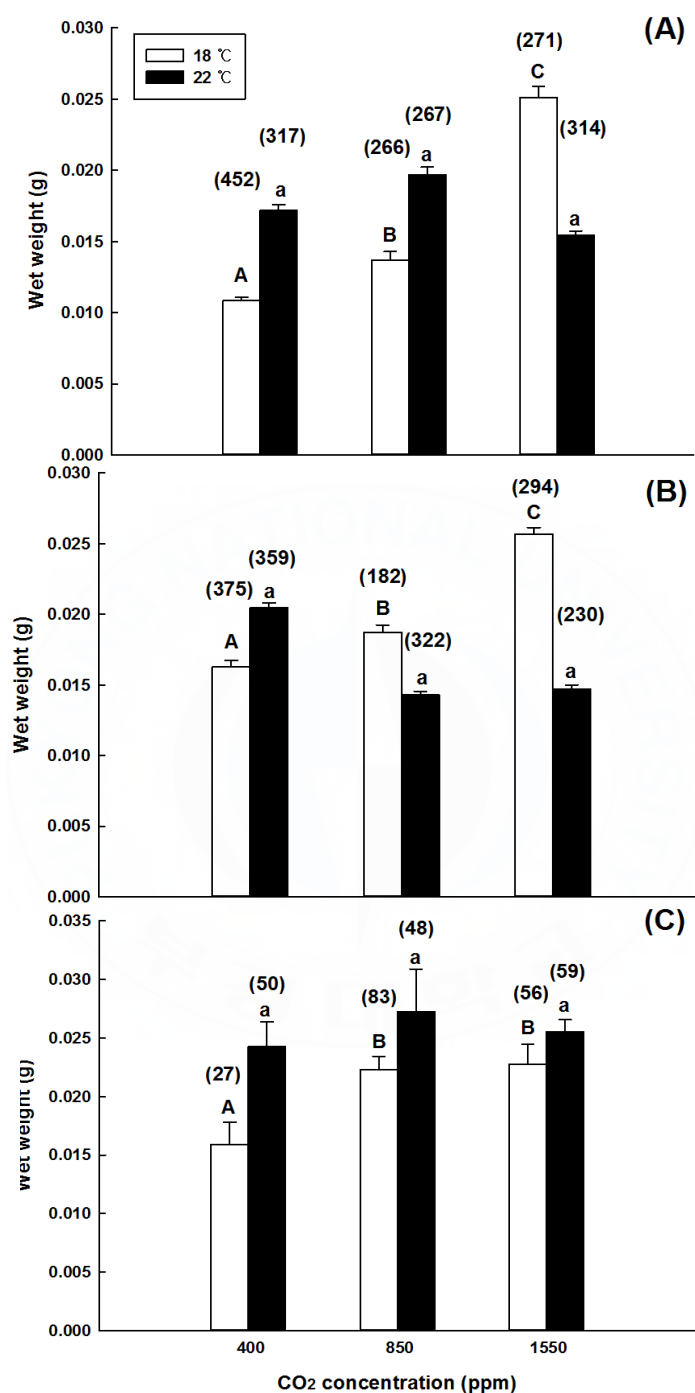


Fig. 7. Wet weight of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae reared at different CO₂ concentration and temperature levels. (A) first, (B) second and (C) third experiment. Significant differences between groups are indicated with different letters. Numbers on the each bar indicate sample size.

Table 6. The results of two-way ANOVA of total length of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae reared at different CO₂ concentration and temperature. (A) first, (B) second and (C) third experiment

(A)

Effect	df	MS	F	p value.
CO ₂	2	141.124	64.875	.000
Temperature	1	15.683	7.209	.007
CO ₂ x Temperature	2	321.066	147.595	.000
Error	841	2.175	-	-

(B)

Effect	df	MS	F	p value.
CO ₂	2	26.507	17.861	.000
Temperature	1	60.224	40.580	.000
CO ₂ x Temperature	2	198.512	133.762	.000
Error	766	1.484	-	-

(C)

Effect	df	MS	F	p value.
CO ₂	2	14.882	5.227	.007
Temperature	1	85.336	29.974	.000
CO ₂ x Temperature	2	7.349	2.581	.080
Error	126	2.847	-	-

Table 7. The results of two-way ANOVA of wet weight of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae reared at different CO₂ concentration and temperature. (A) first, (B) second and (C) third experiment

(A)

Effect	df	MS	F	p value.
CO ₂	2	0.003	67.402	.000
Temperature	1	0.000	8.366	.000
CO ₂ x Temperature	2	0.005	111.374	.004
Error	841	0.00004	-	-

(B)

Effect	df	MS	F	p value.
CO ₂	2	0.001	38.915	.000
Temperature	1	0.003	125.854	.000
CO ₂ x Temperature	2	0.004	172.747	.000
Error	766	0.00002	-	-

(C)

Effect	df	MS	F	p value.
CO ₂	2	0.000	3.256	.042
Temperature	1	0.001	11.608	.001
CO ₂ x Temperature	2	0.00008	1.182	.310
Error	126	0.00007	-	-

③ 성장률

4주간의 성장변화에 대한 실험 역시 3번 반복되었으며, 각 조건에 따른 성장차이를 파악하기 위하여 각 실험별로 체장에 대한 성장률을 계산하였다. 각 이산화탄소 조건에 따른 넙치 유생의 성장차이를 확인하기 위해 통계학적 검증 방법인 회귀분석을 수행하여 회귀성장식을 구함과 동시에 사후검증을 실시하여 실험구간 유의차를 확인하였다. 세 차례 반복된 실험의 결과는 다음과 같다.

1차 실험

18°C 수온조건에서 사육된 그룹을 분석한 결과, 이산화탄소 농도에 따라 성장률이 차이나는 것을 확인하였다($F=9.754$, $df=2$, $p<0.05$). 사후분석 결과, 대조구 (400 ppm), 중간농도 (850 ppm) 실험구와 고농도 (1550 ppm) 실험구 간에 통계학적으로 유의한 차이가 나타나는 것으로 확인되었으며, 대조구 (400 ppm)와 중간농도 (850 ppm)간에는 차이가 없는 것으로 나타났다($p>0.05$). 또한, 사육일수 18일 경과 후부터는 고농도 실험구의 체장이 통계학적으로 유의하게 큰 것으로 나타났다. 18°C의 수온조건과 이산화탄소 농도에 따른 각각의 회귀성장식(y)과 R^2 값은

$$\text{대조구(400 ppm): } y = 0.2821x + 1.361 \text{ (} R^2=0.84 \text{)}$$

$$\text{중간농도(850 ppm): } y = 0.3184x + 0.85 \text{ (} R^2=0.81 \text{)}$$

$$\text{고농도(1550 ppm): } y = 0.4141x + 0.489 \text{ (} R^2=0.88 \text{)}$$

로 나타났다. 반면, 22°C 수온조건에서 사육된 그룹에서는 앞의 결과와는 다른 결과가 나타났다. 즉, 이산화탄소 농도에 따른 성장률의 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 수온간 비교에서는 대조구 (400 ppm)와 중간농도 (850 ppm) 실험구에서 18°C보다 22°C조건에서 더 성장률이 높게 나타났으나 고농도 (1550 ppm)조건에서는 오히려 반대의 결과가 나타났다. 각각의 회귀성장식(y)과 R^2 값은

$$\text{대조구(400 ppm): } y = 0.3238x + 0.88 \text{ (} R^2=0.79 \text{)}$$

$$\text{중간농도(850 ppm): } y = 0.3744x + 0.516 \text{ (} R^2=0.83 \text{)}$$

$$\text{고농도(1550 ppm): } y = 0.352x + 0.877 \text{ (} R^2=0.86 \text{)}$$

으로 나타났다.

2차 실험

18°C 수온조건에서 사육된 그룹에서 1차 실험과 마찬가지로 이산화탄소 농도에 따라 성장률이 다른 것을 확인하였다($F=6.602$, $df=2$, $p<0.05$). 사후분석 결과, 대조구 (400 ppm)와 고농도 (1550 ppm) 실험구 간에 통계학적으로 유의한 차이가 나타나는 것으로 확인되었으며, 대조구 (400 ppm)와 중간농도 (850 ppm) 실험구, 중간농도 (850 ppm)와 고농도 (1550 ppm) 실험구 간에는 차이가 없는 것으로 나타났다($p>0.05$). 또한 사육일수 16일~21일 사이에 뚜렷한 체장이 차이가 나타나기 시작하였으며 고농도 실험구의 체장이 가장 크

게 나타났다. 각각의 회귀성장식(y)과 R^2 값은

$$\text{대조구(400 ppm): } y = 0.4108x + 0.275 \ (R^2=0.96)$$

$$\text{중간농도(850 ppm): } y = 0.449x + 0.141 \ (R^2=0.96)$$

$$\text{고농도(1550 ppm): } y = 0.4817x + 0.059 \ (R^2=0.97)$$

로 나타났다. 22°C 수온조건에서 사육된 그룹에서도 동일하게 이산화탄소 농도에 따라 성장률이 다른 것을 확인하였다($F=6.980$, $df=2$, $p<0.05$). 하지만 사후분석 결과, 대조구 (400 ppm)와 중간농도 (850 ppm) 실험구간에는 통계학적으로 유의한 차이가 나타나는 것으로 확인되었으나($p<0.05$), 대조구 (400 ppm)와 고농도 (1550 ppm) 실험구 간에는 차이가 없는 것으로 나타나, 이전의 성장률의 유의차가 부정되었다. 즉, 22°C 수온조건에서는 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 성장률이 증가하거나 감소하는 경향을 나타내지 않고, 실험구 간에만 차이를 보이는 것으로 나타났다. 수온간 비교에서는 대조구 (400 ppm) 에서만 18°C보다 22°C조건에서 더 성장률이 높게 나타났고 나머지 두 실험구에서는 반대의 결과가 나타났다. 또한, 사육일수 16~21일 사이에는 고농도 실험구의 체장이 가장 크게 나타났지만 실험 종료시점에서는 그 현상이 역전되었다. 각각의 회귀성장식(y)과 R^2 값은

$$\text{대조구(400 ppm): } y = 0.4665x + 0.149 \ (R^2=0.93)$$

$$\text{중간농도(850 ppm): } y = 0.3944x + 0.759 \ (R^2=0.97)$$

$$\text{고농도(1550 ppm): } y = 0.4468x + 0.584 \ (R^2=0.98)$$

로 나타났다.

3차 실험

1, 2차 실험과는 다르게 18°C 수온조건에서 이산화탄소 농도에 따른 성장률의 유의한 차이가 나타나지 않았으며($p>0.05$), 오히려 22°C 수온조건에서 사육된 그룹에서 이산화탄소 농도변화에 따라서 성장률에 통계학적으로 유의한 차이가 나타났다($F=5.455$, $df=2$, $p<0.05$). 사후 분석 결과 대조구 (400 ppm)와 고농도 (1550 ppm) 실험구 간에 통계학적으로 유의한 차이가 나타났으며 ($p<0.05$), 대조구 (400 ppm)와 중간농도 (850 ppm), 중간농도 (850 ppm)와 고농도 (1550 ppm) 실험구 간에는 차이가 나타나지 않았다. 또한, 사육일수 18 일 경에 고농도 실험구의 체장이 유의하게 크게 나타났지만, 이후로는 통계학적인 유의성을 가지지 못했다. 저수온구에서 이산화탄소 농도별 회귀성장식(y)과 R^2 값은

$$\text{대조구(400 ppm): } y = 0.3521x + 0.706 \ (R^2=0.91)$$

$$\text{중간농도(850 ppm): } y = 0.3821x + 0.313 \ (R^2=0.91)$$

$$\text{고농도(1550 ppm): } y = 0.381x + 0.576 \ (R^2=0.95)$$

로 나타났다. 22°C 수온조건에서 역시 3차 실험에서는 1, 2차 실험과는 다른 결과를 확인할 수 있었는데 이 또한 수정란의 문제가 결과에 영향을 미친 것으로 추측된다(Fig. 8). 각각의 회귀성장식(y)과 R^2 값은

대조구(400 ppm): $y = 0.3954x + 0.185$ ($R^2=0.84$)

중간농도(850 ppm): $y = 0.4422x + 0.127$ ($R^2=0.89$)

고농도(1550 ppm): $y = 0.4538x + 0.077$ ($R^2=0.88$)

로 나타났다. 수온간 비교에서도 대조구 (400 ppm), 중간농도 (850 ppm), 고농도 (1550 ppm) 실험구 모두에서 18°C보다 22°C 조건에서 더 성장률이 높게 나타났다.

그래프에서 나타난 것처럼, 전체 실험기간 중에서 주로 후반부에 각 이산화탄소 농도별로 체장에 유의한 차이가 나타났으며 이러한 경향은 18°C보다 22°C 조건에서 뚜렷하게 나타났다(Fig. 8)

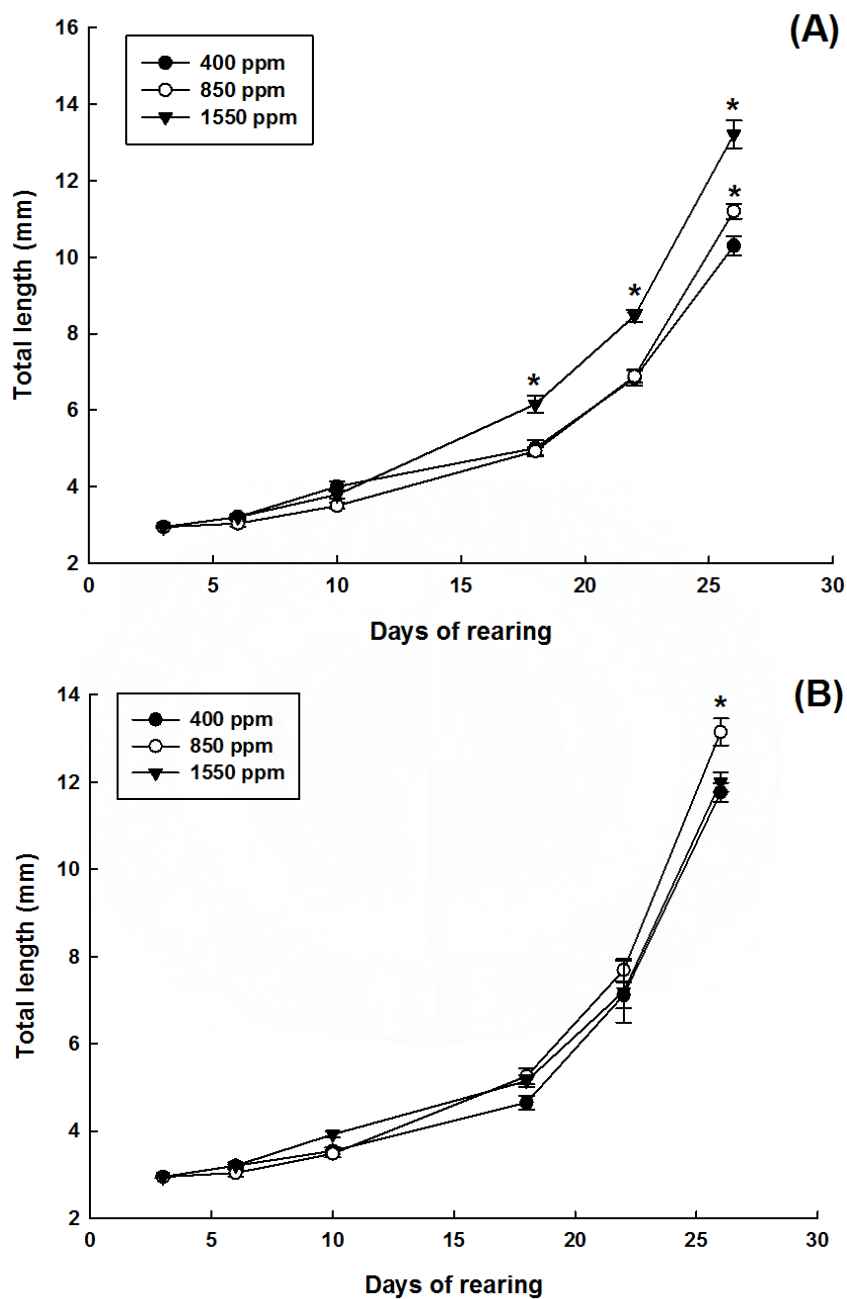


Fig. 8. Growth of larval olive flounder *Paralichthys olivaceus* reared at different CO₂ concentration and temperature levels. Experiments were repeated 3 times at each concentration of CO₂. Combination of rearing condition on CO₂ concentration and water temperature at each experiment. Asterisks indicate significant differences among control and treatment groups. (A) first experiment, 18 °C, (B) first experiment, 22 °C, (C) second experiment, 18 °C, (D) second experiment, 22 °C, (E) third experiment, 18 °C and (F) third experiment, 22 °C.

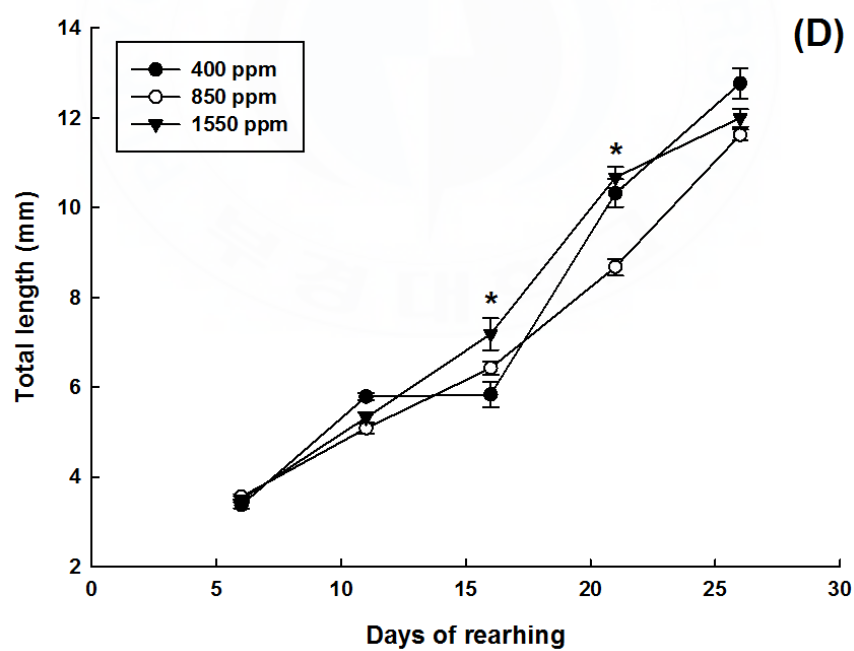
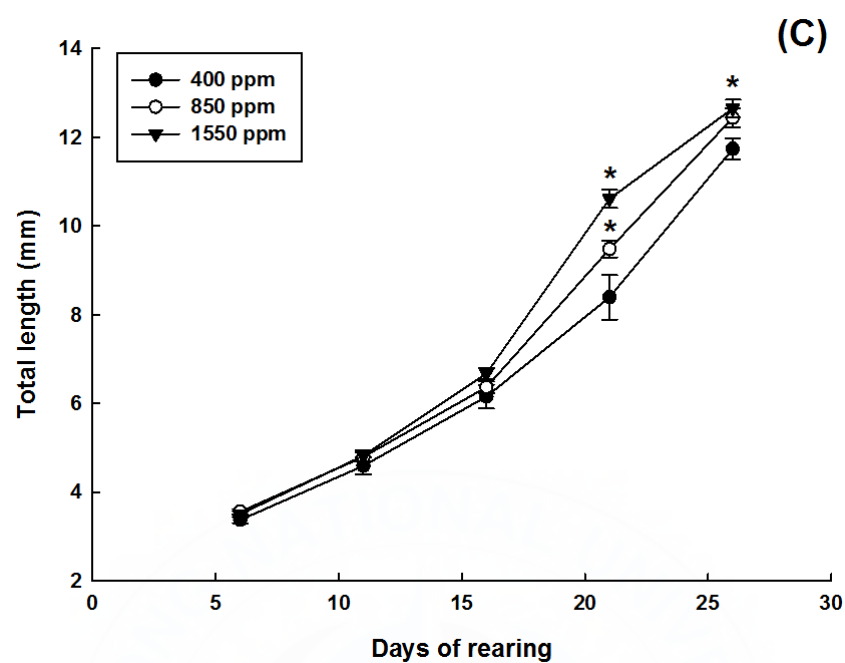


Fig. 8. (continued)

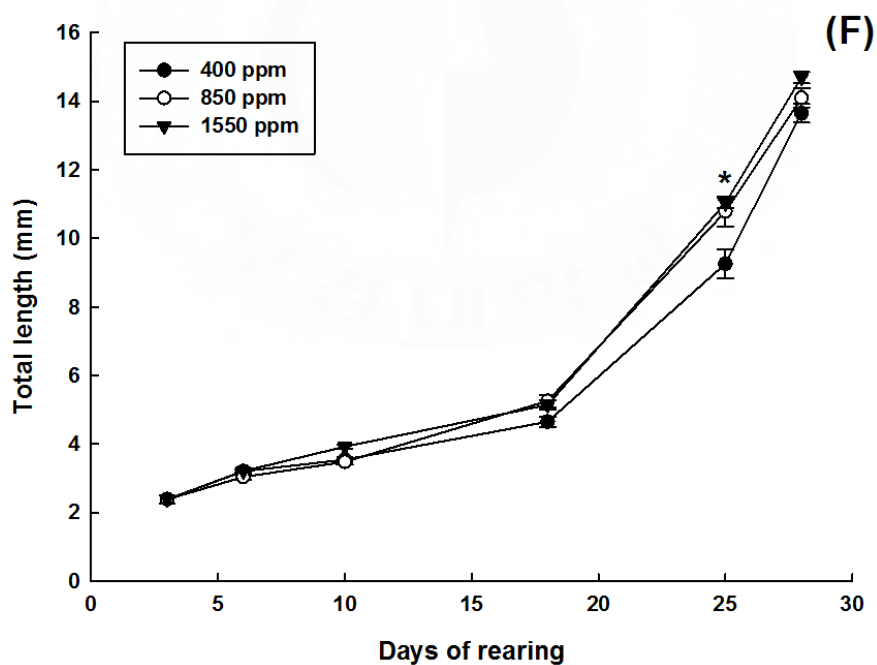
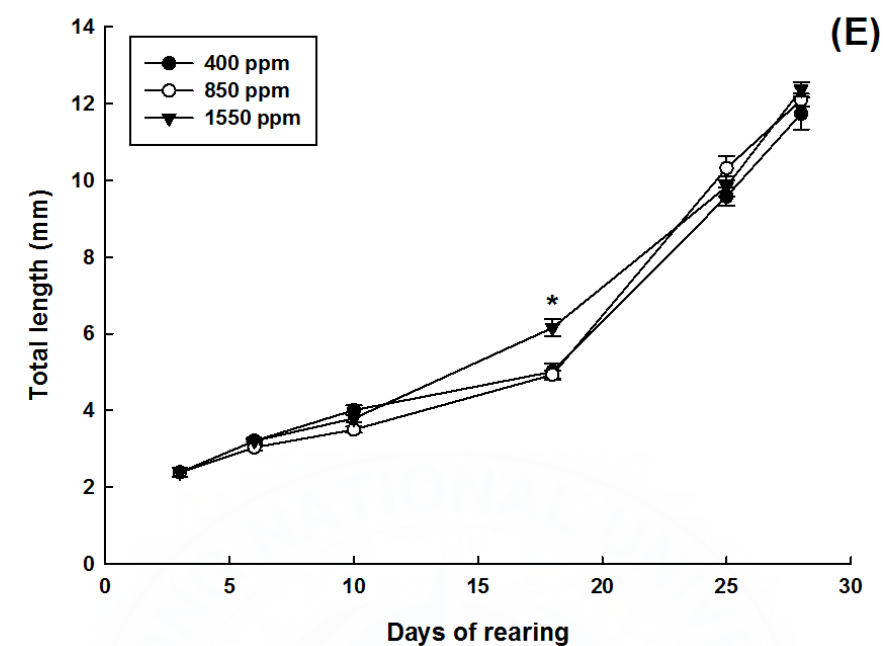


Fig. 8. (continued)

④ 비만도

앞에서 측정된 넙치 유생의 체장과 체중 결과값을 이용하여 실험조건별로 넙치 유생의 비만도를 계산하여 통계분석 및 그래프로 비교하였다(Fig. 9).

1차 실험결과 18°C에서 비만도의 평균값은 각각 대조구(400 ppm)는 0.89 ± 0.009 , 중간농도(850 ppm)는 0.85 ± 0.013 , 고농도(1550 ppm)는 0.87 ± 0.007 로 나타났으며, 22°C에서는 각각 대조구(400 ppm)는 0.96 ± 0.006 , 중간농도(850 ppm)는 1.05 ± 0.008 , 고농도(1550 ppm)는 1.06 ± 0.007 로 나타났다. 통계분석 결과, 수온 및 이산화탄소 농도에 따른 비만도의 변화는 통계학적으로 유의한 상관관계를 나타내지 않았으며($p > 0.05$), 두 조건의 복합적인 영향 역시 나타나지 않았다($p > 0.05$).

2차 실험결과 18°C에서 비만도의 평균값은 각각 대조구(400 ppm)는 0.90 ± 0.049 , 중간농도(850 ppm)는 0.89 ± 0.033 , 고농도(1550 ppm)는 0.90 ± 0.038 로 나타났으며, 22°C에서는 각각 대조구(400 ppm)는 0.89 ± 0.012 , 중간농도(850 ppm)는 0.91 ± 0.016 , 고농도(1550 ppm)는 0.88 ± 0.026 으로 나타났다. 통계분석 결과 역시 수온 및 이산화탄소 농도에 따른 비만도의 변화는 통계학적으로 유의한 상관관계를 나타내지 않았으며($p > 0.05$), 두 조건의 복합적인 영향 역시 나타나지 않았다($p > 0.05$).

3차 실험결과 18°C에서 비만도의 평균값은 각각 대조구(400 ppm)는 0.95 ± 0.001 , 중간농도(850 ppm)는 0.86 ± 0.017 , 고농도(1550 ppm)는

0.93±0.058로 나타났으며, 22°C에서는 각각 대조구(400 ppm)는 0.84±0.003, 중간농도(850 ppm)는 0.85±0.011, 고농도(1550 ppm)는 0.85±0.005로 나타났다. 통계분석 결과, 수온 및 이산화탄소 농도에 따른 비만도의 변화는 통계학적으로 유의한 상관관계를 나타내지 않았으며($p>0.05$), 두 조건의 복합적인 영향 역시 나타나지 않았다($p>0.05$).

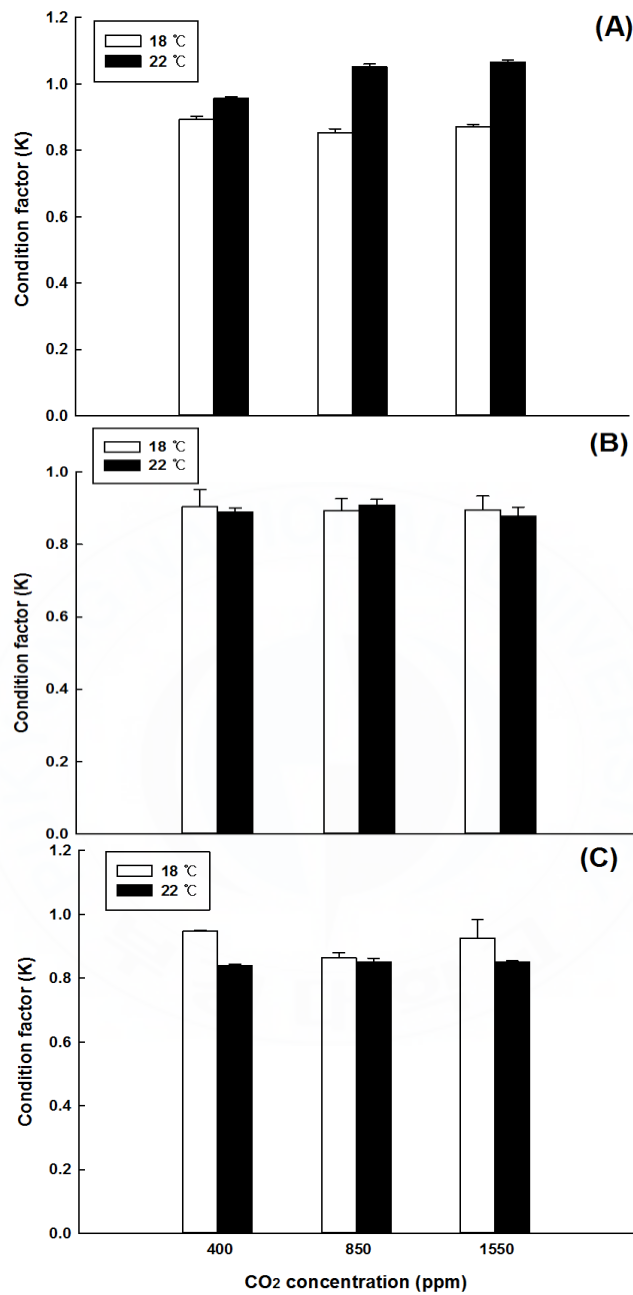


Fig. 9. Condition factor (K) on olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae reared at different CO₂ concentration and temperature levels. (A) first, (B) second and (C) third experiment.

3) 조직 및 골격분석

가. 조직

현미경을 이용하여 조직 절편을 400배율에서 촬영하여 관찰한 결과 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 다양한 조직 이상이 관찰되었다(Fig. 10). 눈, 신장, 간, 아가미, 장, 근육 6개 기관을 관찰한 결과 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 고수온구와 저수온구 모두에서 눈과 신장, 아가미, 간의 조직학적 이상 징후가 관찰되었으나, 장과 근육에서는 특별한 이상이 관찰되지 않았다. 고농도 이산화탄소 조건에서 사육된 넙치 자어의 신장에서는 renal tubules와 결합조직 사이에 vacuoles가 관찰되었으며, 신장 결합조직의 hyaline droplet degeneration이 나타나는 것을 확인하였다. 그리고, 전체적으로 renal tubules의 외곽을 둘러싸고 있는 neck cells의 결합이 느슨해져 윤곽이 희미해져 있는 경향이 나타났다. 역시 고농도 사육조건에서 사육된 넙치 유생의 간에서는 blood congeation 현상이 나타났을 뿐만 아니라 hepatocytes hypertrophy 현상 및 glycogen and lipid vacuoles가 비대해지는 현상을 확인할 수 있었다. 이로 인해 고농도 실험구에서는 hepatocyte의 관찰이 대조구에 비해 어려웠다(Fig. 10-1).

눈의 경우 고이산화탄소 실험구에서 pigmented layer와 basement membrane과의 사이에 gap이 형성되는 현상이 발견되었으며, pigmented layer의 밀도가 낮아지는 현상이 관찰되었다. 아가미의 경우 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 primary filament와 secondary lamellae가 비대해지는 현상이 나타났으며, primary filament와 아가미 기저부간의 연결부위에서 chloride cell이 뚜렷하게 관찰되었는데, 이산화탄소 농도 증가에 따라 관찰되는 chloride cell의 숫자가 증가하고 세포의 크기가 커지는 경향이 관찰되었다(Fig 10-2).

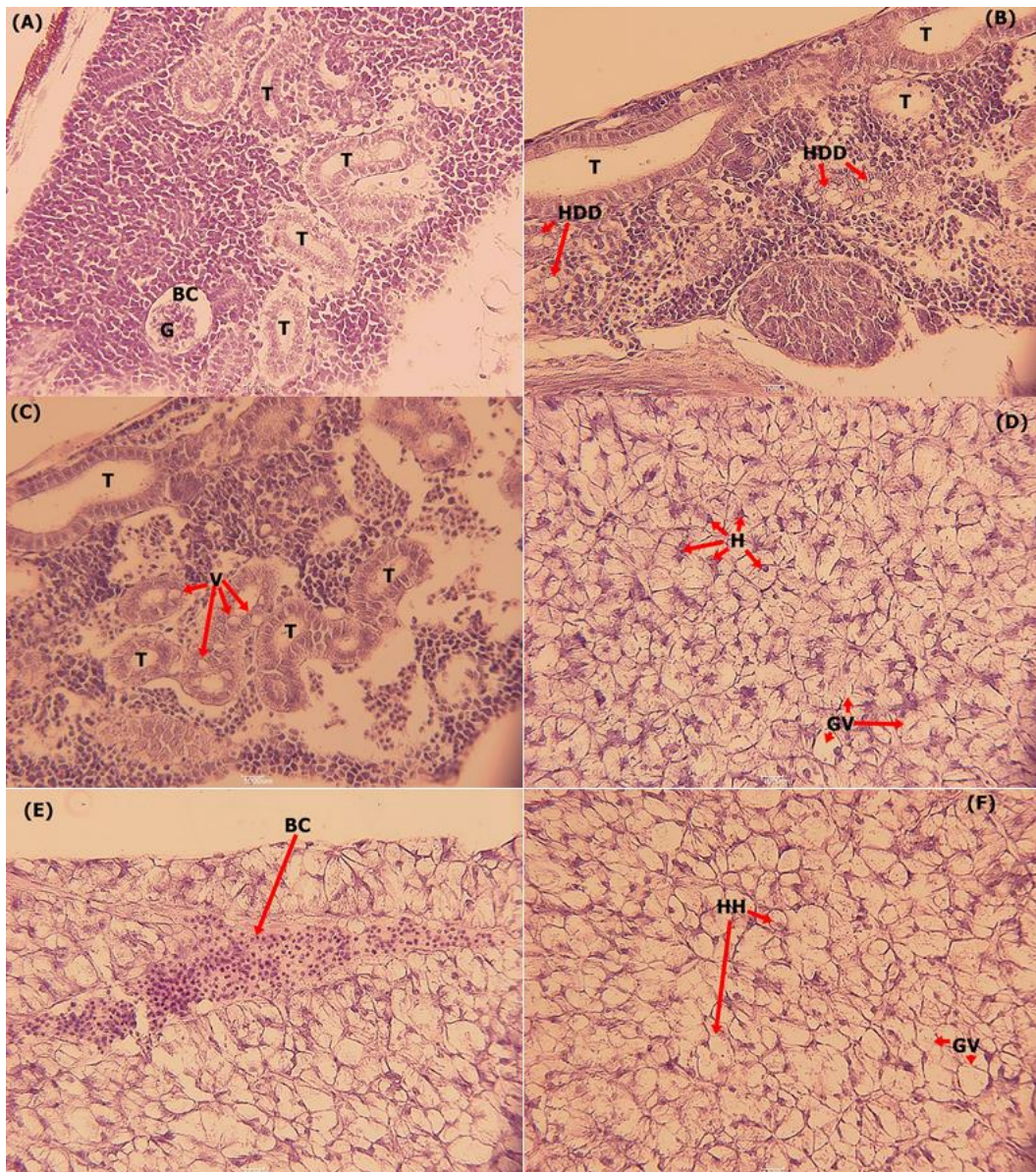


Fig. 10-1. Histological observation of liver and kidney from olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae (x400). (A)~(C): kidney; (D)~(F): liver; (A) and (D) are from control (400 ppm), (B), (C), (E) and (F) are from high CO₂ concentration (1550 ppm). Tissues in photo: renal tubuls (RT), glomerulus (G), Bowman's space (BC), hyline dropet degeneration (HDD), vacuole (V), hepatocytes (H), glycogen vacuole (GV), Blood congestion (BC) and hepatocytes hypertrophy (HH).

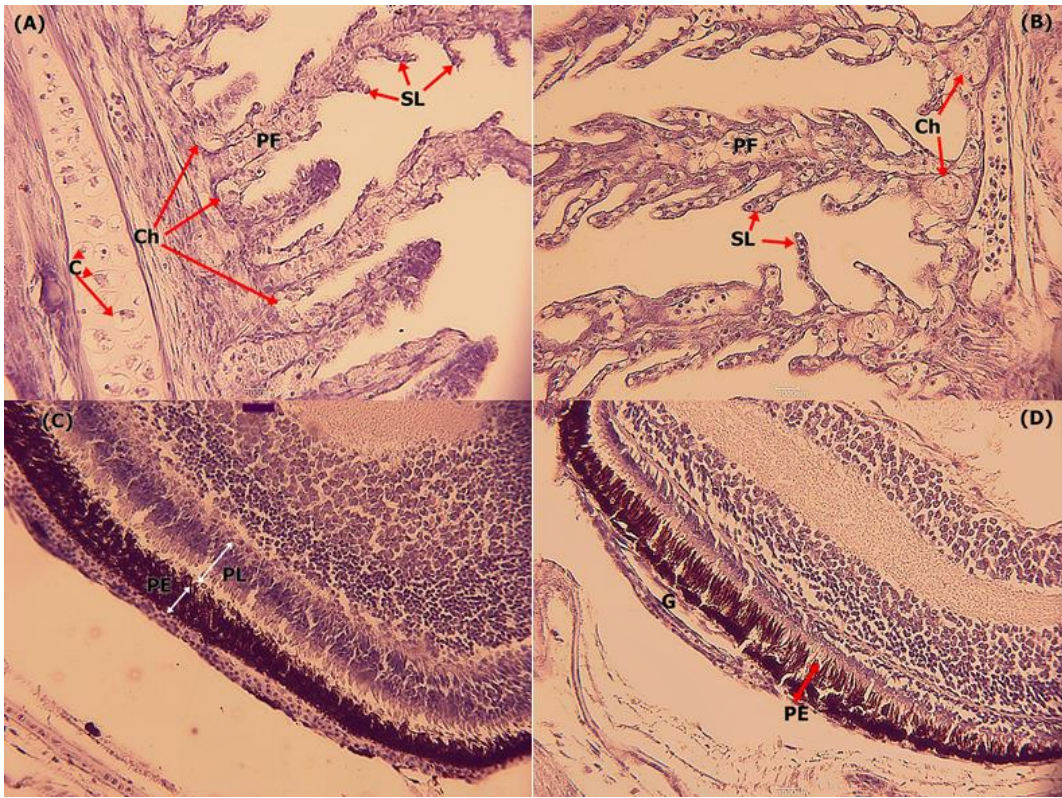


Fig. 10-2. Histological observation of gill and eyes from olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae (x400). (A)~(B): gill; (C)~(D): eyes; (A) and (C) are from control (400 ppm), (B) and (D) are from high CO₂ concentration(1550 ppm). Tissues in photo: chondrocyte (C), chloride cell (Ch), Primary filament (PF), secondary lamellae (SL), pigment epithelium (PE), photoreceptor layer (cones and rods) (PL) and gap between pigment epithelium and basement membrane (G).

나. 골격

척추골의 밀도를 확인하기 위해 주사전자현미경으로 척추골의 신경궁 선단 부위를 $\times 4500\sim 6000$ 배율로 촬영하였다. 촬영결과, 대조구의 경우 촬영사진에서 확인할 수 있는 것처럼, 매끈한 표면을 관찰할 수 있었으나, 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 척추골의 표면에 거친 부분이 증가하는 것을 육안으로 확인할 수 있었다(Fig. 11). 이러한 현상은 사육 수온과 관계없이 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 동일하게 관측되었다. 대조구(400 ppm)의 골밀도 수치는 0.953 ± 0.029 으로 계산되었으며 중간농도구(850 ppm)는 0.656 ± 0.225 , 고농도구(1550 ppm)는 0.300 ± 0.126 으로 나타났다. 통계학적 처리 결과, 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 유의하게 골 표면의 거칠어진 부분의 비율이 증가하는 것으로 나타났으며($df=2$, $F=14.333$, $p=0.002$), 이는 골밀도의 감소를 의미한다고 여겨진다.

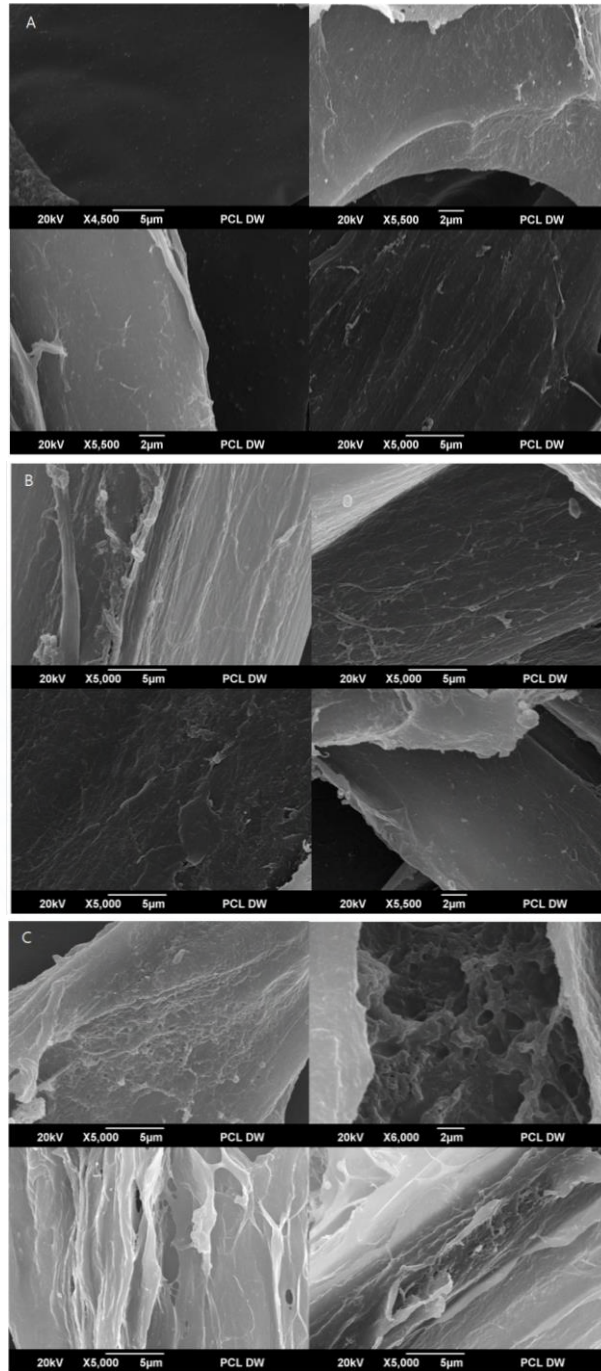


Fig. 11. SEM photographs for skeleton of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. (A) Control(400 ppm) (B) Medium(850 ppm) and (C) High(1550 ppm) concentration CO₂.

골격의 전체적인 기형 발생 정도를 확인하기 위해 각 실험구별로 5마리씩 샘플을 무작위로 추출하여 골격 염색을 실시한 후 이상이 있는 부위를 확인하였는데, 모든 실험구에서 골격 이상이 발견되었다. 주로 관찰된 기형으로는 혈관극 및 신경극 형태 이상(neural spine and hemal spine morphologic abnormality) 및 유착(conglutination), 탈락(defluvium)을 가장 많이 나타내었으며 그 이외에도 척추골 비대(vertebra auxesis) 또는 왜소증(dwarfism), 담기골 탈락(cartilage defluvium)과 같은 기타 부위의 이상을 확인하였다(Fig. 12-1, 12-2). 기형 발생률은 수온에 관계없이 이산화탄소 농도가 증가함에 따라서 증가하는 것을 확인할 수 있었다(df=2, $F=52.0$, $p=0.001$). 특히, 고수온(22°C)-고이산화탄소(1550 ppm) 실험구에서 가장 많은 기형이 나타났으며(전체 관측수의 80% 이상) 이는 수온과 이산화탄소 두 가지 영향이 동시에 나타날 경우 한 가지 영향이 나타날 때 보다 넓치 유생의 기형률을 더 많이 증가시킬 수 있다는 것을 의미한다. 하지만, 수온과 이산화탄소 농도간의 상승효과에 대한 two-way ANOVA 결과는 유의하지 않은 것으로 나타났다(df=2, $F=1.000$, $p>0.05$). 이는 저수온구(18°C)의 고농도 이산화탄소(1550 ppm) 조건에서 사육된 넓치 유생에서도 마찬가지로 높은 기형율(60%)이 나타났기 때문인 것으로 풀이된다. 실제로 이 실험구의 성장 역시 다른 실험구와 비교했을 때 통계학적으로 유의하진 않지만 평균적으로는 약간 저하되는 것으로 나타났기 때문에 고수온-고이산화탄소 실험구에 가장 부정적인 영향이 많이 나타나는 것으로 여겨진다.

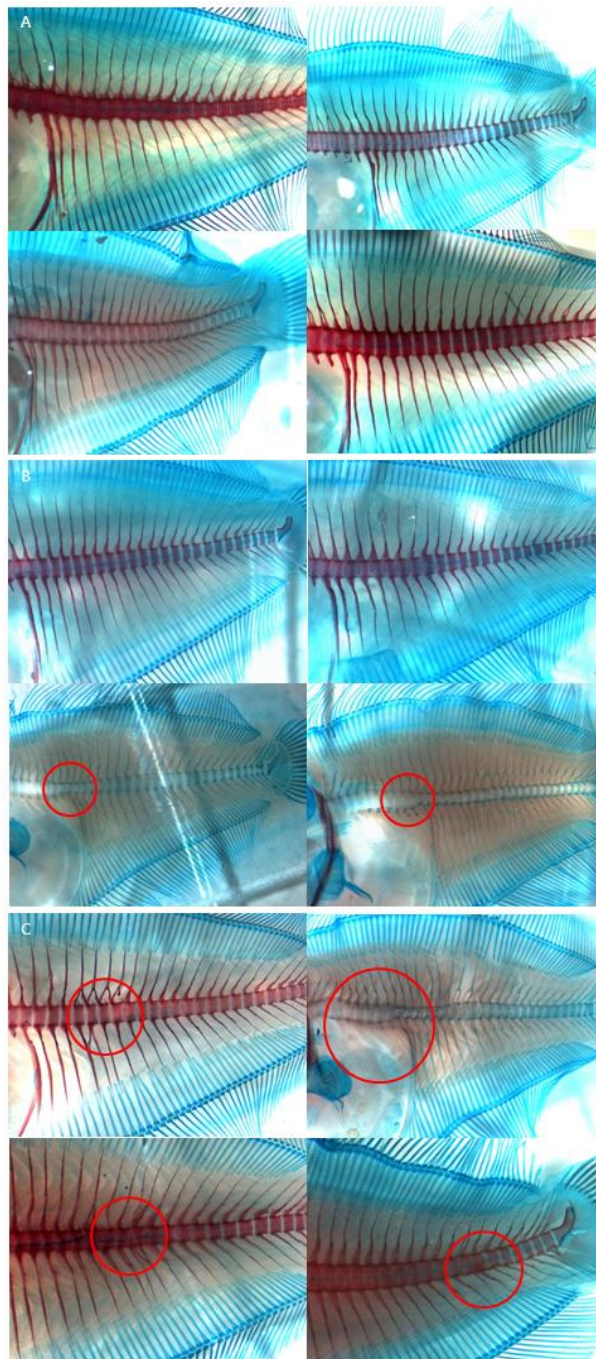


Fig. 12-1. Photographs for skeleton of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae using double staining method. Larvae reared at 18°C different CO₂ concentration : (A) Control(400 ppm), (B) Medium(850 ppm) and (C) High(1550 ppm) concentration CO₂.

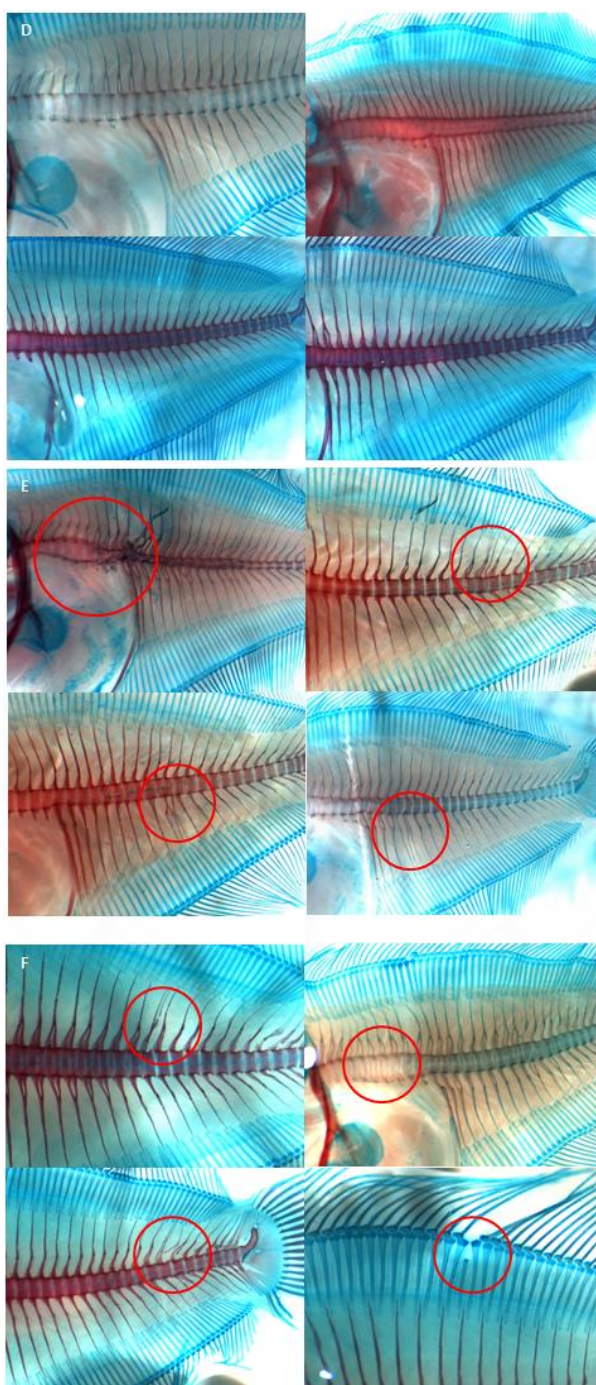


Fig. 12-2. Photographs for skeleton of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae using double staining method. Larvae reared at 22°C different CO₂ concentration : (D) Control(400 ppm), (E) Medium(850 ppm) and (F) High(1550 ppm) concentration CO₂.

Table 8. The results of statistical analysis of skeleton malformation of olive flounder *Paralichthys olivaceus* larvae reared at different CO₂ concentration and temperature

Effect	df	MS	F	p value.
CO ₂	2	0.462	52.000	.000
Temperature	1	0.109	12.250	.004
CO ₂ x Temperature	2	0.009	1.000	.397
Error	12	0.009	-	-

다. 이석성장

이석의 크기는 고수온 및 저수온구에서 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 유의하게 지름이 증가하는 경향을 나타내었으나($df=2$, $F=6.765$, $p=0.003$), 수온에 따른 유의차는 나타나지 않았다($p>0.05$)(Fig. 13-A.). 이산화탄소 및 수온의 복합적인 영향 역시 통계학적인 유의성을 나타내지 않아($p>0.05$), 이석의 성장에는 이산화탄소 농도에 따른 영향이 큰 것으로 나타났다. 또한, 이석 크기와 체장간의 비율을 비교한 결과, 이석의 크기는 고수온 및 저수온구에서 이산화탄소 크기가 증가함에 따라 유의하게 지름이 증가하는 경향을 나타내었다($df=2$, $F=4.280$, $p=0.022$). 그리고 수온에 대한 결과 및 복합적인 영향에 대한 결과도 통계학적인 유의성을 가지지 않았다(Fig. 13-B.).

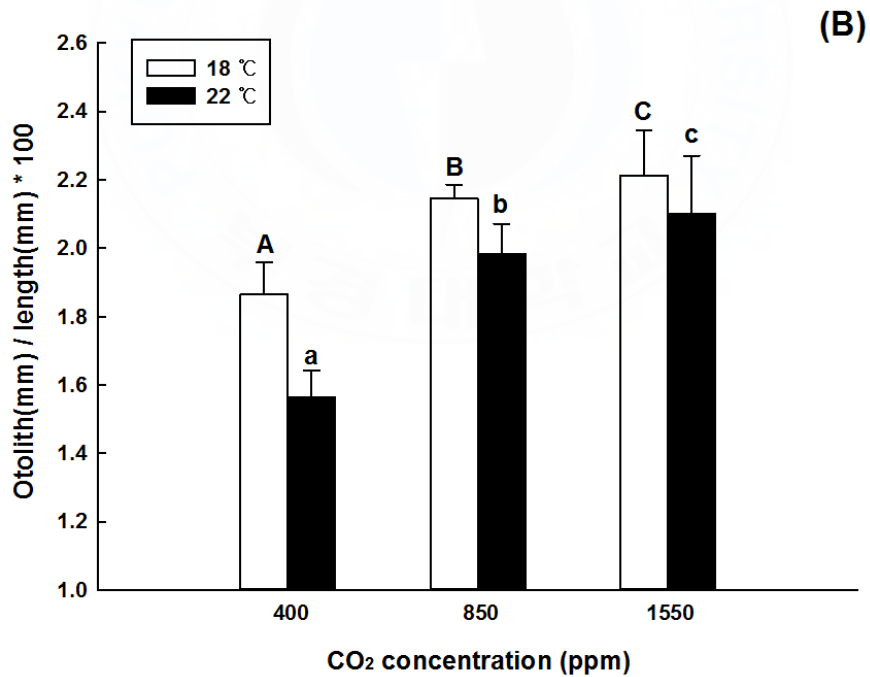
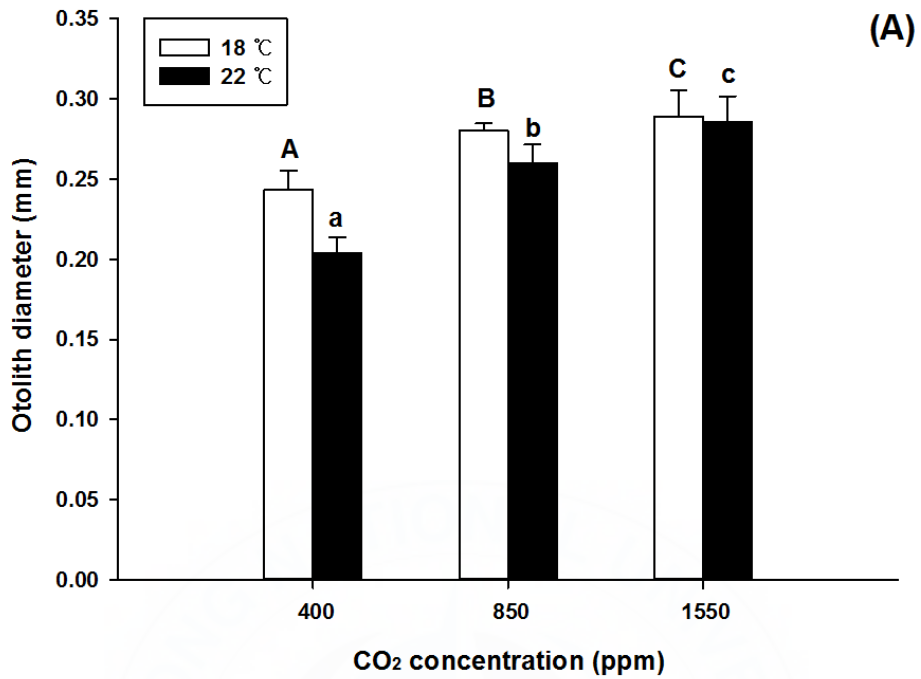


Fig. 13. Otolith size of olive flounder larvae reared at different environment conditions. (A) Otolith size (mm) and (B) ratio value for otolith/length. Significant differences between groups are indicated with different letters.

4. 고찰

1) 사육장치

본 실험에서 새롭게 고안된 실험장치는 실험조건별 특성에 맞춰 실험 설계가 가능하도록 넓은 범위의 이산화탄소 농도(0 ppm~3000 ppm CO₂) 조절 및 기타 환경조절이 가능하게 제작되었다. 또한 온도의 경우 냉각장치의 추가 장착만으로도 0°C 근처에서 생물이 살 수 있는 상한 한계수온 범위 내에서 0.5°C 단위로 조절이 가능하도록 설계됨으로서 고위도 지역이나 용승역에서 나타날 수 있는 특수한 환경 조건도 얼마든지 실험실 내에서 조성이 가능하다는 장점이 있다. 따라서 앞으로 이 장치를 이용하면 다양한 환경조건 변화 실험이 가능할 것으로 여겨진다. 실제로 본 실험장치를 이용하여 넙치 이외의 어류(점농어, 감성돔, 참돔)의 초기생활사 시기동안의 사육환경 유지에 본 장치가 사용되었으며, 이 장치를 이용하면 일반적인 수조를 사용할 때 보다 훨씬 더 정밀한 실험환경 조절이 가능하다는 것을 알 수 있었다(Shim et al., 2013).

본 실험장치에서는 고농도구로 이동할수록 수조내부 이산화탄소 농도의 편차가 증가하는 현상이 발생하였는데 이는 일반적인 대기 환경의 이산화탄소 농도에 비해 수조 내부의 이산화탄소 농도가 높기 때문에, 그만큼 높은 농도

를 일정하게 유지하는 데 많은 어려움이 있기 때문에 풀이된다. 본 실험장치에서는 이러한 문제를 해결하기 위해 밀폐형 사육수조를 사용하였으나, 실제 사육실험 도중에 먹이공급이나 성장률 측정을 위한 샘플링 등을 위해 밀폐상태가 종종 해제될 수 밖에 없는 문제가 발생하였다. 본 실험과 마찬가지로 $p\text{CO}_2$ 의 편차가 고농도구로 갈수록 증가하는 현상은 비슷한 다른 해양산성화 연구에서도 동일하게 나타나는 것으로 확인되었다(Hurst et al., 2013; Franke et al., 2011).

지구온난화 또는 해양산성화, 저산소층 형성과 같은 기후변화와 관련된 해양생물 적응 실험에서는 실험실 내의 사육 환경이 실제 자연에서 나타나고 있는, 또는 나타날 것으로 예상되는 환경조건과 얼마나 비슷하게 조성되는가가 상당히 중요한 문제이다. 그래서 최근에 출간되는 기후변화 관련 논문들은 이러한 정확도를 확인할 수 있도록 논문 내용중에 반드시 환경 측정치(용존 CO_2 농도, TA, DO, 질소산화물 농도 등)를 수록하고 있으며, 이러한 환경 유지가 잘 된 실험만을 결과로서 인정하고 있다(McGraw et al., 2010; Fanguie et al., 2010). 본 실험에서는 앞에서 이야기한 일정한 수준의 이산화탄소 농도 및 수온 유지가 가능한 장치의 개발을 통해 최근 논문들에서 요구하고 있는 조건을 충족할 수 있었다. 또한 수질관리 및 사육생물 관리 편의를 위해 작은 크기의 수조를 사용하였으며 유수 장치를 활용하여 수질관리를 지속적으로 수행하였다. 또한 본 장치에서 사용된 사육수조의 경우 상부가 투명하게 제작되어 밀폐상태를 유지하면서 사육생물의 상태 관찰이 가능하다는 장점이 있다.

본 실험에서 개발된 실험장치는 앞에서 거론한 환경연구 논문의 중요 요건인 정확한 사육환경 조절이 가능하다는 장점을 가지고 있어 향후 비슷한 주제의 실험을 다양하게 반복해서 실험하는데 활용가능하며, 특히 산성화 및 온난화 관련 어류사육 실험 분야에서 활용 가능할 것으로 예상된다.

2) 생물학적 파라미터

해양산성화가 해양생물의 부화율에 어떤 영향을 미치는가에 대한 연구는 다양한 종에서 많이 진행되어왔다(Kurihara, 2008; Fabry et al., 2008; Sawada et al., 2008). 이는 사육실험이나 생리학적 분석을 요구하는 실험에 비해 방법이 간단하고 손쉽게 결과를 얻을 수 있기 때문이다. 실제 부화율 실험 결과에서는 종에 따라서 제각기 다른 결과를 나타내는 것을 확인할 수 있는데 이는 종간 환경적응능력의 차이에 의한 것으로 알려져 있다(Kurihara, 2008; Ross et al., 2011).

본 연구의 부화율 분석에서 이산화탄소 농도가 부화율에 미치는 영향을 실험한 결과, 수치적으로 미세하게 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 부화율이 감소하는 경향이 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 그러나 통계학적으로 이산화탄소 농도간 유의한 차이가 나타나지 않았다($p>0.05$). 하지만, 재미있게도 실험 시기에 따라 부화율이 통계학적으로 유의한 차이가 나타나는 것을 확인할 수 있었다(동일 이산화탄소 농도에서 월별 비교결과: 400 ppm / $p =$

0.008, 850 ppm / $p = 0.003$, 1550 ppm / $p = 0.0001$). 이는 각 월별로 사용된 수정란을 생산한 개체가 다르기 때문에 나타난 결과라고 생각된다. 즉, 부모 개체의 차이가 그들의 후손에 영향을 주는 것이 환경의 영향보다 더 크게 작용한다는 것을 의미하는데, 이러한 현상은 본 연구뿐만 아니라 다양한 연구에서도 동일하게 관찰된다.

청어(Atlantic Herring)와 대구(Baltic cod)의 경우에도 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 조금씩 부화율이 낮아지는 경향이 관찰되었으나, 본 실험과 마찬가지로 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다(Franke et al., 2011; Frommel et al., 2013). 오히려 수정란 집단에 따른 차이가 더 크게 나타나는 것으로 관찰되었으며, 이러한 경향은 orange clownfish, 명태와 같은 다양한 종에서도 관찰되고 있다(Munday et al., 2011b; Hurst et al., 2013). 하지만, 해양의 이산화탄소 농도와 산소 농도 조건을 변화시키면서 흑점줄전갱이의 부화율을 실험한 결과, 산소 농도가 포화상태일 경우라 할지라도 이산화탄소 농도가 120mg/L(약 pH 6.2)까지 증가할 경우에는 부화율이 감소하는 경향이 관찰되었으며, 부화된 개체 중에서도 기형개체가 많이 관찰되고, 부화후 얼마 지나지 않아 사망하는 개체가 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 그리고 이러한 경향은 고이산화탄소 환경에 노출되는 시간이 길어짐에 따라 증가하는 것으로 나타났으며, 이와 동시에 저산소 환경에서는 부화율이 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Sawada et al., 2008). 이러한 결과들은 현재 일부 해역에서 나타나고 있는 고이산화탄소 환경과 저산소 환경의 동시 발생이 어류의 부화율에

부정적인 영향을 미치게 될 수 있다는것을 암시한다. 실제로 해양환경 중 생활하수나 오수가 많이 배출되는 내만의 경우, 계절 및 시기에 따라 일시적으로 저산소-고이산화탄소 환경이 조성되는 경우를 볼 수 있다. 이러한 일시적인 노출로도 수정란의 부화율이 감소할 수 있기 때문에 특정 어류의 산란시기 및 발달시기와 산란수역의 환경변화는 부화율뿐만 아니라 나아가 그 어종의 자원량 변동과 밀접하게 관련될 가능성이 높을 것으로 여겨진다. 문제는 이러한 고이산화탄소-저산소 환경이 실제로 나타나고 있으며 그 빈도는 점점 증가하고 있기 때문에 이에 대한 대책 마련이 필요하다.

생존율 실험 결과, 산성화와 생존율 간에는 통계학적인 유의성이 나타나지 않았다. 오히려 실험 시기별로 생존율이 수치적으로 상당한 차이를 나타내었는데, 이는 3회에 걸친 동일 실험 중 사용된 넙치의 수정란이 동일한 부모에게서 나온 것이 아니기 때문에 각 산란군별로(batch) 나타날 수 있는 차이인 것으로 여겨진다(Hurst et al., 2013) 비슷한 조건에서 실시된 실험에서도 다양한 이산화탄소 조건($300 \sim 2100 \mu\text{atm CO}_2$)에서 부모가 다른 명태의 수정란~치어를 사용하여 생존율 실험을 실시한 결과 이산화탄소 농도별로는 통계학적인 유의성을 찾아볼 수 없었지만, 오히려 부모 그룹의 차이에 따라(batch에 따라) 생존율에서 통계학적으로 유의한 차이가 나타나는 것을 확인하였다(Hurst et al., 2013). 또한 orange clownfish *Amphiprion percula* 를 이용한 실험에서도 유생의 생존율에 유의한 영향을 미치는 것은 산성화된 환경이 아닌 산란군 집단인 것으로 나타났다(Munday et al., 2011b). 하지만 모든 실험에서

이러한 결과가 나타난 것은 아니다. 사육환경의 이산화탄소 농도가 증가할수록 생존율이 감소하는 경우도 나타났으며(Hwang et al., 2009; Baumann et al., 2012), spiny damselfish(Munday et al., 2011b), 명태(Hurst et al., 2012), cobia(Bignami et al., 2013b), 대구(Frommel et al., 2012; Moran et al., 2011), three-spined stickleback(Jutfelt et al., 2013)과 같은 종들에서는 이산화탄소 농도가 증가하거나 감소하여도 생존율에 아무런 유의한 영향을 미치지 않는 경우도 나타났고, Baltic cod *Gadus morhua* 를 대상으로 한 산성화 실험에서는 사육환경의 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 유생의 생존율이 약간 증가하는 결과를 나타내기도 하였다(Frommel et al., 2013). 또한 동일한 종을 대상으로 극단적으로 높은 이산화탄소 농도(8,500 $\mu\text{atm CO}_2$) 에서 생존율을 조사한 결과, 이산화탄소 농도와 생존율 간에 유의한 관계가 없는 것으로 밝혀졌다(Moran et al., 2011). 이러한 결과는 앞에서 본 결과와 대조되는 것이라 할 수 있다. 이처럼 동일한 어류 내에서도 다른 결과를 나타내는 것은 어류 각 종별로 또는 성장 단계별로 수온 또는 용존 이산화탄소 농도 변화에 대한 적응능력이 각각 다르기 때문인 것으로 추측된다. 지금까지 연구된 결과들을 종합해 보면, 약한 산성화(2000 $\mu\text{atm CO}_2$ 이하)는 일반적으로 생존율에 큰 영향을 미치지 못하지만, 만약 어류가 수정란 시기나, 그들을 산란한 부모가 고 이산화탄소 환경에 노출되었을 경우에는 다른 결과를 가져올 수 있다는 것을 암시하고 있다. 향후 생존율에 미치는 산성화의 영향을 관찰하기 위한 실험에서는 이러한 사실에 주목하여 실험을 진행할 필요가 있을 것으로 보인다.

체장과 체중은 생물의 성장을 나타내는 지표로 가장 많이 사용되고 있는 형질이다. 이러한 체장과 체중은 생물이 어떤 환경에서 지내왔는가를 직접적으로 드러내주는 수치로서, 만약 동일한 종이라 할지라도 어떤 개체가 자신에게 적합하지 않은 환경에서 살아왔다면 최적의 환경에서 살아온 개체보다 성장이 더디게 진행되었을 가능성이 높고, 그에 따라 체장과 체중이 다른 개체와 비교했을 때, 작게 나타날 가능성이 높다. 본 연구에서는 각각 다른 환경에서 사육한 넙치 유생의 체장 및 체중이 어떻게 변화하는지를 알아보았는데, 그 결과 현재 한국 주변 수역의 평균 수온인 18°C 에서는 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 체장 및 체중이 통계학적으로 유의하게 증가하는 현상을 보였다($p < 0.05$). 이러한 현상은 다양한 이론들로 설명할 수 있다. 산성화된 환경에서 유생의 식욕증진, 그에 따른 먹이섭이율 증가(Morgan et al., 2001; Munday et al., 2009b), 유영능력의 향상과 그로 인한 먹이포획 성공확률의 증가와 포식자 회피능력의 향상(Munday et al., 2009b)과 같은 이론들은 이산화탄소의 증가가 유생의 체장 및 체중 증가에 있어 긍정적인 영향을 나타낸다고 주장하고 있다. 또한 이러한 현상은 orange clownfish 유생(Munday et al., 2009b) 및 cinnamon anemonefish 유생(부모 역시 1,032 $\mu\text{atm CO}_2$ 에 노출됨)(Miller et al., 2012)에서도 동일하게 나타났다.

하지만, 21세기말에 나타날 것으로 예상되는 한국 주변 수역의 평균 수온인 22°C 에서는 오히려 이산화탄소 농도가 증가할수록 체장 및 체중이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 현재 수온에서는 이산화탄소 농도의 증가

가 체장과 체중 증가를 촉진시키는 것을 의미하지만, 수온상승이 동시에 진행된다면 반대로 체장과 체중이 감소한다는 것을 의미한다. 이러한 현상은 앞에서 거론된 다른 결과들과 마찬가지로 최적 온도창 이론으로 설명가능한데, 이들이 서식하는데 요구되는 최적의 환경조건을 벗어난 수온과 이산화탄소 농도 증가가 동시에 나타날 경우 이들이 적응할 수 있는 환경수준을 벗어나기 때문으로 여겨진다(Pörtner, 2008). 이러한 성장저해현상은 estuarine inland silverside($780 \mu\text{atm } CO_2$)와 cinnamon anemonefish($1,032 \mu\text{atm } CO_2$)에서도 동일하게 나타났지만, 두 실험에서는 온도 조건을 다루지 않았기 때문에 본 실험과 직접적인 비교는 어려운 측면이 있다(Baumann et al., 2012; Miller et al., 2013).

본 실험에서는 넙치의 초기 생활사만을 다루었으나, 변태 완료 및 착저 이후의 넙치에 대한 이산화탄소 노출 실험에서는 고농도 이산화탄소 조건(pH 6.49~7.23)의 경우 대조구(pH 7.66~8.34)에 비해 체장 및 체중 증가가 더딘 것으로 나타났다(Hwang et al., 2009). 이는 유생기 넙치의 실험결과와 상반되는 내용이며, 이는 넙치의 경우 성장함에 따라 이산화탄소 농도라고 하는 환경의 변화에 적응할 수 있는 능력에 변화가 발생하는 것으로 생각할 수 있다.

이러한 체장, 체중과 함께 성장지표로서 많이 사용되는 성장율은 생물이 어떠한 환경에서 살아왔는가를 확인하기 위해 사용된다. 살기에 적합한 환경에서 살아온 개체의 성장율은 그렇지 않은 개체에 비해 더 높은 성장율을 나타내게 된다. 본 실험에서도 그런 환경의 영향을 파악하기 위해 먹이 및 수질

과 같은 조건은 모든 실험구에서 동일하게 유지한 상태에서 수온과 pH의 변화만을 조절하면서 성장율에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 실험을 수행하였다. 그 결과 지금 현재 넙치가 서식하는 환경의 평균수온인 18°C 조건에서는 이산화탄소 농도가 증가함에 따라서 성장율 또한 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 21세기말에 나타날 것으로 예측되는 넙치 서식수역의 평균수온인 22°C에서는 오히려 그런 경향이 없어지고, 고농도구(1550 ppm)에서 성장율이 감소하는 것으로 나타났다.

이산화탄소 농도 증가에 따른 성장 촉진은 몇몇 연구에서 동일한 결과가 나타났는데, Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* 은 이산화탄소가 증가된 환경에서 그들의 식욕이 좀 더 증가하여 많은 먹이를 먹게 되어 성장이 촉진된다고 알려져 있다(Morgan et al., 2001). 이러한 식욕촉진 현상은 생물이 성장에 필요한 여유 에너지를 많이 축적할 기회를 제공하기 때문에, 일반적인 환경에 있는 어류에 비해 성장이 촉진되는 것으로 알려져 있다(Munday et al., 2009b). 하지만, 실제로 본 연구에서는 넙치유생을 대상으로 이산화탄소 농도에 따른 섭이량의 차이에 대한 조사를 실시하지 않았기 때문에 확실한 증거를 얻기 위해서는 이산화탄소 농도에 따른 섭이율 측정이라는 추가적인 실험이 필요하다.

또한 어류의 성장은 다양한 호르몬에 의해서 영향을 받기도 한다. 본 실험에서 나타난 이산화탄소 농도 차이는 사육환경의 수소이온 농도차이를 유발하게 되는데, 이를 조절하기 위해 어류는 다양한 삼투압 조절현상을 나타내게

된다. 이러한 어류의 삼투압 조절현상에는 다양한 호르몬이 관여하고 있는데, 해수적응이나 고농도 환경에서 항상성을 유지하기 위해 주로 작용하는 호르몬은 cortisol과 growth hormone이 있다. 실제 뱀장어나 연어를 담수에서 해수로 옮기면 혈중 cortisol 농도가 상승하는 현상이 관찰되는데, 이는 Na^+/K^+ -ATPase의 활성을 높여 체내로 유입되는 과량의 이온을 제거하는데 기여한다. 또한 cortisol은 아가미에 작용하여 해수형 염류세포의 분화를 촉진함과 동시에 장에서 이온 및 물의 흡수를 증대시켜 체내 이온농도 조절에도 관여한다(Chan and woo, 1978; Yamano et al., 1999). 또한 growth hormone도 해수적응에 관여하는데, 연어과 어류나 틸라피어를 담수에서 해수로 이동시키면 성장호르몬의 혈중 농도가 상승하게 된다. 성장호르몬이 삼투압 조절기관에 미치는 작용은 성장촉진 작용과 마찬가지로 간에서 생성되는 insulin-like growth factor (IGF-1)를 통한 것이라고 추측되고 있다. IGF-1은 연어과 어류의 아가미에서 Na^+/K^+ -ATPase의 활성을 높여 해수적응력을 향상시킨다고 알려져 있다. 성장호르몬은 간에서의 IGF-1 생성을 촉진시킬 뿐만 아니라, 아가미에서도 성장호르몬의 작용에 의해 IGF-1이 만들어진다. 이와 같이 성장호르몬은 체내에서 성장촉진과 삼투압 조절이라는 전혀 다른 2가지 작용을 한다. 은 연어나 틸라피아는 담수보다 해수에서 성장이 좋은 것으로 나타나는데, 이것은 해수에 적응하기 위해 분비되는 성장호르몬이 삼투압조절 호르몬으로서 작용하는 것과 동시에 성장을 촉진하기 때문이라고 해석될 수 있다. 본 실험에서도 넙치의 경우 이산화탄소 농도의 증가로 성장이 촉진되는 결과를 나타내

었는데 이러한 현상 역시, 앞에서 예를 든 은연어나 틸라피아의 경우와 마찬가지로, 체내 수소이온 농도의 증가에 따른 Na^+/K^+ -ATPase의 활성 및 growth hormone의 작용에 의한 넙치 유생의 환경 적응기작과 동시에 성장까지 촉진되는 결과로 여겨진다(Reinecke et al., 1997; Link et al., 2010). 본 실험에서 먹이량은 항상 풍부하게 유지되었기 때문에 넙치 유생이 충분한 양의 먹이 섭취와 영양소 공급이 가능한 상황에서 growth hormone의 작용에 의해 성장 촉진이 강하게 나타난 것으로 여겨진다.

또한 본 실험에서 이산화탄소 농도 변화 또는 수온의 변화는 넙치 유생의 비만도에 아무런 유의한 영향을 나타내지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 명태유생을 대상으로 한 사육 실험에서도 비슷하게 나타났는데, 명태 유생의 경우 사육수 내의 이산화탄소 농도 증가에 따라 성장이 증가하는 현상을 보였으나 비만도에는 아무런 변화가 나타나지 않았을 뿐만 아니라 섭이율의 증가 또한 나타나지 않았는데, 이것은 이들의 성장이 증가한 것은 먹이 섭취가 증가했기 때문이 아니라 체내 에너지 배분에 변화가 나타났기 때문이라고 설명하고 있다(Hurst et al., 2012). 즉, 이산화탄소 농도에 상관없이 먹이를 먹는 양은 동일 연령 및 동일 체중에서 같거나 비슷하게 나타나기 때문에, 동일한 에너지원에서 얻은 비슷한 양의 에너지가 어류의 체내에서 길이성장, 무게성장, 물질대사, 운동에너지 소비와 같은 다양한 방향으로 소비되는 비율의 차이가 비만도의 차이로 나타나는 것으로 생각할 수 있다.

한편으로, 이산화탄소 농도 증가와 같은 환경변화에 적응하기 위해 어류의

체내에서 생리적 변화가 일어나고, 그에 따라 에너지 효율 감소가 나타날 가능성이 있다. 또한 이들의 복잡한 생리학적 적응 기작에 소요되는 에너지의 다양한 사용경로(성장, 운동, 소화, 생식등)에 배분되는 에너지의 비율이 달라지는 현상에 의해 성장이 촉진되거나 감소될 수 있고, 본 실험 대상종인 넙치 유생의 경우 이산화탄소 농도 증가에 따라 약간의 체장 증가가 나타나지만 그 증가에 따른 체중증가량은 크지 않았기 때문에 비만도에 유의한 차이가 나타나지 않은 것으로 생각된다. 이러한 현상은 어류 체내의 다양한 삼투압 조절 대사경로 중 성장 호르몬 및 코티졸 호르몬이 관여하는 부분(Mancera et al., 1998; McCormick, 2001)이 활성화 될 경우 삼투압 조절이라는 주 목적에 부가적으로 성장 증가나 운동에 따른 대사량 증가와 같은 현상에도 어느정도 영향을 미치기 때문에, 결과적으로 성장의 증가 또는 에너지 소비량 증가와 같은 현상이 발생하게 되며, 결과적으로 비만도는 감소하거나 아무런 영향을 받지 않는 것으로 보인다.

3) 조직 및 골격분석

가. 조직

본 실험에서 사용된 넙치 유생의 경우 환경의 변화(수온상승, 이산화탄소

농도 증가)로부터 자신을 보호하기 위한 feedback 작용의 결과로 나타난 몇몇 기관의 이상 징후를 관찰할 수 있었다. 일반적으로 어류는 아가미와 신장을 통한 중탄산염 완충작용(bicarbonate buffering)을 통해 체내의 산-염기 조절을 수행하게 된다(Gilmour et al., 2009; Perry et al., 2006). 만약, 주위 환경의 이산화탄소 농도가 증가하여 체내 pH가 감소하게 된다면 아가미와 신장에서 중탄산염 완충작용이 활발하게 일어나게 되는데, 이러한 과정에서 두 기관에는 과다한 활동으로 인한 피로누적이 발생하게 된다. 그로 인해 다양한 이상 징후가 관찰되었는데, 신장에서는 renal tubules와 결합조직 사이에 vacuoles가 관찰되었으며, 신장 결합조직의 hyaline droplet degeneration이 나타나는 것을 확인하였다. 그리고, 전체적으로 renal tubules의 외곽을 둘러싸고 있는 neck cells의 결합이 느슨해져 윤곽이 희미해져 있는 경향이 나타났다. 눈에서는 pigmented layer 와 basement membrane과의 사이에 gap이 형성되는 현상이 발견되었으며, pigmented layer의 밀도가 낮아지는 현상이 관찰되었다. 이러한 현상들은 대조구 개체 및 참고한 histopathology 관련 문헌들에 실린 정상 개체 조직에서 나타나지 않는 현상으로, 이러한 현상이 나타나게 된 원인이 산성화와 같은 외부환경의 변화라는 것을 추측할 수 있다.

또한, 고농도 사육조건에서 사육된 넙치 유생의 간에서는 blood congeation 현상이 나타났을 뿐만 아니라 hepatocytes hypertrophy 현상 및 glycogen and lipid vacuoles가 비대해지는 현상을 확인할 수 있었다. 이로 인해 고농도 실험구에서는 대조구에 비해 hepatocyte의 관찰이 어려웠다. 이러

한 현상은 흔히 지방간이라는 병명으로 부르기도 하지만, 동일한 현상이라고 결론짓기 위해서는 좀 더 다양한 추가실험이 필요하다.

아가미의 경우 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 primary filament와 secondary lamellae가 비대해지는 현상이 나타났으며, primary filament와 아가미 기저부의 연결부위에서 chloride cell이 관찰되었는데, 이산화탄소 농도 증가에 따라 관찰되는 chloride cell의 숫자가 증가하고 세포의 크기가 커지는 경향이 관찰되었다. 특히 chloride cell은 어류에서 삼투압 조절에 중요한 역할을 수행하는 기관인데, 이들의 활동이 활발하게 이루어지게 되면 크기가 커지고 세포수가 증가하는 현상을 흔히 살펴볼 수 있으며(Sasai et al., 1998), 이는 어체 내에서 염류 수송이 활발하게 일어나고 있다는 것을 반영한다.

실제로 비슷한 연구에서 Atlantic cod의 larvae를 380, 1,800, 4,200 μatm CO_2 에서 7주간 사육한 후 조직을 관찰한 결과, 고수온 그룹에서 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 primary filament의 숫자가 증가하고, secondary lamellae가 새롭게 생겨나는 것이 관찰되었다. 신장에서는 pronephric tubules 의 위축현상이 관찰되었으며 눈에서는 pigmented layer의 비정상적인 윤곽이 관측되는 등 다양한 조직학적 이상 현상이 관찰되었다(Frommel et al., 2012). 그리고 본 실험에서 실험대상어로 사용된 넙치와 같은 속에 속하며 대서양에 서식하는 Summer flounder *Paralichthys dentatus* 를 본 실험과 비슷한 조건에서 사육한 결과, 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 간, 신장과 같은 기관에서 조직학적 이상이 관찰되는 것을 확인하였다(Chambers et al., 2014).

중요한 사실은, 이런 조직학적 이상 징후가 고수온 실험구에서 더 빈번하게 발생되었다는 것이다. 저수온구에서는 1550 ppm 실험구에서만 몇몇 기형발생이 관찰되었는데, 이는 최적 온도 창 이론(optimal thermal window hypothesis)으로 설명할 수 있다(Pörtner, 2008). 일반적으로 어류는 자신이 생존할 수 있는 최저 수온과 최고 수온의 범위가 있다. 이를 생육 가능수온이라고 한다. 하지만 그 온도 범위 내에서도 어류의 성장, 대사, 운동에 있어 최상의 조건을 나타내는 수온 범위가 있는데 이를 최적 생육 수온이라고 한다. 최적 생육 수온 내에서는 수온 외의 환경조건(이산화탄소 농도, 염도 등)이 변동된다 하더라도 비교적 넓은 범위의 변화에서 적응하여 생존할 수 있지만, 최적 생육 수온 이상 또는 이하의 수온조건에서는 이들이 수온 이외의 환경의 변화에 견딜 수 있는 범위가 축소되게 된다. 즉, 최적 생육 수온에서는 이산화탄소 농도가 1550 ppm 까지 증가하더라도 체내 기관이 감당할 수 있는 범위내이지만 그 수온 범위를 벗어났을 경우에는 1550 ppm 의 이산화탄소 농도는 어류의 유생이 체내의 적응기작 없이는(gill filament 및 lamellae 증가, kidney변화) 적응할 수 없는 수준이 되어버리는 것이다. 본 실험에서 나타난 조직학적 이상 징후 역시 최적온도창 이론으로 설명가능하며, 대기 중 이산화탄소 농도 증가에 따른 해양산성화 또는 지구온난화 중 하나의 현상만 두고 볼 때는 어류의 유생이 적응할 수 있는 여지가 있으나, 두 가지 현상이 동시에 나타날 때에는 적어도 넓치 유생의 경우 심각한 부정적인 영향을 받을 가능성이 증가하게 된다.

나. 골격

어류를 포함한 대부분의 해양생물의 골격을 구성하는 주성분은 탄산칼슘이다. 이러한 탄산칼슘에는 calcite와 aragonite 두 종류가 있는데, 모두 생물에 의해 합성되는 종류이다. 이 두 탄산칼슘을 구분하는 것은 결정구조의 차이로 calcite에 비해 aragonite가 산성화된 환경에서 더 잘 녹는것으로 알려져 있다 (Orr et al., 2005). 그리고 해양산성화에 취약한 대부분의 생물들은 골격을 구성하는 탄산칼슘의 결정구조가 aragonite인 것으로 알려져 있다.

무척추동물의 경우, 대부분이 외골격을 가지기 때문에 해양산성화 환경에서 내골격을 가지는 어류에 비해 골격을 유지하는 것에 어려움을 겪게 된다. 이는 산성화 환경에서 이들의 탄산칼슘 골격이 성장하는 속도보다 해수중으로 녹아들어가는 속도가 더 빨라지기 때문이다(이러한 현상이 생기는 이유는 해수가 탄산칼슘에 대해 불포화 되어 있기 때문이다). 이로 인해 일반적으로 패류의 경우 산성화 환경에서 성장이 저해되거나 사망률이 증가하는 것으로 알려져 있다(Gazeau et al., 2013).

또한, 일반적으로 어류의 기형은 양식현장에서 많이 나타나기 때문에 양식대상종에 대한 기형 연구는 많이 이루어지고 있다(Andrades et al., 1996; Hattori et al., 2003; Fjellidal et al., 2007). 양식장의 서식환경은 자연상태의 해양

환경과 많은 차이가 있다. 주로 나타나는 차이는 낮은 저산소 환경 노출, 높은 이산화탄소 농도와 높은 암모니아와 같은 유기물 농도, 좁은 서식공간으로 인한 운동 저하 등이 있으며, 이러한 환경에 노출되는 것은 양식어류의 기형 발생율을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Andrades et al., 1996; Hattori et al., 2003). 문제는 이러한 양식장 환경에서 종종 나타나는 조건이 최근에는 기후 변화로 인해 자연환경에서도 몇몇 특정한 해역에서 이미 나타나고 있다는 것이다. 어류의 경우 산성화 환경에 노출되더라도 골격유지에 있어서 무척추동물 보다는 적은 영향을 받는것으로 알려져 있으나, 실제 본 연구에서는 용존 이산화탄소 농도가 증가함에 따라서 다양한 골격 이상이 관찰되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 수온 상승과 이산화탄소 농도 증가가 동시에 나타났을 경우에는 기형개체의 출현빈도가 증가하였는데, 이는 다른 무척추동물에서도 나타나는 현상이며, 정도의 차이는 있겠지만 어류에서도 동일하게 나타난다 (Gazeau et al., 2013; Frommel et al., 2013; Mu et al., 2005). 이러한 골격이상은 동일한 환경이라도 생물종에 따라 다르게 나타나는 경우가 많으며 이들이 얼마나 변화된 환경에 잘 적응하여 살아남을 수 있을지는 우수한 유전형질, 지속적인 극한환경 노출에 의한 적응, 먹이 공급과 기타 서식환경의 역할 등이 큰 영향을 미치게 된다.

하지만, 본 실험에서는 넙치 유생의 골격이상 발생 빈도가 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 함께 증가하는 것으로 나타났다. 또한 그와 동시에 성장율은 오히려 증가하는 것으로 나타났다. 이는 넙치 유생에게 있어서 해양산성

화의 영향은 서식환경의 탄산칼슘 포화도를 낮춰 골격이상을 가져오기는 하지만 이것이 성장의 저해로까지는 이어지지 않는다는 것을 의미한다. 용존 이산화탄소 농도 증가에 따른 빠른 골격의 성장은 Atlantic salmon smolts *Salmo salar* L. 을 대상으로 한 실험에서 이미 밝혀진 바 있다(Martens et al., 2006). 이 실험에서 Atlantic salmon의 smolt는 서식환경의 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 성장이 촉진되는 결과를 나타내었으며, 이러한 빠른 성장은 골격에서 비경골화된 뼈의 성장을 촉진시키는 것으로 나타났지만 이것이 경골화되는 속도가 뼈의 성장을 따라가지 못하기 때문에 기형이 나타나게 된다고 설명하고 있다. 이러한 내용은 본 연구에서 나타난 이산화탄소 농도 증가에 따른 성장 증대와 기형증가라는 결론을 뒷받침해준다. 그리고 결과로 나타내지는 않았지만, 체내 미량원소 변화 결과에 맞춰서 해석하면 이러한 기형이 나타난 원인은 이산화탄소 농도 변화에 따른 골격 구성 물질(수산화인회석 및 인산칼슘)의 구성비가 변화하여 이것이 골밀도에 영향을 미치게 되고, 결과적으로 골격 이상 현상이 발생할 수 있다는 가설을 생각해 볼 수 있다. 하지만 이러한 가설은 실험을 통한 검증이 필요하다.

다. 이석성장

이석은 어류의 labyrinth organ 내에 위치하고, 아라고나이트와 단백질 복합체로 구성되어 있으며, 소리를 듣거나 운동시 평형을 감지할 수 있도록

하는 감각기관이다. 어류의 이석은 보통 부화 전(배 발달기)에 이미 형성되어 있으며(Panella, 1971), 성장함에 따라 모양과 크기가 변하게 된다. 보통 외골격을 가지는 해양생물이나 조개류의 경우 외부환경(해수)의 화학적 변화에 의해 그들의 골격에 직접적으로 영향을 받지만, 이석은 내이라고 하는 기관 안에 위치하여 외부환경으로부터 격리되어 있다. 하지만, 이석의 형성은 외부환경에 영향을 덜받는 대신 endolymph의 화학적 구성에 의해 영향을 받게 되는데, 이석이 성장하기 위해서는 endolymph가 반드시 아라고나이트에 대해 과포화 상태여야 한다. 이처럼 이석 형성에 영향을 미치는 아라고나이트의 포화도는 주위 환경의 탄산염 이온 농도와 밀접한 관련이 있는데, 이 탄산염 농도는 pH에 크게 좌우되는 특성을 가지고 있다. 즉, endolymph의 pH조절은 아라고나이트의 결정화(crystallization)에 영향을 미치는 중요한 부분이라고 할 수 있다(Takagi et al, 2002). 해수 용존 이산화탄소 농도가 증가하게 되면, 중탄산염 이온의 농도는 감소하게 되며, 탄산염 이온의 농도는 그보다 더 많이 감소하게 된다. 그러나 중탄산염 이온 농도는 항상 높은 수준으로 유지되며 알과 유생의 이온 조절 능력에 결과적으로 큰 영향을 주지는 않을 것이다. 하지만, 몇몇 연구에서 고이산화탄소 환경에서 어류의 이석 크기가 증가하는 경향이 관찰되었는데, white sea bass의 유생을 993과 2558 μatm CO_2 에 7일간 노출시켰을 때, 대조구에 비해 고농도구의 이석의 크기가 증가한 것을 확인할 수 있었으며, orange clownfish의 유생을 1721 μatm CO_2 에 노출시켰을 때 역시, 대조구에

비해 고농도구에서 이석의 크기가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 해수의 산성화는 어류 이석의 형태에도 영향을 미쳐 전체적인 모양의 변형을 가져오게 되는데, 이는 이들의 행동 및 음향기능에 부정적인 영향을 미쳐 결국 이들의 생존 가능성을 감소시키게 된다(Bignami et al., 2013a; Reveillac et al., 2015).

본 실험에서도 역시 이산화탄소 농도에 따른 이석 성장의 차이를 비교하였는데, 사육환경의 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 넙치 유생의 이석 크기가 증가하는 현상이 관찰되었다(Fig. 13). 이는 앞에서 예를 든 white sea bass 및 orange clownfish 두 종 이외에도, 800 μatm CO_2 에 노출된 cobia(Bignami et al., 2013b), 1800 μatm CO_2 에 노출된 Atlantic cod(Maneja et al., 2013) 그리고 478 μatm CO_2 에 노출된 명태(Hurst et al., 2012)에서도 동일하게 관찰되었다.

이들 연구들에서 나타난 분석내용을 토대로 본 실험의 결과를 해석하면, 이석 성장의 증가는 증가된 체액 P_{CO_2} 와 HCO_3^- 수준을 반영한 결과라고 말할 수 있다. 즉, 산성화 환경이라고 하는 특수한 환경에 처하게 된 넙치의 내이 내부에 존재하는 endolymph의 HCO_3^- 농도가 증가하였으며, 그로 인해 대조구에서 사육된 넙치 유생보다 이석 크기가 증가할 수 있는 환경이 조성되었다는 것을 의미한다. 그리고 이러한 체액의 HCO_3^- 농도 증가는 서론에서 설명한 것과 같이 어류의 다양한 산성화 적응 기작들(세포 내, 외부 pH조절기작, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 활성화, 각종 운반체 단백질들의 활성화 등)에 의해

나타나게 된다. 즉, 본 실험에서 나타난 이산화탄소 농도 증가에 따른 넙치 유생 이식 크기증가는 넙치 유생이 변화한 환경에 적응하는 과정에서 나타나는 하나의 생리학적 결과라고 말할 수 있다.

4) 기타

결과로 나타내지는 않았지만, 본 연구에서는 어체 전체의 미량금속 농도를 측정한 후 그 농도 차이가 의미하는 생리학적 해석을 시도하였다. 넙치 유생 체내에 존재하는 화학원소 분석을 수행하여, 총 13종의 화학원소를 분석한 결과 4개 원소(P, Ca, Na, K)의 체내 농도가 월등하게 높게 나타났다(Appendix 2). 이것은 체내에 이들 원소가 풍부하게 존재한다는 것을 의미하는데 4개 원소 중 나트륨과 칼륨은 체내에서 전해질로서 각종 생리적인 현상에서 중요한 역할을 담당하며 해수 내에도 많은 양이 존재한다(Na: 10717 ppm; K: 385 ppm / 해수 염분 35 psu 기준). 넙치 체내에서 나타난 이들 두 원소의 양을 확인한 결과 칼륨의 양이 해수에 비해 평균 40배 이상 높게 나타났는데 이는 칼륨이 해수에서 넙치의 체내로 농축되었다는 것을 의미하며 이러한 현상은 해수에 비해 2배 정도의 농축을 보인 나트륨에 비해 현저하게 높은 것으로 나타났다. 이러한 현상은 칼슘과 인에서도 동일하게 관찰되었다. 칼슘과 인 역시 체내에서 필수적인 원소로서 중요한 역할을 하는데 칼슘의 경우 골격을 구성하는 주요 성분으로서 가장 큰 역할을 가지며 체내 칼슘의 99%는 뼈에 존재하며

나머지 1%만이 체액내에서 다양한 효소의 촉매작용을 한다. 인은 골격(인산칼슘)뿐만 아니라 체내 인지질, ATP, 핵산(DNA, RNA)을 이루는 원소로서 중요하게 여겨지고 있다. 체내에 존재하는 인의 85~90%는 인회석의 형태로 뼈에 존재하고 있으며, 칼슘과 인은 보통 염도 35 psu 인 해수에 각각 385 ppm 및 70 ppb 의 농도로 존재하는데 비해 넙치 유생의 체내에서는 각각 17641 ppm 및 20069 ppm 의 농도로 존재하는 것으로 나타났으며 이는 나트륨과 칼륨에 비해 현저하게 높은 체내 농축 현상을 보여준다.

위에서 기술한 것처럼, 이러한 미량금속의 체내와 외부 환경간 농도 차이와 넙치의 체내에 존재하는 칼슘과 인은 대부분 골격에 위치한다는 사실을 토대로 본 실험에서 나타난 실험구별 칼슘과 인의 농도를 살펴보면, 저수온구에서는 이산화탄소 농도에 따른 두 원소의 변화 경향이 비슷하게 나타나는 것을 확인할 수 있다(1550 ppm 에서 가장 높은 수치, 그 다음으로 400, 850 ppm 순). 그러나, 고수온구에서는 다른 결과가 나타났는데, 인의 경우 대조구에서 가장 높은 경향을 나타낸 반면, 칼슘은 고농도구에서 가장 높은 농도를 나타내었다. 특히 칼슘은 동일한 이산화탄소 농도에서는 수온이 증가함에 따라 그 농도가 크게 증가하는 경향을 드러내었으며, 이러한 경향은 체장 측정 결과에서 나타난 400 ppm CO₂-고수온구의 성장 촉진과 일치한다.

뼈는 가장 기본적으로 수산화인회석 $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ 및 인산칼슘 $[Ca_3(PO_4)_2]$ 이 주성분이며 칼슘과 인의 구성비율은 각각 5:3 및 3:2로 이루어져 있다. 즉 한 분자의 수산화인회석 및 인산칼슘을 기준으로 인보다 칼슘의

mol농도가 더 높다는 것을 의미하는데, 본 실험에서 나온 결과를 살펴보면 칼슘 : 인의 구성비가 모든 실험구에서 다르게 나타나는 것을 살펴볼 수 있다. 대표적으로 저수온구 보다 고수온구의 칼슘 비율이 더 높았으며, 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 칼슘 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 이러한 결과는 넙치 유생의 골격을 구성하는 물질로서 존재하는 수산화인회석 및 인산칼슘의 골격 구성비에 차이가 있음을 의미하며, 이러한 차이는 이산화탄소 농도와 같은 서식 환경의 차이에 의해 나타날 가능성이 있다는 것 역시 생각해 볼 수 있다. 또한 추가실험을 통해 두 물질의 구성비가 다른 것이 확인된다면, 그것으로 인해 넙치에게 어떤 영향이 직간접적으로 나타날 수 있는가(예를 들면, 기형 발생율의 증가 또는 골밀도 감소와의 연관성)에 대한 후속 연구도 수행되어야 할 것으로 생각된다.

Ⅲ. 종합고찰

지구온난화와 해양산성화로 대표되는 기후변화현상은 현재 다양한 측면에서 연구가 활발히 이루어지고 있다. 본 연구에서는 지구온난화와 해양산성화의 복합적 영향이 넙치의 성장 및 생리현상에 어떤 영향을 미칠지에 대해 관찰하였다. 2개의 온도구배(18, 22°C)와 3개의 용존 이산화탄소 농도 구배(400, 850, 1550 ppm)를 조합하여 총 6개의 실험조건을 만들어 넙치의 수정란을 부화 후 4주까지 사육하였다. 사육결과, 수온간 비교에서는 고수온구가 저수온구에 비해 성장이 증가하는 것으로 나타났으며, 이산화탄소 농도간 비교에서도 저수온구의 경우 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 성장이 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 이산화탄소 농도와 수온이 동시에 증가했을 경우에는 오히려 성장이 저해되고, 조직학적, 형태학적 이상이 다양하게 관찰되었다.

일반적으로, 치어기나 성어기의 물고기들은 산-염기 조절능력과 가스교환 시스템이 매우 발달해 있기 때문에, 환경이 산성화로 인해 변화될 경우 그들이 가지고 있는 능력을 이용하여 그 영향을 상쇄시킬 수 있다(Melzner et al., 2009b). 일반적으로 물고기들은 체내의 pH가 외부의 영향에 의해 감소되면

즉시 중탄산 이온(HCO_3^-)의 분비를 통해 체액의 수소이온 농도를 감소시켜 혈액의 pH 감소를 상쇄시키는 등의 항상성 기작을 가지고 있다(Pörtner et al., 2004, 2008, 2012).

하지만, 이러한 환경변화에 적응하는 능력은 무척추동물이 아닌 같은 어류라도 종에 따라 다르게 나타나기도 한다. 대서양 대구의 일종인 Baltic cod *Gadus morhua*는 주로 Kiel fjord 지역에서 산란을 하는데 이들의 산란기인 여름~가을 사이에 이곳의 환경은 다양한 외부적 요인에 의해 용존 이산화탄소 농도가 $2,300\ \mu\text{atm}\ CO_2$ 까지 치솟기도 한다. 실제로 이 종의 수정란과 유생을 이용한 산성화 실험에서는 이 종은 최대 $3,200\ \mu\text{atm}\ CO_2$ 의 이산화탄소 농도에서도 그들의 부화, 생존, 성장 및 이석크기에 아무런 유의한 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Frommel et al., 2013).

반대로 환경변화에 매우 취약한 종들도 있는데, 은띠색줄멸과의 일종인 Inland silverside *Menidia beryllina* 라는 어류는 주로 북아메리카 캘리포니아 연안에 서식하는 종인데, 이 종의 수정란을 이용한 실험결과, 사육수 내의 용존 이산화탄소 농도가 증가함에 따라($\sim 1,000\ \mu\text{atm}\ CO_2$) 유생의 생존율 및 체장이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Baumann et al., 2012).

이러한 차이가 나타나는 것에 대해서는 다양한 의견이 있는데, 이들이 평소에도 높은 이산화탄소 농도를 경험할 수 있는 환경에 서식하는 경우(Frommel et al., 2013), 좀 더 확장해서 부성란 또는 침성란이냐에 따라서 부화율 및 생존율 등에 차이가 나는 경우 등의 가설이 있다(Baumann et al.,

2012; Munday et al., 2011b). 본 실험에서 사용된 넙치 *Paralichthys olivaceus*의 경우 알의 형태는 부성란이지만, 유생시기 동안에는 표층에서 중층까지 넓은 범위에서 분포하게 되고, 부화 후 30~40일 정도 경과되면 변태 후 바닥에 착저하게 된다. 그 이후로부터는 계속 저서생활을 하기 때문에 이들은 그 환경특성상 어느정도 산성화에 대한 내성을 가지게 된다. 본 실험에서는 넙치의 초기생활사 시기 동안에 환경의 이산화탄소 농도 증가 및 수온 증가로 인해 넙치 유생이 어떠한 영향을 받게 되는지 확인하기 위해 넙치 유생의 부화율, 생존율, 성장율, 체장, 체중, 비만도, 골격 기형, 골밀도, 이석크기, 조직학적 분석과 같은 다양한 요소에 대한 분석을 수행하였다. 그 결과, 넙치의 초기생활사 시기 동안에 산성화 또는 온난화라는 단 한가지 요인에만 영향을 받을 경우에는 성장이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 산성화와 온난화 두 가지 영향이 동시에 주어질 경우에는 오히려 성장이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 체장 감소, 성장률 감소와 같은 다양한 부정적인 영향이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 산성화와 온난화 두 가지 환경변화가 동시에 나타날 경우 각각의 영향만 나타날 경우보다 생물에게 더 부정적인 영향을 미칠 확률이 높다는 것을 암시한다. 이러한 영향은 다양한 종에서 나타나는 것으로 알려져 있으며(Munday et al., 2009a; Parker et al., 2009), 이러한 결과가 나타나는 이유는 산성화 또는 저 산소화 현상이 이들이 생존할 수 있는 최적 온도범위를 좁히는 결과를 낳기 때문으로 풀이된다(Pörtner, 2008).

문제는 지구온난화와 해양산성화라는 두 기후변화 현상은 대기 중 이산화

탄소 농도 증가라는 하나의 원인에 의해 동시에 나타난다는 것이다. 즉, 향후 이 두 현상은 실제 해양 생태계에 동시에 나타날 가능성이 높으며, 이로 인해 본 실험에서 나타난 결과와 같이 넙치 유생에게 있어서 부정적인 영향을 나타낼 가능성이 매우 높다.

지구온난화와 해양산성화는 현재도 진행되고 있고 앞으로 그 진행속도가 더 빨라질 것이라는 것은 많은 연구결과에서 거론되고 있다. 향후 이 두 현상이 해양생태계에 긍정적이든 부정적이든 다양한 영향을 미치게 될 것이며, 최적 온도 창 이론에 따르면 부정적인 영향이 우세하게 나타날 것으로 생각된다.

이렇게 변화된 생태계 환경에서 적응에 성공한 종은 승자로서 생태계에서 우점하게 될 것이고, 적응에 실패한 종은 패자로서 생태계에서 도태되게 될 것으로 예상된다(Schlegel et al., 2012). 현재 다양한 생물종에 대한 개별적인 기후변화 실험이 많이 진행되어 오고 있다. 이러한 결과들을 종합하여 보면 앞에서 이야기한 승자와 패자 이론은 가까운 미래에 실현될 가능성이 높다고 여겨진다.

IV. 요약

해수 이산화탄소 농도 증가가 넙치 유생의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 다음과 같은 연구를 진행하였다. 우선 3개의 대기 이산화탄소 농도 구배(400, 850, 1550 ppm CO₂)와 2개의 수온 구배(18, 22°C)를 조합하여 6개의 환경조건을 만들어 넙치의 수정란을 4주간 부화 후 착저기까지 사육하면서 생리적인 변화를 관찰하였다. 총 3회에 걸친 실험 결과, 이산화탄소 농도 변화와 넙치 유생의 부화율 및 생존율에는 유의한 상관관계가 나타나지 않았다. 하지만 최종 도달 체장 및 체중 측정결과 및 성장율 분석 결과 18°C 조건에서 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 체장, 체중 및 성장율이 증가하는 경향이 나타났다($p < 0.05$). 그리고 400 ppm CO₂ 농도 조건에서는 수온이 증가함에 따라 체장, 체중 및 성장율이 증가하는 경향이 나타났다. 하지만, 22°C 조건에서는 이산화탄소 농도에 따른 반응이 18°C 조건과는 다르게 나타났다. 넙치의 유생은 22°C에서 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 850 ppm 에서 약간 증가했다가 1550 ppm CO₂ 에서 다시 성장이 감소하는 경향이 관찰되었다. 또한, 이산화탄소 농도의 증가는 넙치 유생의 골격형성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 골격의 이상 발생

및 골밀도 감소가 나타나는 것이 관찰되었다. 이석 성장 평가에서는 이산화탄소 농도 증가에 따른 이석크기의 증가 현상이 관찰되었으며, 또한 조직 절편 관찰을 통해 장기 손상을 확인한 결과, 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 눈, 아가미, 신장, 간에서 이상 현상이 관찰되었다.



V. 참고문헌

- 손맹현, 박민우, 김응오, 임한규, 김대중, 안철민, 엄기혁, 김성길, 조용철, 이창훈, 황형규, 윤성중, 한석중, 최낙중. (2006), 넙치 양식 표준 지침서. 해양수산부 국립수산물과학원, 1-2.
- 옥영수. (2007), 넙치 양식업의 실태 분석과 향후 발전방향. *울간 해양수산*, (271), 44-60.0976-7126
- 이동욱, 부양수. (2011), 해수면 상승 시나리오에 따른 제주연안지역 건설시설물의 영향 분석. *대한토목학회논문집 D*, 31(2D), 267-274.
- 전민수, 이종우, 이학승, 황호동, 안도경. (2005), 서귀포 연안해역의 침식대책 수립을 위한 기초연구. *한국항해항만학회지*, 29, 537-545.
- 정문기. (1986), 한국어류도감, 일지사, 서울, 559 pp.
- 한경호, 김용억. (1997), 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 초기생활사에 관한 연구(I. 난발생과정 및 자치어의 형태발달). *여수수산대학교논문집*, 11(2), 105-117.
- 허준욱, 최철영, 장영진. (2003), 가두기와 활어수송 스트레스가 넙치, *Paralichthys olivaceus* 의 생리조건에 미치는 영향. *한국양식학회지*, 16(3), 135-141.
- Anderson, WG., Dasiewicz, PJ., Liban, S., Ryan, C., Taylor, JR., Grosell, M., Weihrauch, D. (2010), Gastro-intestinal handling of water and solutes in three species of elasmobranch fish, the white spotted bamboo shark, *Chiloscyllium plagiosum*, little skate, *Leucoraja erinacea* and the clearnose skate, *Raja eglanteria*. *Comp Biochem Physiol* 155: 493-502.
- Andrades, JA., Becerra, J., Fernandez-Llebrez, P. (1996), Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 141(1), 1-11.
- Baker, DW., Matey, V., Huynh, KT., Wilson, JM., Morgan, JD., Brauner, CJ. (2009), Complete intracellular pH protection during extracellular pH depression is associated with hypercarbia tolerance in white sturgeon, *Acipenser*

- transmontanus*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 296: R1868–R1880.
- Baumann, H., Talmage, SC., Gobler, CJ. (2012), Reduced early life growth and survival in a fish in direct response to increased carbon dioxide. Nature Climate Change, 2(1), 38-41.
- Berenbrink, M., Koldkjaer, P., Kepp, O., Cossins, AR. (2005), Evolution of oxygen secretion in fishes and the emergence of a complex physiological system. Science 307: 1752–1757.
- Bignami, S., Enochs, IC., Manzello, DP., Sponaugle, S., Cowen, RK. (2013), Ocean acidification alters the otoliths of a pantropical fish species with implications for sensory function. Proc Natl Acad Sci USA 110: 7366–7370.
- Bignami, S., Sponaugle, S., Cowen, RK. (2013), Response to ocean acidification in larvae of a large tropical marine fish, *Rachycentron canadum*. Global Change Biol 19: 996–1006.
- Brauner, CJ., Wang, T., Wang, Y., Richards, JG., Gonzalez, RJ., Bernier, NJ., Xi, W., Patrick, A., Va, AL. (2004), Limited extracellular but complete intracellular acid-base regulation during short-term environmental hypercapnia in the armoured catfish, *Liposarcus pardalis*. J Exp Biol 207: 3381–3390.
- Brauner, CJ., Baker, DW. (2009), Patterns of Acid-Base Regulation During Exposure to Hypercarbia in Fishes. Berlin: Springer.
- Cameron, JN. (1978), Regulation of blood pH in teleost fish. Respir Physiol 33:129–144.
- Cameron, JN., Randall, DJ. (1972), The effect of increased ambient CO₂ on arterial CO₂ tension, CO₂ content and pH in rainbow trout. J Exp Biol 57: 673–680.
- Cameron, JN., Iwama, GK.. (1989), Compromises between ionic regulation and acid-base regulation in aquatic animals. Can J Zool 67: 3078–3084.
- Catches, JS., Burns, JM., Edwards, SL., Claiborne, JB. (2006), Na/H antiporter, V- H ATPase and Na/K-ATPase immunolocalization in a marine teleost (*Myoxocephalus octodecemspinosus*). J Exp Biol 209: 3440–3447.
- Chambers, RC., Candelmo, AC., Habeck, EA., Poach, ME., Wieczorek, D., Cooper, KR., Greenfield, CE., Phelan, B. A. (2014), Effects of elevated CO₂ in the early life stages of summer flounder, *Paralichthys dentatus*, and potential consequences of ocean acidification. Biogeosciences, 11(6), 1613-1626.

- Chan, DK., Woo, NY. (1978), Effect of cortisol on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. General and comparative endocrinology, 35(3), 205-215.
- Chang, MH., Plata, C., Kurita, Y., Kato, A., Hirose, S., Romero, MF. (2012), Euryhaline pufferfish NBCe1 differs from nonmarine species NBCe1 physiology. Am J Physiol Cell Physiol 302: C1083–C1095.
- Checkley, DM Jr., Dickson, AG., Takahashi, M., Radich, JA., Eisenkolb, N., Asch, R. (2009), Elevated CO₂ enhances otolith growth in young fish. Science 324: 1683.
- Claiborne, JB. (1998), Acid-base regulation. In: The Physiology of Fishes, edited by Evans, DH. Boca Raton, FL: CRC, p. 171–198.
- Claiborne, JB., Blackston, CR., Choe, KP., Dawson, DC., Harris, SP., Mackenzie, LA., Morrison-Shetlar, AI. (1999), A mechanism for branchial acid excretion in marine fish: Identification of multiple Na/Hantiporter (NHE) isoforms in gills of two seawater teleosts. J Exp Biol 202: 315–324.
- Claiborne, JB., Edwards, SL., Morrison-Shetlar, AI. (2002), Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. J Exp Zool 293: 302–319.
- Concepcion, AR., Lopez, M., Ardura-Fabregat, A., Medina, JF. (2013), Role of AE2 for pHi regulation in biliary epithelial cells. Front Physiol 4: 413.
- Deigweiher, K., Koschnick, N., Pörtner, HO., Lucassen, M. (2008), Acclimation of ion regulatory capacities in gills of marine fish under environmental hypercapnia. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 295: R1660–R1670.
- Delille, B., Harlay, J., Zondervan, I., Jacquet, S., Chou, L., Wollast, R., Bellerby, RGJ., Frankignoulle, M., Borges, AV., Riebesell, U., Gattuso, JP. (2005), Response of primary production and calcification to changes of pCO₂ during experimental blooms of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi*. Global Biogeochemical Cycles, 19(2).
- Doney, SC., Fabry, VJ., Feely, RA., Kleypas, JA. (2009), Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem, Marine Science 1.
- Edwards, SL., Wall, BP., Morrison-Shetlar, A., Sligh, S., Weakley, JC., Claiborne, JB. (2005), The effect of environmental hypercapnia and salinity on the expression of NHE-like isoforms in the gills of a euryhaline fish

- (*Fundulus heteroclitus*). J Expl Zool A Comp Expl Biol 303A: 464–475.
- Esbaugh, AJ., Perry, SF., Bayaa, M., Georgalis, T., Nickerson, J., Tufts, BL., Gilmour, KM. (2005), Cytoplasmic carbonic anhydrase isozymes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: comparative physiology and molecular evolution. J Exp Biol 208: 1951–1961.
- Esbaugh, AJ., Heuer, R., Grosell, M. (2012), Impacts of ocean acidification on respiratory gas exchange and acid-base balance in a marine teleost, *Opsanus beta*. J Comp Physiol B Biochem System Environ Physiol 182: 921–934.
- Evans, DH., Piermarini, PM., Choe, KP. (2005), The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol Rev 85: 97–177.
- Fabry, VJ., Seibel, BA., Feely, RA., Orr, JC. (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil, 65(3), 414-432.
- Faggio, C., Torre, A., Lando, G., Sabatino, G., Trischitta, F. (2011), Carbonate precipitates and bicarbonate secretion in the intestine of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. J Comp Physiol B 181: 517–525.
- Fangue, NA., O'Donnell, MJ., Sewell, MA., Matson, PG., MacPherson, AC., Hofmann, GE. (2010), A laboratory-based, experimental system for the study of ocean acidification effects on marine invertebrate larvae. Limnology and Oceanography: Methods, 8(8), 441-452.
- Fivelstad, S., Haavik, H., Løvik, G., Olsen, AB. (1998), Sublethal effects and safe levels of carbon dioxide in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.): ion regulation and growth. Aquaculture 160: 305–316.
- Fjelldal, PG., Hansen, TJ., Berg, AE. (2007), A radiological study on the development of vertebral deformities in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 273(4), 721-728.
- Foran, E., Weiner, S., Fine, M. (2013), Biogenic fish-gut calcium carbonate is a stable amorphous phase in the gill-head seabream, *Sparus aurata*. Sci Rep 3: 1700.
- Forsgren, E., Dupont, S., Jutfelt, F., Amundsen, T. (2013), Elevated CO₂ affects embryonic development and larval phototaxis in a temperate marine fish.

Ecol Evol 3: 3637–3646.

- Foss, A., Rosnes, BA., Oiestad, V. (2003), Graded environmental hypercapnia in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafson): effects on growth, food conversion efficiency. *Aquaculture* 220: 607–617.
- Franke, A. and Clemmesen, C. (2011), Effect of ocean acidification on early life stages of Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Biogeosciences*, 8(12), 3697-3707.
- Froese, R. (2006), Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of applied ichthyology*, 22(4), 241-253.
- Frommel, AY., Maneja, R., Lowe, D., Malzahn, AM., Geffen, AJ., Folkvord, A., Piatkowski, U., Reusch TBH., Clemmesen, C. (2012), Severe tissue damage in Atlantic cod larvae under increasing ocean acidification. *Nature Climate Change*, 2(1), 42-46.
- Frommel, AY., Schubert, A., Piatkowski, U., Clemmesen, C. (2013), Egg and early larval stages of Baltic cod, *Gadus morhua*, are robust to high levels of ocean acidification. *Marine biology*, 160(8), 1825-1834.
- Gazeau, F., Quiblier, C., Jansen, JM., Gattuso, JP, Middelburg, JJ., Heip, CH. (2007), Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters*, 34(7).
- Gazeau, F., Parker, LM., Comeau, S., Gattuso, JP, O'Connor, WA., Martin, S., Portner, HO., Ross, PM. (2013), Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology*, 160(8), 2207-2245.
- Genz, J., Taylor, JR., Grosell, M. (2008), Effects of salinity on intestinal bicarbonate secretion and compensatory regulation of acid-base balance in *Opsanus beta*. *J Exp Biol* 211: 2327–2335.
- Genz, J., McDonald, DM., Grosell, M. (2011), Concentration of MgSO₄ in the intestinal lumen of *Opsanus beta* limits osmoregulation in response to acute hypersalinity stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R895–R909.
- Georgalis, T., Perry, SF., Gilmour, KM. (2006), The role of branchial carbonic anhydrase in acid-base regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J*

- Exp Biol 209: 518–530.
- Gilmour, KM., Perry, SF. (2009), Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *Journal of Experimental Biology*, 212(11), 1647–1661.
- Goss, GG., Perry, SF., Wood, CM., Laurent, P. (1992), Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of fresh-water fish. *J Exp Zool* 263: 143–159.
- Grosell, M. (2006), Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation. *J Exp Zool* 209: 2813–2827.
- Grosell, M. (2007), Intestinal transport processes in marine fish osmoregulation. In: *Fish Osmoregulation*, edited by Baldisserotto, B., Mancera, JM., and Kapoor, BG.. Boca Raton, FL: CRC, p. 332–357.
- Grosell, M. (2011), Intestinal anion exchange in marine teleosts is involved in osmoregulation and contributes to the oceanic inorganic carbon cycle. *Acta Physiol (Oxf)* 202: 421–434.
- Grosell, M., Genz, J. (2006), Ouabain-sensitive bicarbonate secretion and acid absorption by the marine teleost fish intestine play a role in osmoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1145–R1156.
- Grosell, M., Gilmour, KM., Perry, SF. (2007), Intestinal carbonic anhydrase, bicarbonate, and proton carriers play a role in the acclimation of rainbow trout to seawater. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R2099–R2111.
- Grosell, M., Genz, J., Taylor, JR., Perry, SF., Gilmour, KM. (2009a), The involvement of H^+ ATPase and carbonic anhydrase in intestinal HCO_3^- secretion on seawater-acclimated rainbow trout. *J Exp Biol* 212: 1940–1948.
- Grosell, M., Mager, EM., Williams, C., Taylor, JR. (2009b), High rates of HCO_3^- secretion and Cl^- absorption against adverse gradients in the marine teleost intestine: the involvement of an electrogenic anion exchanger and H^+ pump metabolon? *J Exp Biol* 212: 1684–1696.
- Grosell, M. (2011), The role of the gastrointestinal tract in salt and water balance. *Fish Physiol* 30: 135–164.
- Gutowska, MA., Pörtner, HO., Melzner, F. (2008), Growth and calcification in the cephalopod *Sepia officinalis* under elevated seawater pCO_2 . *Marine Ecology Progress Series*, 373, 303–309.

- Gutowska, MA., Melzner, F., Pörtner, HO., Meier, S. (2010), Cuttlebone calcification increases during exposure to elevated seawater $p\text{CO}_2$ in the cephalopod *Sepia officinalis*. Marine Biology, 157(7), 1653-1663.
- Hadi, A. A., Alwan, S. F. (2012), INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY & LIFE SCIENCES. Int. J. of Pharm. & Life Sci.(IJPLS), 3(11), 2071-2081.
- Hama, T., Inoue, T., Suzuki, R., Kashiwazaki, H., Wada, S., Sasano, D., Kosugi, N., Ishii, M. (2015). Response of a phytoplankton community to nutrient addition under different CO_2 and pH conditions. Journal of Oceanography, 1-17.
- Haswell, MS., Randall, DJ., Perry, SF. (1980), Fish gill caronic anhydrase: acid-base regulation or salt transport? Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 238: R240–R245.
- Hattori, M., Sawada, Y., Takagi, Y., Suzuki, R., Okada, T., Kumai, H. (2003), Vertebral deformities in cultured red sea bream, *Pagrus major*, Temminck and Schlegel. Aquaculture Research, 34(13), 1129-1137.
- Hayashi, M., Kita, J., Ishimatsu, A. (2004), Acid-base responses to lethal aquatic hypercapnia in three marine fishes. Mar Biol 144: 153–160.
- Hazel, JR., Garlick, WS., Sellner, PA. (1978), Effects of assay temperature upon pH optima of enzymes from poikilotherms-test of imidazole alphastat hypothesis. J Comp Physiol A 123: 97–104.
- Heisler, N. (1988), Acid-base regulation. In: The Physiology of Elasmobranch Fishes. Berlin: Springer, p. 215–252.
- Heisler, N. (1989), Interactions between gas exchange, metabolism, and ion transport in animals: an overview. Can J Zool 67: 2923–2935.
- Heisler, N. (1993), Acid-base regulation. In: The Physiology of Fishes, edited by Evans, DH., Boca Raton, FL: CRC, p. 343–377.
- Heuer, RM., Esbaugh, AJ., Grosell, M. (2012), Ocean acidification leads to counterproductive intestinal base loss in the gulf toadfish (*Opsanus beta*). Physiol Biochem Zool 85: 450–459.
- Heuer, RM., Grosell, M. (2014), Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 307, R1061-R1084.

- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C.M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R.H., Dubi, A., Hatziolos, M.E. (2007), Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318(5857), 1737-1742.
- Hurst, T.P., Fernandez, E.R., Mathis, J.T., Miller, J.A., Stinson, C.M., Ahgeak, E.F. (2012), Resiliency of juvenile walleye pollock to projected levels of ocean acidification. *Aquatic Biology*, 17(3), 247-259.
- Hurst, T.P., Fernandez, E.R., Mathis, J.T. (2013), Effects of ocean acidification on hatch size and larval growth of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 70(4), 812-822.
- Hwang, J.I., Park, M.C., Baek, H.J. (2009), Preliminary Study of the Effects of CO₂ on the Survival and Growth of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Juveniles. *Fisheries and aquatic sciences*, 12(4), 350-353.
- IPCC, (2007), *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 976pp.
- IPCC, (2013), *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- IPCC, (2014), *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- Ishimatsu, A., Kikkawa, T., Hayashi, M., Lee, K.S., Kita, J. (2004), Effects of CO₂ on marine fish: larvae and adults. *Journal of oceanography*, 60(4), 731-741.
- Ishimatsu, A., Hayashi, M., Kikkawa, T. (2008), Fishes in high-CO₂, acidified oceans.

- Marine Ecology Progress Series, 373, 295-302.
- Janssen, RG., Randall, DJ. (1975), The effects of change in pH and $p\text{CO}_2$ in blood and water on breathing in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Respir Physiol 25: 235–245.
- Jokiel, PL., Rodgers, KS., Kuffner, IB., Andersson, AJ., Cox, EF., Mackenzie, FT. (2008), Ocean acidification and calcifying reef organisms: a mesocosm investigation. Coral Reefs, 27(3), 473-483.
- Ju, S. J., Kim, S. J. (2012), Assessment of the impact of climate change on marine ecosystem in the south sea of Korea. Ocean and Polar Research, 34(2), 197-199.
- Jutfelt, F., Bresolin de Souza, K., Vuylsteke, A., Sturve, J. (2013), Behavioural disturbances in a temperate fish exposed to sustained high- CO_2 levels. PLoS One 8.
- Kikkawa, T., Kita, J., Ishimatsu, A. (2004), Comparison of the lethal effect of CO_2 and acidification on red sea bream (*Pagrus major*) during the early developmental stages. Mar Pollut Bull 48: 108–110.
- Kim, JM., Shin, K., Lee, K., Park, BK. (2008), In situ ecosystem-based carbon dioxide perturbation experiments: Design and performance evaluation of a mesocosm facility. Limnol. Oceanogr.: Methods, 6, 208-217.
- Kim, KS., Shim, JH., Kim, S. (2015), Effects of CO_2 -induced Ocean Acidification on the Growth of the Larval Olive Flounder *Paralichthys Olivaceus*. Ocean Science Journal, 50(2), 381-388.
- Kimura, RYO., Takami, H., Ono, T., Onitsuka, T., Nojiri, Y. (2011), Effects of elevated $p\text{CO}_2$ on the early development of the commercially important gastropod, Ezo abalone *Haliotis discus hannai*. Fisheries Oceanography, 20(5), 357-366.
- Kroeker, KJ., Kordas, RL., Crim, RN., Singh, GG. (2010), Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. Ecology letters, 13(11), 1419-1434.
- Krumschnabel, G., Manzl, C., Schwarzbaum, PJ. (2001), Regulation of intracellular pH in anoxia-tolerant and anoxia-intolerant teleost hepatocytes. J Exp Biol 204: 3943–3951.
- Kurihara, H. (2008), Effects of CO_2 -driven ocean acidification on the early

- developmental stages of invertebrates. Marine Ecology Progress Series, 373, 275-284.
- Kurita, Y., Nakada, T., Kato, A., Doi, H., Mistry, AC., Chang, MH., Romero, MF., Hirose, S. (2008), Identification of intestinal bicarbonate transporters involved in formation of carbonate precipitates to stimulate water absorption in marine teleost fish. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294: R1402–R1412.
- Larsen, BK., Portner, HO., Jensen, FB. (1997), Extra- and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. Mar Biol 128: 337–346.
- Lee, YC., Yan, JJ., Cruz, SA., Horng, JL., Hwang, PP. (2011), Anion exchanger 1b, but not sodium-bicarbonate cotransporter 1b, plays a role in transport functions of zebrafish H^+ ATPase-rich cells. Am J Physiol Cell Physiol 300: C295–C307.
- Lejeusne, C., Chevaldonné, P., Pergent-Martini, C., Boudouresque, CF., Perez, T. (2010), Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. Trends in ecology & evolution, 25(4), 250-260.
- Link, K., Berishvili, G., Shved, N., D'Cotta, H., Baroiller, J. F., Reinecke, M., Eppler, E. (2010), Seawater and freshwater challenges affect the insulin-like growth factors IGF-I and IGF-II in liver and osmoregulatory organs of the tilapia. Molecular and cellular endocrinology, 327(1), 40-46.
- Loyd, R., White, WR. (1967), Effect of high concentration of carbon dioxide on the ionic composition of rainbow trout blood. Nature 216: 1341–1342.
- Mancera, JM., McCormick, SD. (1998), Osmoregulatory actions of the GH/IGF axis in non-salmonid teleosts. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 121(1), 43-48.
- Maneja, RH., Frommel, AY., Geffen, AJ., Folkvord, A., Piatkowski, U., Chang, MY., Clemmesen, C. (2013), Effects of ocean acidification on the calcification of otoliths of larval Atlantic cod *Gadus morhua*. Marine Ecol Progr Series 477: 251–258.
- Marshall, WS., Grosell, M. (2006), Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. Physiology of Fishes (3rd ed.), edited by Evans, D. and Claiborne, JB. Boca Raton, FL: CRC.
- Martens, LG., Witten, PE., Fivelstad, S., Huysseune, A., Sævareid, B., Vikeså, V., Obach, A.

- (2006), Impact of high water carbon dioxide levels on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): effects on fish performance, vertebrae composition and structure. *Aquaculture*, 261(1), 80-88.
- McCormick, SD. (2001), Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American zoologist*, 41(4), 781-794.
- McDonald, DG., Tang, Y., Boutilier, RG. (1989), Acid and ion transfer across the gills of fish: mechanisms and regulation. *Can J Zool* 67: 3046–3054.
- McGraw, CM., Cornwall, CE., Reid, MR., Currie, KI., Hepburn, CD., Boyd, P., Hurd, CL., Hunter, KA. (2010), An automated pH-controlled culture system for laboratory-based ocean acidification experiments. *Limnology and Oceanography: Methods*, 8(12), 686-694.
- Melzner, F., Gobel, S., Langenbuch, M., Gutowska, MA., Pörtner, HO., Lucassen, M. (2009a), Swimming performance in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) following long-term (4–12 months) acclimation to elevated seawater $p\text{CO}_2$. *Aquat Toxicol* (Amst) 92: 30–37.
- Melzner, F., Gutowska, MA., Langenbuch, M., Dupont, S., Lucassen, M., Thorndyke, MC., Bleich, M., Pörtner, HO. (2009b). Physiological basis for high CO_2 tolerance in marine ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences*, 6(10), 2313-2331.
- Michaelidis, B., Spring, A., Pörtner, HO. (2007), Effects of long-term acclimation to environmental hypercapnia on extracellular acid–base status and metabolic capacity in Mediterranean fish *Sparus aurata*. *Marine Biology*, 150(6), 1417-1429.
- Miller, GM., Watson, SA., Donelson, JM., McCormick, MI., Munday, PL. (2012), Parental environment mediates impacts of increased carbon dioxide on a coral reef fish. *Nature Clim Change* 2: 858–861.
- Miller, GM., Watson, SA., McCormick, MI., Munday, PL. (2013), Increased CO_2 stimulates reproduction in a coral reef fish. *Glob Chang Biol* 19: 3037–3045.
- Moran, D., Støttrup, JG. (2011). The effect of carbon dioxide on growth of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquatic toxicology*, 102(1), 24-30.
- Morgan, JJ., McDonald, DG., Wood, CM. (2001), The cost of living for freshwater fish in

- a warmer, more polluted world. *Global Change Biology*, 7(4), 345-355.
- Mu, J., Jin, F., Wang, J., Zheng, N., & Cong, Y. (2015), Effects of CO₂-driven ocean acidification on early life stages of marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Biogeosciences*, 12(12), 3861-3868.
- Munday, PL., Crawley, NE., Nilsson, GE. (2009a), Interacting effects of elevated temperature and ocean acidification on the aerobic performance of coral reef fishes. *Marine Ecology Progress Series*, 388, 235-242.
- Munday, PL., Donelson, JM., Dixon, DL., Endo, GG. (2009b), Effects of ocean acidification on the early life history of a tropical marine fish. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1671), 3275-3283.
- Munday, PL., Hernaman, V., Dixon, DL., Thorrold, SR. (2011a), Effect of ocean acidification on otolith development in larvae of a tropical marine fish. *Biogeosciences* 8: 1631–1641.
- Munday, PL., Gagliano, M., Donelson, JM., Dixon, DL., Thorrold, SR. (2011b), Ocean acidification does not affect the early life history development of a tropical marine fish. *Marine Ecology Progress Series*, 423, 211-221.
- Munday, PL., Pratchett, MS., Dixon, DL., Donelson, JM., Endo, GG., Reynolds, AD., Knuckey, R. (2012), Elevated CO₂ affects the behavior of an ecologically and economically important coral reef fish. *Mar Biol* 160: 2137–2144.
- Nawata, CM., Wood, CM. (2008), The effects of CO₂ and external buffering on ammonia excretion and Rhesus glycoprotein mRNA expression in rainbow trout. *J Exp Biol* 211: 3226–3236.
- Nawata, CM., Hirose, S., Nakada, T., Wood, CM., Kato, A. (2010), Rh glycoprotein expression is modulated in pufferfish (*Takifugu rubripes*) during high environmental ammonia exposure. *J Exp Biol* 213: 3150–3160.
- Nowicki, JP., Miller, GM., Munday, PL. (2012), Interactive effects of elevated temperature and CO₂ on foraging behavior of juvenile coral reef fish. *J Expl Marine Biol Ecol* 412: 46–51.
- Orlowski, J., Grinstein, S. (2004), Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflügers Arch* 447: 549–565.
- Orr, JC., Fabry, VJ., Olivier, A., Bopp, L., Doney, SC., Feely, RA., Gnanadesikan, A.,

- Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, RM., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, RG., Plattner, GK., Rodgers, KB., Sabine, CL., Sarmiento, JL., Schliter, R., Slater, RD., Totterdell, JJ., Weirig, MF., Yamanaka, Y., Yool, A. (2005), Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437, 681-686
- Pannella, G. (1971), Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 173(4002), 1124-1127
- Park, KT., Lee, K., Shin, K., Yang, EJ., Hyun, B., Kim, JM., Noh, JH., Kim, M., Kong, B., Choi, DH., Choi, SJ., Jang, PG., Jeong, HJ. (2014), Direct linkage between dimethyl sulfide production and microzooplankton grazing, resulting from prey composition change under high partial pressure of carbon dioxide conditions. *Environmental science & technology*, 48(9), 4750-4756.
- Parks, SK., Tresguerres, M., Galvez, F., Goss, GG. (2010), Intracellular pH regulation in isolated trout gill mitochondrion-rich cell (MR) subtypes: evidence for Na/K activity. *Comp Biochem Physiol A* 155: 139-145.
- Pärt, P., Wood, CM. (1996), Na/H exchange in cultured epithelial cells from fish gills. *J Comp Physiol A* 166: 37-45.
- Payan, P., Kossmann, H., Watrin, A., Mayer-Gostan, N., Boeuf, G. (1997), Ionic composition of endolymph in teleosts: origin and importance of endolymph alkalinity. *J Exp Biol* 200: 1905-1912.
- Payan, P., Edeyer, A., De, PH., Borelli, G., Boeuf, G., Mayer-Gostan, N. (1999), Chemical composition of saccular endolymph and otolith in fish inner ear: lack of spatial uniformity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277: R123-R131.
- Petitgas, P., Rijnsdorp, AD., Dickey-Collas, M., Engelhard, GH., Peck, MA., Pinnegar, JK., Drinkwater, K., Huret, M., Nash, RD. (2013), Impacts of climate change on the complex life cycles of fish. *Fisheries Oceanography*, 22(2), 121-139.
- Perry, SF. (1982), The regulation of hypercapnic acidosis in two salmonids, the freshwater trout (*Salmo gairdneri*) and the seawater salmon (*Onchorynchus mykiss*). *Mar Behav Physiol* 9: 73-79.

- Perry, SF., Shahsavarani, A., Georgalis, T., Bayaa, M., Furimsky, M., Thomas, SLY. (2003), Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. *J Expl Zool A Comp Expl Biol* 300A: 53–62.
- Perry, SF., Gilmour, KM. (2006), Acid–base balance and CO₂ excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Respiratory physiology & neurobiology*, 154(1), 199-215.
- Perry, SF., Braun, MH., Genz, J., Vulesevic, B., Taylor, J., Grosell, M., Gilmour, KM. (2010a) Acid-base regulation in the plainfin midshipman (*Porichthys notatus*): an aglomerular marine teleost. *J Comp Physiol B Biochem Systemic Environ Physiol* 180: 1213–1225.
- Perry, SF., Braun, MH., Noland, M., Dawdy, J., Walsh, PJ. (2010b), Do zebrafish Rh proteins act as dual ammonia-CO₂ channels? *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 313: 618–621.
- Petochi, T., Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M., Mercatali, I., Marino, G. (2011), Coping strategy and stress response of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to acute and chronic environmental hypercapnia under hyperoxic conditions. *Aquaculture* 315: 312–320.
- Piermarini, PM., Verlander, JW., Royaux, IE., Evans, DH. (2002), Pendrin immunoreactivity in the gill epithelium of a euryhaline elasmobranch. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R983–R992.
- Pierrot, DEL., Wallace, DWR. (2006), MS Excel program developed for CO₂ System Calculations. ORNL/CDIAC-105, Oak Ridge, Tennessee, Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, US Department of Energy.
- Pörtner, HO., Langenbuch, M., Reipschläger, A. (2004), Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: Lessons from animal physiology and earth history. *Journal of Oceanography*, 60(4), 705-718.
- Pörtner, HO. (2008), Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Marine Ecology Progress Series*, 373, 203-217.
- Pörtner, HO. (2012) Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: Unifying principles linking molecule to ecosystem-level

- changes. Marine Ecology Progress Series. 470, 273-290.
- Randall, DJ., Heisler, N., Drees, F. (1976), Ventilatory response to hypercapnia in the larger spotted dogfish, *Scyliorhinus stellaris*. Am J Physiol 230: 590–594.
- Randall, DJ., Perry, SF., Heming, TA. (1982), Gas transfer and acid-base regulation in salmonids. Comp Biochem Physiol 73B: 93–103.
- Reinecke, M., Schmid, A., Ermatinger, R., Loffing-Cueni, D. (1997), Insulin-Like Growth Factor I in the Teleost *Oreochromis mossambicus*, the Tilapia: Gene Sequence, Tissue Expression, and Cellular Localization 1. Endocrinology, 138(9), 3613-3619.
- Réveillac, E., Lacoue-Labarthe, T., Oberhänsli, F., Teyssié, J. L., Jeffree, R., Gattuso, J. P., Martin, S. (2015), Ocean acidification reshapes the otolith-body allometry of growth in juvenile sea bream. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 463, 87-94.
- Ries, JB. (2011), A physicochemical framework for interpreting the biological calcification response to CO₂-induced ocean acidification. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(14), 4053-4064.
- Rimoldi, S., Terova, G., Brambilla, F., Bernardini, G., Gornati, R., Saroglia, M. (2009), Molecular characterization and expression analysis of Na/H exchanger (NHE)-1 and c-Fos genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L) exposed to acute and chronic hypercapnia. J Expl Marine Biol Ecol 375: 32–40.
- Romero, MF., Fulton, CM., Boron, WF. (2004), The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. Pflügers Arch 447: 495–509.
- Roos, A., and Boron, WF. (1981), Intracellular pH. Physiol Rev 61: 296–434.
- Rosa, R., Seibel, BA. (2010), Metabolic physiology of the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*: implications for vertical migration in a pronounced oxygen minimum zone. Progress in Oceanography, 86(1), 72-80.
- Ross, PM., Parker, L., O'Connor, WA., Bailey, EA. (2011), The impact of ocean acidification on reproduction, early development and settlement of marine organisms. Water, 3(4), 1005-1030.
- Salter, MA., Perry, CT., Wilson, RW. (2012), Production of mud-grade carbonates by marine fish: Crystalline products and their sedimentary significance. Sedimentology 59: 2172–2198.

- Sasai, S., Kaneko, T., Hasegawa, S., Tsukamoto, K. (1998), Morphological alteration in two types of gill chloride cells in Japanese eels (*Anguilla japonica*) during catadromous migration. *Canadian Journal of Zoology*, 76(8), 1480-1487.
- Sattin, G., EMM, Grosell, M. (2010), Cytosolic carbonic anhydrase in the gulf toadfish is important for tolerance to hypersalinity. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156: 169–175.
- Sawada, Y., Higuchi, K., Haga, Y., Ura, K., Ishibashi, Y., Kurata, M., Miyatake, H., Katayama, S., Seoka, M. (2008), Effects of hypoxia and hypercapnia on the embryonic development of striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 74(2), 144-151.
- Schlegel, P., Havenhand, JN., Gillings, MR., Williamson, JE. (2012), Individual variability in reproductive success determines winners and losers under ocean acidification: a case study with sea urchins. *PloS one*, 7(12), e53118.
- Shi, D., Xu, Y., Hopkinson, BM., Morel, F. M. (2010), Effect of ocean acidification on iron availability to marine phytoplankton. *Science*, 327(5966), 676- 679.
- Shim, JH., Kim, KS., Kim, S. (2013), The effects of elevated carbon dioxide in seawater on the early life stages of black sea bream *Acanthopagrus schlegelii*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(6), 862-867.
- Simpson, SD., Munday, PL., Wittenrich, ML., Manassa, R., Dixon, DL., Gagliano, M., Yan, HY. (2011), Ocean acidification erodes crucial auditory behaviour in a marine fish. *Biol Lett* 7: 917–920.
- Somero, GN., White, FN. (1985), Enzymatic consequences under aphastat regulation. In: *Acid-Base Regulation and Body Temperature*, edited by H. Rahn and O. Prakash, Boston, MA: Martinus Nijhoff.
- Stewart, AK., Kurschat, CE., Burns, D., Banger, N., Vaughan-Jones, RD., Alper, SL. (2007), Transmembrane domain histidines contribute to regulation of AE2-mediated anion exchange by pH. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C909–C918.
- Strobel, A., Bennecke, S., Leo, E., Mintenbeck, K., Poertner, HO., Mark, FC. (2012), Metabolic shifts in the Antarctic fish *Nototothenia rossii* in response to rising temperature and $p\text{CO}_2$. *Front Zool* 9: 28.
- Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T., Springer, T. A. (2002), Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out

- signaling. *Cell*, 110(5), 599-611.
- Talmage, SC. and Gobler, CJ. (2010), Effects of past, present, and future ocean carbon dioxide concentrations on the growth and survival of larval shellfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17246-17251.
- Taylor, J., Grosell, M. (2008), Basolateral NBC is the hinge of a mechanism serving both osmoregulation and acid-base balance in the marine teleost intestine. *Comp Biochem Physiol* 150: S57-S58.
- Taylor, JR., Grosell, M. (2009), The intestinal response to feeding in seawater gulf toadfish, *Opsanus beta*, includes elevated base secretion and increased epithelial oxygen consumption. *J Exp Biol* 212: 3873-3881.
- Taylor, JR., EMM, Grosell, M. (2010), Basolateral NBCe1 plays a rate-limiting role in transepithelial intestinal HCO_3^- secretion serving marine fish osmoregulation. *J Exp Biol* 213: 459-468.
- Toews, DP, Holeton, GF., Heisler, N. (1983), Regulation of the acid-base status during environmental hypercapnia in the marine teleost fish *Conger conger*. *J Exp Biol* 107: 9-20.
- Tohse, H., Mugiya, Y. (2001), Effects of enzyme and anion transport inhibitors on in vitro incorporation of organic carbon and calcium into endolymph and otoliths in salmon *Oncorhynchus masou*. *Comp Biochem Physiol A* 128: 177-184.
- Tohse, H., Ando, H., Mugiya, Y. (2004), Biochemical properties and immunohistochemical localization of carbonic anhydrase in the sacculus of the inner ear in the salmon *Oncorhynchus masou*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 137: 87-94.
- Tseng, YC., Hu, MY., Stumpp, M., Lin, LY., Melzner, F., Hwang, PP. (2013), CO₂-driven seawater acidification differentially affects development and molecular plasticity along life history of fish (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol A Molec Integr Physiol* 165: 1190-1130.
- Wheatly, MG., Hobe, H., Wood, CM. (1984), The mechanisms of acid-base and ionoregulation in the freshwater rainbow trout during environmental hyperoxia and subsequent normoxia. II. The role of the kidney. *Respir Physiol* 55: 155-173.

- Wilson, RW., Wilson, JM., Grosell, M. (2002), Intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish-why and how? *Biochim Biophys Acta* 1566: 182–193.
- Wilson, RW., Grosell, M. (2003), Intestinal bicarbonate secretion in marine teleost fish: source of bicarbonate, pH sensitivity, and consequence for whole animal acid-base and divalent cation homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1618: 163–193.
- Wilson, RW., Millero, FJ., Taylor, JR., Walsh, PJ., Christensen, V., Jennings, S., Grosell, M. (2009), Contribution of fish to the marine inorganic carbon cycle. *Science* 323: 359–362.
- Wood, CM., Wheatly, MG., Hobe, H. (1984), The mechanisms of acid-base and ionoregulation in the freshwater rainbow trout during environmental hyperoxia and subsequent normoxia. III. Branchial exchanges. *Respir Physiol* 55: 175–192.
- Wood, CM., Lemoigne, J. (1991), Intracellular acid-base responses to environmental hyperoxia and normoxic recovery in rainbow-trout. *Respir Physiol* 86: 91–113.
- Woosley, RJ., Millero, FJ., Grosell, M. (2012), The solubility of fish-produced high magnesium calcite in seawater. *J Geophys Res Oceans* 117: C04018.
- Wittmann, AC. and Pörtner, HO. (2013), Sensitivities of extant animal taxa to ocean acidification. *Nature climate change* 3:995-1001.
- Yamano, K., Tagawa, M., de Jesus, E. G., Hirano, T., Miwa, S., Inui, Y. (1991), Changes in whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in metamorphosing conger eel. *Journal of Comparative Physiology B*, 161(4), 371-375.

부록

Appendix 1. Names of the equipment used in the experimental system.

1. CO2탱크(CO ₂ tank)	2. 기체주입튜브(gas tube)	2a. 튜브커넥터(tube connector)
2b,11. 에어분배기(air distributor)	2c,21a. 에어스톤(air stone)	3. MFC
4. MFC controller	5. mixing camber	6. CO ₂ 제거기(CO ₂ remover)
6a. soda lime	6b. 연결튜브(connecting tube)	6c. 외기유입구(air inlet)
7,28. 테이블(table)	8. 진공펌프(vacuum pump)	8a. 흡입구(inlet)
8b. 토출구(outlet)	9. 펌프케이스(pump case)	10. Resorvior
10a. 탱크본체(water tank)	10b. 탱크커버(tank cover)	10c. 밀폐캡(sealing cap)
12. CO ₂ 모니터(CO ₂ monitor)	12a. CO ₂ 센서(CO ₂ sensor)	13. 수위레벨센서(level sensor)
14. 케이블포트(cable pot)	15. 해수유입관(water tube)	16. 해수공급튜브(inlet tube)
16a. 스트레이너(strainer)	17. 정량 토출기 (constant delievery pump)	18. 유량제어기 (water flow controller)
19. 튜브카트리지(tube cartridge)	19a. 조립부(assembly)	20. 배양조(rearing tank)
20a,30a. 밀폐뚜껑(sealing cover)	21. 에어공급튜브(air tube)	22. 배출튜브(expulsion tube)
23. 배수탱크(drain tank)	23a. 드레인 배관(drain tube)	24. 보조탱크(subtank)
25. 히터(heater)	26. 온도조절기 (temperature controller)	27. 장치선반(rack)
30. 흡착제 케이싱(case)	31. 피딩 롤러바(feeding roller)	33. 구동판(driving plate)
35. 위치조정 노브 (positioning knob)	100. 실험장치 (experimental equipment)	PS. 압력계(pressometer)
F. 유량계(flow meter)	V. 밸브기구(valve)	C. 케이블(cable)

Appendix 2. Concentration of chemical elements of olive flounder larvae. (unit: mg/kg). Values indicate mean $\pm$ SD. (n=4)

Temp.	CO ₂ (ppm)	Zn	P	Fe	B	Si	Mg	Ca	Sr	Na	K
18°C (low)	400	98.25 $\pm$ 2.32	20199.64 $\pm$ 27.38	34.3 $\pm$ 3.1	156 $\pm$ 40.11	43.6 $\pm$ 3.36	1703.12 $\pm$ 81.15	14121.1 $\pm$ 96.63	52.49 $\pm$ 0.48	10487.06 $\pm$ 1900.49	18717.17 $\pm$ 336.28
	850	76.69 $\pm$ 9.22	18711.29 $\pm$ 1559.33	22.41 $\pm$ 1.78	165.75 $\pm$ 14.98	75.63 $\pm$ 25.28	1957.77 $\pm$ 166.57	12719.17 $\pm$ 354.06	51.29 $\pm$ 2.52	16319.72 $\pm$ 1822.87	11662.24 $\pm$ 1834.45
	1550	77.2 $\pm$ 4.29	20203.06 $\pm$ 1197.2	25.81 $\pm$ 2.53	91.67 $\pm$ 11.37	37.38 $\pm$ 1.28	2364.31 $\pm$ 255.46	18150.22 $\pm$ 280.11	67.86 $\pm$ 3.96	21664.8 $\pm$ 3642.21	17310.22 $\pm$ 777.11
22°C (high)	400	92.12 $\pm$ 0.58	21318.5 $\pm$ 114.11	29.44 $\pm$ 1.64	296.79 $\pm$ 45.56	37.27 $\pm$ 1.71	2384.18 $\pm$ 34.72	20368.36 $\pm$ 799.12	90.24 $\pm$ 3.56	18503.84 $\pm$ 568.59	16898.84 $\pm$ 98.89
	850	81.86 $\pm$ 0.37	20493.66 $\pm$ 146.48	29.22 $\pm$ 1.24	159.99 $\pm$ 20.02	50.58 $\pm$ 10.79	2378.86 $\pm$ 78.81	18759.89 $\pm$ 1086.74	83.82 $\pm$ 1.76	19524.37 $\pm$ 793.6	16851.4 $\pm$ 265.5
	1550	79.36 $\pm$ 1.34	19488.23 $\pm$ 517.7	25.84 $\pm$ 1.84	158.71 $\pm$ 2.69	31.74 $\pm$ 0.54	1955.22 $\pm$ 19.39	21727.51 $\pm$ 338.88	93.1 $\pm$ 2.63	18512.81 $\pm$ 2173.86	15800.94 $\pm$ 536.61