



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](#)

**A DISSERTATION
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY**

**RECOVERY OF NUTRIENT STORAGE AND REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF
CULTURED PACIFIC OYSTER *CRASSOSTREA GIGAS* (TUNBERG, 1793) 2YEARS AFTER
THE *HEBEI SPIRIT* OIL SPILL**

HEE-JUNG LEE

**Department of Marine Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

August 2016

**RECOVERY OF NUTRIENT STORAGE AND REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY
OF CULTURED PACIFIC OYSTER *CRASSOSTREA GIGAS* (TUNBERG, 1793)
2YEARS AFTER THE *HEBEI SPIRIT* OIL SPILL**

Hee-Jung Lee

(Advised by Professor Kwang-Sik Choi)

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

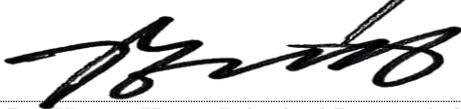
DOCTOR OF PHILOSOPHY

August 2016

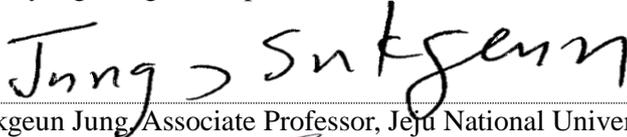
This dissertation has been examined and approved by



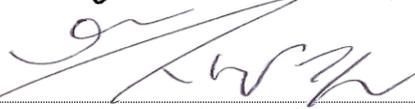
Thesis director, Dr. Chang-Keun Kang, Professor, Gwangju Institute of Science and Technology



Dr. Do-Hyung Kang, Principal Research Scientist, Korean Institute of Ocean Science & Technology



Dr. Sukgeun Jung, Associate Professor, Jeju National University



Dr. Sang-Rul Park, Associate Professor, Jeju National University



Dr. Kwang-Sik Choi, Professor, Jeju National University

2016.08
Date

Department of Marine Life Science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

CONTENTS

List of Figures.....	7
List of Tables.....	8
RECOVERY OF NUTRIENT STORAGE AND REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF CULTURED PACIFIC OYSTER <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> (TUNBERG, 1793) 2YEARS AFTER THE <i>HEBEI SPIRIT OIL SPILL</i>	
Abstract.....	10
1. Introduction.....	12
2. Materials and Methods.....	18
2.1. Sampling effort.....	18
2.2. Biometry and histology.....	22
2.3. Biochemical composition of tissue.....	25
2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	26
2.5. Standardized measurements.....	27
2.6 Statistical analysis.....	28
3. Result.....	29
3.1. Growth and CI.....	29
3.2. Biochemical composition.....	36
3.3. Reproductive effort.....	41
4. Discussion.....	49
4.1. Physiological parameter variation.....	49
4.2. Biochemical composition variation.....	54
4.3. Gametogenesis and reproductive effort variation.....	56
Reference.....	61
Acknowledgements.....	72

국문 요약

유류오염은 해산 이매패류의 대량폐사 이외에도 장기적으로 성장, 먹이 섭취율 저하 또는 산란시기 지연 및 번식능력 저하 등을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다. 2007년 12월 태안군 만리포 해상(36°52.3N, 126°03.4E)에서 발생한 *Hebei Spirit* 유류유출 사고는 충청남도 (5,519 ha)를 비롯해 전라남도 (22,185 ha)까지 광범위하게 영향을 미쳤다. 이 연구는 *Hebei Spirit* 유류유출 사고 2년 이후, 사고로 인하여 유출된 원유가 참굴에 미치는 번식 생리학적 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. 참굴 시료는 유류유출피해 지역인 태안군 의항리 (유류피해지역)에 생존한 양식 참굴과 대조구 지역으로 서산시 중왕리 (대조구)에서 양식되고 있는 참굴을 이용하였다. 채집은 2009년 2월부터 2010년 12월까지, 매월 실시하였으며, 두 지역 참굴의 생리적 지표 (비만도, 조직 건 중량, 총 탄수화물, 총 단백질)와 번식적 지표 (생식소 발달단계, 생식소지수, Egg mass)를 조사하였다. 연구결과, 비만도는 대조구 참굴의 경우 2009년 평균 10.2였던 반면 유류피해지역 참굴은 10.8로 유의적으로 높았다 ($P<0.05$). 또한 2010년, 역시 대조구 참굴의 연 평균 비만도는 9.0인 반면, 유류피해지역 참굴의 비만도는 10.5로 유의적으로 높았다 ($P<0.05$). 2009년, 참굴 체 조직의 연 평균 총 탄수화물 함량은 대조구의 경우 263.4 mg

carbohydrate standard animal⁻¹인 반면, 유류피해지역 참굴은 290.7 mg carbohydrate standard animal⁻¹으로, 유류피해지역 참굴이 유의적으로 높았다 ($P<0.05$). 그러나 이러한 차이는 2010년에는 관찰되지 않았다. 체 조직 내 총 단백질 함량 역시, 총 탄수화물과 같은 양상을 보였는데, 2009년 대조구 참굴 (507.3 mg protein standard animal⁻¹)이 유류피해지역 참굴 (574.8 mg protein standard animal⁻¹)보다 유의적으로 낮았다 ($P<0.05$). 조직학적 방법에 의한 생식소 발달단계 관찰 결과, 2009년 대조구 참굴에 비해 유류피해지역 참굴의 최초 산란가입시기 (8월) 및 주 산란기 (8-9월)가 한달 정도 늦었으나, 2010년 두 지역 참굴의 최초 산란가입시기 (8월) 및 주 산란기(8-9월)는 같았다. 산란 직전 암컷 참굴의 번식량 측정 결과, 2009년 대조구 29.7%, 유류피해지역 27.7%, 2010년 대조구 29.7%, 유류피해지역 34.7%, 등, 지역 간 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 유류피해지역 참굴의 생식소 지수는 2009년에 27.7% 비해 2010년 34.7%로 유의적으로 증가하였다 ($P<0.05$). 산란 직전 암컷 참굴의 egg mass를 측정한 결과, 2009년 대조구 참굴의 평균 egg mass는 457.7 mg egg standard animal⁻¹반면, 유류피해지역 암컷 참굴은 460.9 mg egg standard animal⁻¹)이었다. 2010년의 경우 산란 직전 대조구 암컷 참굴의 egg mass는 383.2 mg egg standard animal⁻¹ 반면, 유류피해지역 참굴의 egg mass는 540.4 mg egg standard

animal¹)로 대조구 참굴 보다 유류오염지역 참굴이 더 많은 양의 알을 생산한 것으로 관측되었다. 이 연구 결과, 유류피해지역 참굴은 *Hebei Spirit* 유류유출사고 2 이후부터, 대조구 참굴의 생리적 특성과 비교 시, 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 태안 지역 양식산 굴은 유류오염 사고 2년 이후부터 점차적으로 생리적 상태가 정상적인 참굴의 수준으로 회복되어 가고 있는 것으로 판단되었다.

List of Figures

Fig. 1. Location of the study areas.....	20
Fig. 2. Seasonal variations in water temperature, salinity and chlorophyll- <i>a</i> concentration in the control area and the oil contaminated area.....	21
Fig. 3. Diagram demonstrating steps involved in the analysis of Pacific oyster in this study.	24
Fig. 4. Annual variations in condition index of Pacific oyster in the control area and the oil contaminated area from February 2009 to December 2010. Values represent mean \pm standard error ($n=30$).....	35
Fig. 5. Annual variations in tissue dry weight, protein and carbohydrate in a standard animal of a shell height 74.4 mm in the control area and the oil contaminated area. Vertical bars represent 95% confidence interval.....	40
Fig. 6. Monthly percentage distribution of gametogenic stages of Pacific oyster from the control area and the oil contaminated area from February 2009 to December 2010..	47
Fig. 7. Seasonal variations in Gonad Somatic Index (GSI) and the standardized egg mass of Pacific oyster in the control area and the oil contaminated area from February 2009 to December 2010. For GSI values are mean \pm standard error; egg mass vertical bars represent 95% confidence interval.....	48

List of Tables

Table 1. Published studies reporting impacts of <i>Hebei Spirit</i> oil spill accident in marine environment.....	15
Table 2. Continued.....	16
Table 3. Marine bivalves used as sentinel species in international oil spill researches.	17
Table 4. Annual variation of oyster Tissue Dry Weight (TDWT), Condition Index (CI), percentage of total protein and carbohydrate, Gonad Somatic Index (GSI) and Egg mass at the of contaminated area from February 2009 to December 2010. All the values are mean \pm 95% confidence interval.....	33
Table 5. Annual variation of oyster Tissue Dry Weight (TDWT), Condition Index (CI), percentage of total protein and carbohydrate, Gonad Somatic Index (GSI) and Egg mass of control area from February 2009 to December 2010. All the values are mean 95% confidence interval.....	34
Table 6. Independent t-test result of average for the effects of years (control site vs. contaminated site) and treatments (2009 vs. 2010) on the standardized tissue dry weight, protein, carbohydrate, gonad somatic index and egg mass.....	39
Table 7. One-way ANOVA test for the impacts for <i>Hebei spirit</i> oil spill for 3 years (2008 to 2010) on the CI, standardized tissue dry weight, percentage of the total protein and carbohydrate, percentage of GSI (Ripe stage of Female), standardized egg mass (Ripe stage of Female). The values are mean \pm 95% confidence interval.	60

**RECOVERY OF NUTRIENT STORAGE AND REPRODUCTIVE
PHYSIOLOGY OF CULTURED PACIFIC OYSTER *CRASSOSTREA
GIGAS* (TUNBERG, 1793) 2YEARS AFTER THE *HEBEI SPIRIT OIL
SPILL***

Abstract

Environmental contamination by crude oil and hydrocarbons compounds has been reported to alter feeding, growth, and reproductive physiology of marine organisms. Following the *Hebei Spirit* oil spill in December 7, 2007, the west shore of Taean in the Yellow Sea of Korea was heavily covered with the crude oil. To understand sub-lethal effects of the spilled oil on physiology of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, a population of oyster cultured at Uhang on the Taean coast were monitored from February 2009 to December 2010. As a control, one oyster population at Garorim Bay was also monitored during the same period. In 2009 and 2010, the annual mean condition Index (CI) of oysters from the contaminated area (10.8 in 2009 and 10.2 in 2010) was significantly higher ($P < 0.05$) than that of control oysters (10.5 in 2009 and 9.0 in 2010). In 2009, the annual mean protein and carbohydrate contents of oysters at the contaminated areas (574.8 mg.standard animal⁻¹ and 290.7 mg.standard animal⁻¹, respectively) were statistically higher ($P < 0.05$) than that of control animals (507.3 mg.standard animal⁻¹ and 263.4 mg.standard animal⁻¹, respectively). Such spatial variation in the tissue component was not observed in 2010. In 2009, gonad maturation and subsequent spawning of oysters at the contaminated area was comparatively slow compared to the control oysters. However, no such spatial variation was observed in 2010, and most the females spawned between August and September. During spawning season, gonad-somatic index (GSI) of female oysters determined using ELISA, at the contaminated area, showed inter-annual variation and the GSI recorded in 2010 was significantly higher (34.7%) than 2009 (29.7%, , $P < 0.05$). GSI of the females determined in 2009 and 2010 at the contaminated site was significantly higher (approximately twice higher) compared to the value determined in 2008, a few months after *Hebei Spirit* oil spill accident ($P < 0.05$). The observed biological performances of oysters at the contaminated area, including tissue dry weight, CI, total protein and carbohydrate levels (i.e., nutrient storage),

the annual gonad development pattern and the reproductive effort of females suggested that, two years after the oil spill accident, oysters at the accident site are in recovering phase, although a long term monitoring of the oyster using the parameters assessed in this study needs to be continued.

Key words: *Hebei Spirit* oil spill, *Crassostrea gigas*, environmental monitoring, reproductive effort, nutrient storage, growth

1. Introduction

유조선 *Hebei Spirit*는 2007년 12월 7일 충청남도 태안 해역 (36°52.3N, 126°03.4 E)에 원유 12,547kL를 유출하였다 (MLTM, 2008; Kim et al., 2010). *Hebei spirit* 유류유출사고는 ITOPF (International Tanker Owners Pollution Federation)에 ‘Top 20 major spills table’에 기록된 대형 유류유출 사고였다 (ITOPF, 2008). 이 사고로 유출된 원유는 북서풍과 반일주조 (semi-diurnal tidal current)의 영향으로 충청남도를 비롯해 전라남도 해안에 영향을 미쳤다 (Yim et al., 2012). 유류유출사고 발생 직후, 해안에 유입된 원유를 제거하기 위해 약 200만명의 자원봉사자와 방제 선박 등이 동원되어 원유 약 4톤과 유분이 포함된 해수 32,074 톤을 제거하였다 (KCG 2008). 유류유출사고 당시 태안군 일대 해수 내 16 PAHs (16 Poly-Aromatic Hydrocarbons)와 TPH (Total Petroleum Hydrocarbons)의 농도는 8.5-5,170 ng/L, 2,000-172,000 ng/L였고 퇴적물 내 Alkyl PAHs 농도는 1.69-66,430 µg/L로 기준치의 100배 이상 이었다 (MLTM 2008). 그러나 태안 연안 환경내의 석유화합물질은 유류유출사고 10개월 후 우리나라 수질 기준 (10 ppb)까지 감소하였다 (Kim et al., 2010; MLTM, 2008).

Hebei spirit 유류유출 사고 (December 7, 2007)이후 우리나라에서는 즉각적 (December 18, 2007)이고 다양한 (해수 및 퇴적물, 공극수 내 유류오염조사, 수질, 어패류 내 유류오염 조사, 생물독성, 해양생태계 내 생물 집단 조사 등) 연구들이

실시 되었다 (Table 1). 그리고 유류피해지역의 해양 이매패류를 대상으로 면역능력 및 성장, 번식생리에 미치는 영향에 대한 연구도 수행되었다 (Table 2). Table 3은 해산 이매패류를 대상으로 외국에서 수행된 연구 내용과 그에 따른 연구결과를 유류유출사고 별로 나누어 요약하였다. 그러나 이전에 수행된 대부분의 연구들은 유류유출사고에 대한 해산 이매패류의 분자 세포수준의 연구 또는 원유를 이용한 실험실에서 실시한 연구들로 채집횟수가 불연속적이고 실험기간이 짧아, 유류유출 사고가 장기적으로 해산 이매패류의 생리 또는 번식에 미치는 영향과 회복양상에 관한 연구는 미비한 실정이다. Lee (2010)은 *Hebei Spirit* 유류유출사고 직후, 양식 참굴의 생리적 건강도 및 체 조직 중량 및 비만도, 번식량 등이 감소하였으며, 생식소 발달단계 및 산란시기가 대조구 참굴에 비해 지연되었다고 보고한바 있다. Mondal et al., (2015)은 *Hebei Spirit* 유류유출사고 2년 후 유류피해지역 자연산 참굴이 대조구 참굴에 비해 조직 건 중량 및 총 단백질 함량, Egg mass가 대조구 참굴보다 높았으며, 생식소 발달단계의 차이도 보이지 않았다고 보고하였다. 그러나 이와 같은 유류피해지역 참굴의 생리적 또는 번식학적 회복양상이, 유류유출사고 1년 이후, 유류유출 지역 양식 참굴에서도 나타나는지에 관한 연구는 수행된 바 없다.

해산 이매패류 중 참굴은 우리나라에서 가장 생산량이 높은 패류로서, 리아스식 해안이 잘 발달한 남해안과 서해안에서 주로 생산되고 있다. FAO 보고에 따르면, 2010년 우리나라는 양식을 통하여 267,776 톤의 굴을 생산하였으며, 이 중, 4,352 톤이 충남과 경기도 연안에서 생산되었다 (Choi 2008; 국립수산과학원, 2012).

이 연구는 *Hebei Spirit* 유류유출사고 1년 이후, 유류피해지역인 태안 연안에서 길러지고 있는 참굴 (유출된 원유에 직접적으로 노출되어 살아 남은 참굴) 과 대조구 참굴의 생리학적 요인 (체 조직 성장 및 성분, 비만도)과 번식학적 요인 (생식소 발달단계 및 생식소지수, egg mass)을 2년동안 비교, 유류오염 스트레스가 참굴에 미치는 영향 및 생리적 회복양상을 조사하였다.

Table 1. Published studies reporting impacts of *Hebei Spirit* oil spill accident in marine environment.

Accident	Locality	Date	Spilled Oil (Ton)	Types of Research	Effects of the Spilled Oil	Reference
<i>Hebei spirit</i>	Taeon Korea	7, Dec 2007	12,547	Temporal variation of Chl- <i>a</i> affected by oil spill	. Daily Chl- <i>a</i> level ↓ continued 2 weeks . Mean Chl- <i>a</i> level ↓ 1998 > 2007 . 3 month after, Chl- <i>a</i> level ↑ 1998 < 2007	Lee et al., 2009
				Detection of oil residuals in the seawater and pore water	. 15 days after the spill in seawater 16,600 µg/L . 10 month after, oil concentration ↓ . DNA damage after 18month ↓	Kim et al.,2010
				Temporal trend in genotoxic effects on blood cells of striped beak perch	. Sediments recovered quickly . Significant correlations between PAHs and DNA damage	Lee et al., 2011
				Hepatic biomarkers monitored in pelagic and benthic fish	. 16 PAHs and alkylated PAHs level ↓ (after 11 month) . Spilled area fish PAHs level↑ (immediately after the spill)	Jung et al., 2011
				Oil spill environmental forensics: The <i>Hebei spirit</i> oil spill case		Yim et al., 2012
				Structure changes in microbenthic community after the oil spill	. Biological index ↓ (during 9 month)	Jung et al., 2013
				Petroleum hydrocarbon in intertidal seawater after oil spill	. TPH concentration immediately after spill 1.5 to 7,310 µg/L . TPH concentration ↓ (one month after the spill) . TPH concentration (high tide > low tide) . TPH levels in seawater matched the spring –neap tidal cycle	Kim et al., 2013
				PAHs in intertidal sediments for five after oil spill	. Sediment toxicity observed (4 month after the spill) and 8 months after the spill ↓ . 50% more sample exhibited toxicity . Amphipod mortality ↓ (Mar, 2008 to July)	Lee et al., 2013
Ecological effects, recoveries after 5 years the oil spill	. long-term effects of residual oils . Identification of certain toxic chemicals in residual oils . Weathering characteristics of spilled oils . Possible effects from the unknown hydrocarbons in oils . Recovery of community level responses of oil spill	Hong et al., 2014				

Table 2. Continued.

Accident	Locality	Date	Spilled Oil (Ton)	Types of Research	Effects of the Spilled Oil	Reference
<i>Hebei Spirit</i>	Taeon Korea	7, Dec 2007	12,547	Total PAHs levels in oysters	. After a month PAHs level ↑ . 2008 PAHs level > 2009 PAHs level	MLTM, 2008; 2009
				Hemocyste parameters of oyster a year after oil spill	. Granulocyte population, phagocytic capacity and reactive oxygen species production ↓	Donaghy et al., 2010
				Biochemical composition and reproduction of oyster after oil spill	. Condition index (spilled area < control) . Physiological index (spilled area < control) . Tissue carbohydrate levels (spilled area < control) . Annual gametogenic pattern (less percentage oyster spawning, delay spawning peak) . Gonad somatic index (spilled area < control)	Lee, 2010
				Growth patterns of oyster	. Growth ratio (Natural oyster < farmed oyster)	Lee and Yoon, 2014
				Reproduction and gametogenesis of oyster two years after oil spill	. Tissue dry weight (spilled area > control) . Annual gametogenic pattern (no significant difference) . Egg mass (spilled area > control) . Tissue protein levels (spilled area > control)	Mondal et al., 2015
				Hemocyste parameters, glycogen content of manila clam two years after oil spill	. Total hemocyste count (spilled area > control) . Ratio granulocytes (spilled area > control) . Hemocyste mortality (spilled area < control) . DNA damage (spilled area < control) . Phagocytosis activity (spilled area < control) . Oxidative activity (spilled > control) . Glycogen (Spilled area < control)	Hong et al., 2016

Table 3. Marine bivalves used as sentinel species in international oil spill researches.

Accident	Locality	Date	Spilled Oil (Ton)	Types of Research	Effects of the Spilled Oil	Reference
<i>Deepwater Horizon</i>	Gulf of Mexico USA	20, Apr 2010	1,230,000	Condition, reproductive state and Infection of parasite	. No impacts of PAH, Consistent with natural (condition, reproductive state)	Soniat et al., 2011
				PAHs level in fish, shrimp, crab and oyster tissue	. Higher levels of PAHs were detected from all marine organisms (early period↑)	Xia et al., 2012
				Carbon isotope analysis (Carbon-14 analysis) in mussel	. <1% oil incorporation (no evidence for enhanced microbial activity in water)	Fry and Anderson, 2013
				Survey of oil-degrading bacteria in oyster	. Oyster microbiome is structured relative with surrounding environment	Thomas et al., 2014
				Impacts of oil and dispersant on early development of oyster	. Oyster gametes exposed to CEWAF and Corexit experienced more deleterious effects than oysters embryos.	Vignier et al., 2015
<i>Exxon Valdez</i>	Alaska USA	24, Mar 1989	37,000	Effects and trends in clam by Exxon Valdez oil spill	. Abundant unoiled site than washed site . Large declines in tissue PAHs level 1990 to 1992 . Bioaccumulation oil higher concentration	Shigenaka et al., 1999
				Lack of physiological responses by mussel after the 3-4years oil spill	. Total PAHs levels ↑ . No significant differences (condition index, clearance rate, glycogen levels)	Thomas et al., 1999
				TPAHs level in mussel	. TPAHs level declined with time in some (But not all mussels) . Should reach background levels within three decades in most beds.	Carls et al., 2001
				Aromatic hydrocarbon (AH) level in mussel and clam	. AH levels ↑ . The presence of whole oil within mussel and clam	Roberts, 1999
<i>Prestige</i>	Spain	13, Nov 2002	63,000	Assessment of In Vivo effects of oil in mussel Immune system and PAHs levels in tissue	. No differences immune parameters . PAHs level↑ (Gill < Digestive gland)	Ordas et al., 2007
				Biochemical composition of mussel after oil spill	. Affected area by the oil mussel marked difference in lipid composition (triacylglycerol, free fatty acids, phospholipid)	Peteiro et al., 2007
				Growth and biochemical responses of mussels	. Differences in protein and carbohydrate (Affected area mussel ↓) . No different growth curve parameter	Peteiro et al., 2008
				Mussel health two years after the oil spill	. Labialization period values and DGA level 2003 > 2004 . Related to a decrease TPAHs level in tissue	Cajaraville et al., 2006
<i>Sea Empress</i>	UK	15, Feb 1996	72,000	Immunity and hydrocarbon levels in mussel	. Haemocyte numbers and phagocytosis ↓ (contaminated animals) . After 11 weeks immune response improved	Dyrynda et al., 1997
				Immunity parameter of nature mussel	. Superoxide generation and phagocytic activity ↓ . PAHs levels ↑ immune activity ↓	Dyrynda et al., 2000
				PAHs level in shellfish (cockles, mussel and oyster)	. Uptake of PAHs by shellfish ↑	Law et al., 1999
				Immunotoxin responses in oysters (After 2years)	. Severe immunological alteration . PAHs contents ↑	Auffret et al., 2004
<i>Erika</i>	France	12, Dec 1999	15,000	Acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA) and deoxyribonucleic acid (DNA) adducts.	. No significant reduction in GST and CAT levels . AChE levels ↓ (first years suggesting a general stress)	Bocquene et al., 2004
				Vanadium in mussel and oyster following oil spill	. Mussel populations were affected by the oil spill only first year . Vanadium concentration ↑	Chiffolleau et al., 2004
				DNA damage in mussels	. Genotoxicity ↑ . DNA repair capacity ↓	Lemiere et al., 2004

2. Materials and methods

2.1. Sampling effort

연구 조사지역은 2007년 *Hebei Spirit* 유류유출사고로 유출된 원유에 직접적인 영향을 입은 태안군 의항 해역 (36° 50' N, 126° 09' E)과 대조 군으로 *Hebei Spirit* 유류유출사고 영향을 입지 않은 가로림 만 중왕리 해역 (36° 89' N, 126° 34' E)이다 (Fig. 1).

Hebei Spirit 유출 사고로 유출된 원유는 사고 당시 강한 북서풍과 조류의 영향으로 대부분 남쪽으로 이동하였고, 주로 충청남도 이남 지역 해안으로 유입되었다 (ITOPF, 2008; Lee et al., 2009). 사고 직후, 유류오염 피해 해역 인근 해수 내 16 PAHs 농도는 8.5-5,170 ng/L였고 TPH 농도는 2,000-172,000 ng/L 이었다. 그러나 유류유출 사고 2개월 후부터 해양환경 내 원유로부터 파생된 PAHs의 농도는 감소하기 시작하여 10개월 후에는 <0.13-1.79 µg/L로 낮아졌다 (MLTM, 2008; Kim et al., 2009; Kim et al. 2013).

실험에 사용된 시료는 두 해역 모두 양식 굴로, 의항 해역 참굴은 2007년 *Hebei Spirit* 유류유출사고 이후 살아남은 개체를 사용하였다. 시료는 2009년 2월부터 2010년 12월까지 매월 30개체씩 채집하였다. 모니터링 기간 동안 측정된 수온 및 Chlorophyll-*a* 값은 Giovanni Ocean Color Radiometry Online Visualization and Analysis system (Global Monthly Product; <http://gadata1.sci.gsfc.nasa.gov/daac->

bin/G3/gui.cgi? instance_id=ocean_month; MODIS-Aqua 4km_Sea surface temperature, chlorophyll a concentration) 으로부터 인공위성 자료를 얻어 분석에 이용하였다. 염분은 국립해양조사원 연안관측정점 데이터를 활용하였다. 각 기관에서 생성된 수온, 염분 및 Chlorophyll-*a* 결과는 Fig. 2와 같다.

대조구인 가로림만의 수온 범위는 2009년 4.6 (2월)-22.9°C (9월)였고, 2010년에는 4.5 (2월)-25.2°C (8월)였다. 유류피해지역인 태안군 의항리의 연간 수온 변화 폭은 2009년 4.4 (2월)-23.1°C (9월) 이었으며, 2010년에는 3.5 (2월)-23.8°C (9월)였다. 염분의 범위는 대조구 지역의 경우 24.6 (3월)-28.4 psu (2월), 2010년에는 25.2 (8월)-32.1 psu (11월)였다. 유류피해지역은 2009년 23.3 (2월)-30.7 psu (12월), 2010년 25.6 (10월)-30.6 psu (1월)의 범위를 보였다. 대조구 지역 Chlorophyll-*a* 범위는 2009년 2.7 (10월)-4.5 µg/L (2월), 2010년 1.3 (8월)-5.2 µg/L (2월) 였다. 한편 유류오염 피해지역인 태안군 의항리의 해수 내 클로로필은 2009년 2.7 (10월)-4.5 µg/L (2월), 2010년 1.4 (8월)-5.2 µg/L (2월)의 범위를 보였다 (Fig. 2).

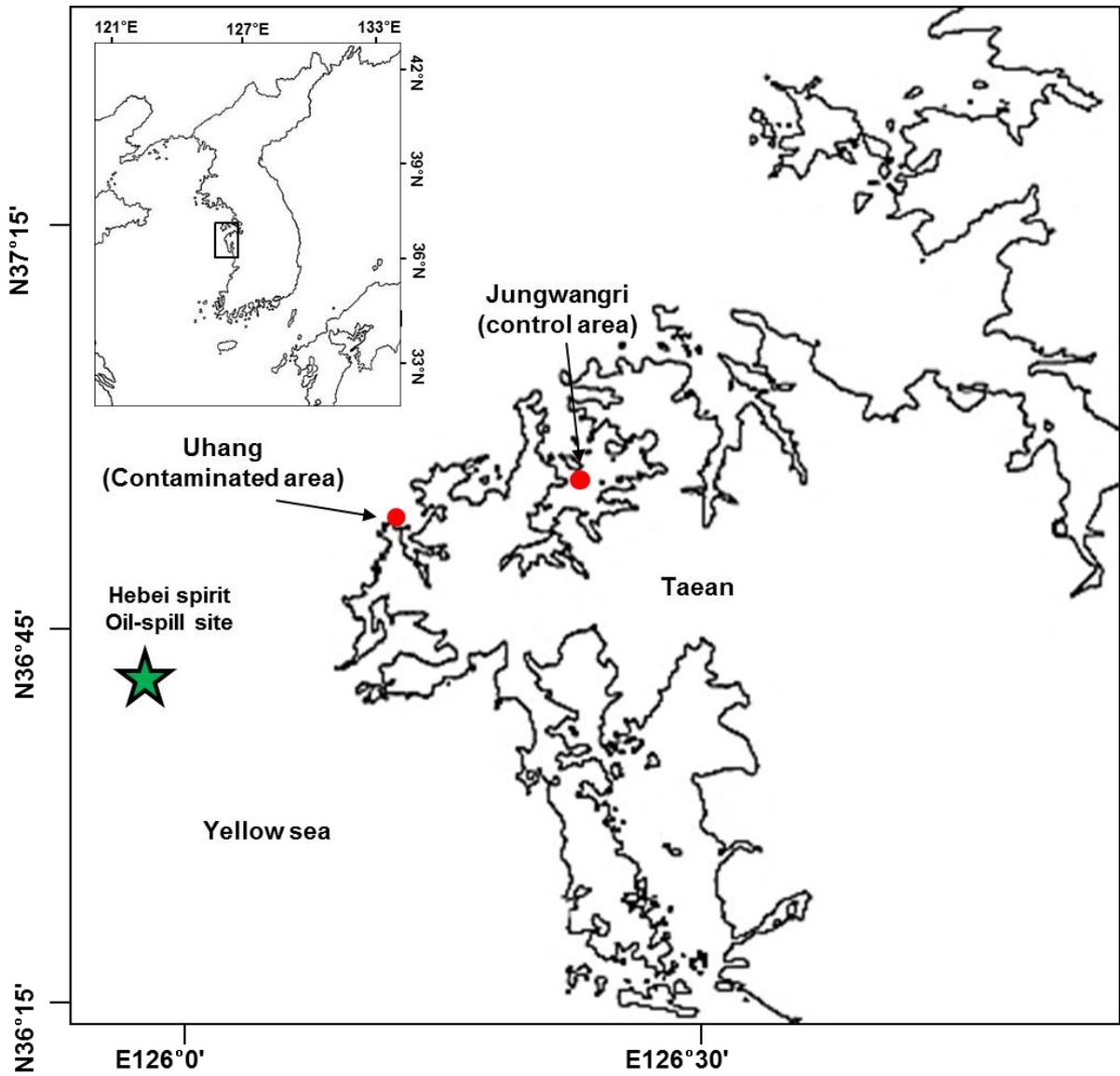


Fig. 1. Location of the study areas.

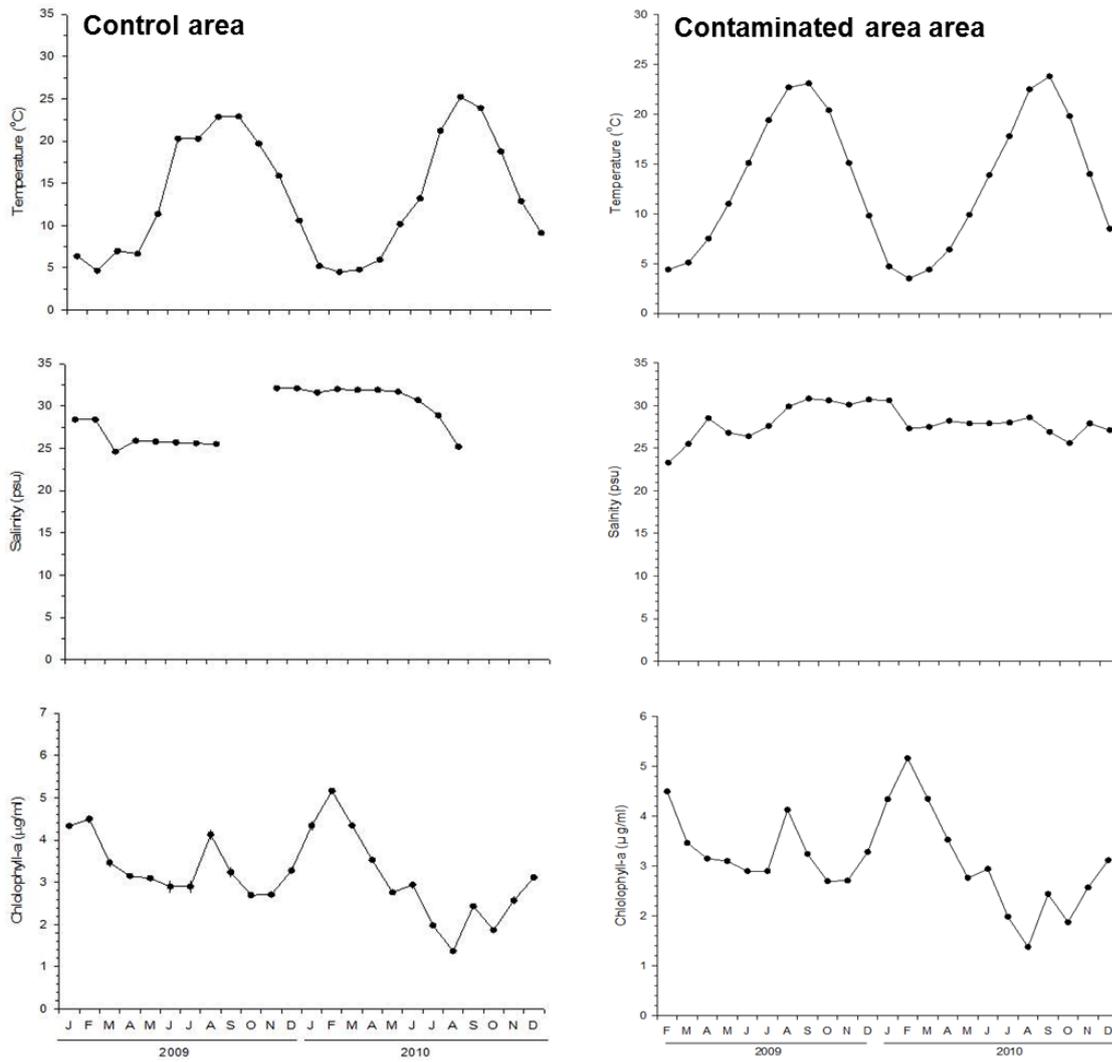


Fig. 2. Seasonal variations in water temperature, salinity and chlorophyll-*a* concentration in the control area and the oil contaminated area.

2.2. Biometry and histology

두 해역에서 채집된 참굴은 실험실로 옮겨 패각 외부에 부착된 이물질을 제거 한 뒤 버어니어 캘리퍼스를 이용하여 각장 0.1 mm 단위까지 측정하였고 메스실린더를 이용하여 참굴 전체 부피를 측정하였다. Figure 3은 전체적인 실험방법에 관한 간략한 모식도 이다. 측정이 완료된 시료는 개각하여 체조직을 적출하였고, 체조직이 제외된 참굴 패각의 부피를 다시 측정하였다. 따라서 패각 내 면적은 전체 부피에서 패각 부피를 제외한 값으로 산정되었다. 참굴의 비만도 (condicondi index)는 조직 전중량 (g)에 대한 패각 내 부피 (ml)의 비율로 산출되었다 (Lucas and Beninger, 1985; Mondol et al., 2015). 적출된 참굴 체조직은 습중량을 측정 한 뒤 조직학적 관찰을 위해 생식소, 소화맹낭 및 아가미가 포함되도록 몸통 중앙을 3 mm 두께로 절단하였다. 절단된 조직은 Davidson's 고정시약에 24시간 고정 시켰다. 잔여 조직은 중량을 측정한 뒤 초저온 냉동고 (-70°C)에 보관하였고 동결건조 이후 균질화 하여 체 조직 성분 분석 및 번식량을 측정하는데 사용하였다. 고정이 완료된 조직은 70% 에탄올로 치환하고 조직 내 파라핀을 침투시켜 조직 블록을 제작한 뒤 조직 절편기를 이용해 6 µm 두께로 절단 후 Harris hematoxylin과 Eosin Y으로 염색하였다. 염색이 완료된 조직 슬라이드는 광학현미경을 활용하여 성별 및 생식소 발달단계를 Resting, Early developing, Late developing,

Ripe, Partially spawning Spent/absorbing 단계로 나누어 광학현미경하에서 구분하였다 (Kang et al., 2010).

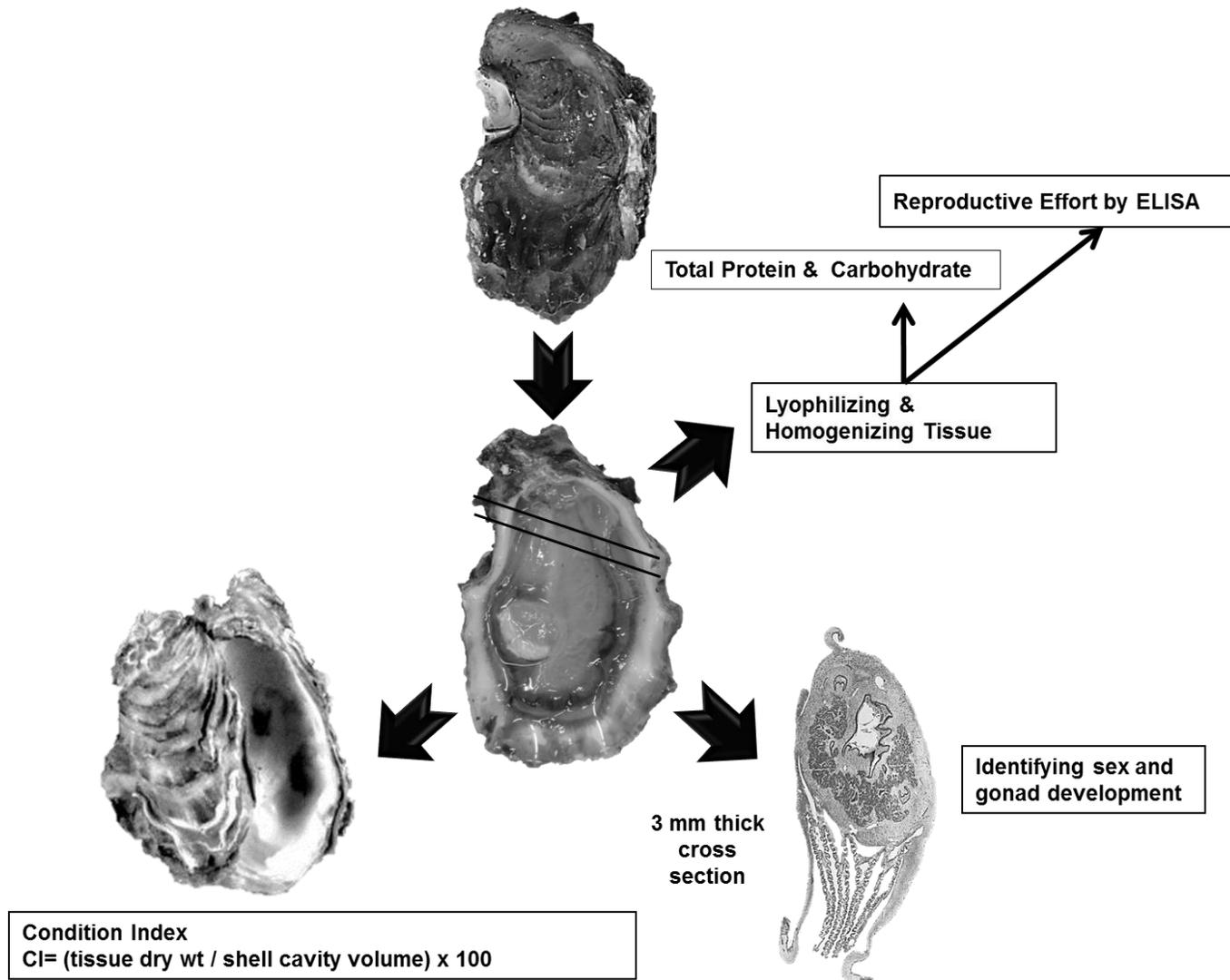


Fig. 3. Diagram demonstrating steps involved in the analysis of Pacific oyster in this study

2.3. Biochemical composition of tissue

체조직의 생화학적 성분 분석은 총 단백질 함량과 총 탄수화물 함량을 분석하였다. 총 단백질 분석은 Park et al., (2006)의 방법을 따랐으며, 동결건조된 굴 조직 시료 20-25 mg에 0.1 M NaOH를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응 시켰다. 이후 원심 분리하여 상등액을 취한 뒤, BCA protein assay kit (Pierce, USA)를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정해 분석하였다. 총 탄수화물 분석은 페놀과 황산 반응을 이용한 Taylor (1994)의 방법을 사용하였다. 동결 건조된 굴 조직 시료 20-25 mg PBS (Phosphate Buffered Saline pH 7.4)를 첨가하여 초음파 분쇄기로 균질화 하여 원심 분리 후 상등액을 취해 10% phenol과 sulfuric acid를 첨가하여 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. 총 단백질은 표준물질로, bovine serum albumin (BSA)를 이용하였으며, 각 시료의 총 단백질량은 표준시료의 흡광도와 단백질농도 간의 표준 회귀 곡선으로부터 산출하였다. 총탄수화물의 경우 표준시료로 덱스트로스 (dextrose)를 이용하였으며, 총 단백질량 측정과 같은 방법으로 표준물질의 흡광도와 탄수화물 총량과의 상관 회귀 곡선으로부터 각 시료에서 얻어진 흡광도에 의거하여 총 탄수화물량을 추정 하였다.

2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

참굴의 번식량은 Kang et al., (2003)이 개발한 참굴 난에 대한 특이적인 단백질 항체를 활용하여 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)를 통하여 측정하였다. 번식량 측정을 위해 조직학적 관찰로 확인된 암컷 개체의 동결 건조된 참굴 조직 약 20 mg를 취하여 1 ml의 PBS 용액에 첨가한 뒤, 초음파 분쇄기로 균질화 시킨 후 4°C에서 원심 분리하였다. 원심분리 후 상등액은 1,000-6,000배로 희석하여 이 중 100 µl를 취하여 96-well polystyrene micro-plate에 분주하여 24시간 동안 4°C 냉장고에 항원을 준비하였다. 이후 ELISA은 Kang et al., (2003)과 Park and Choi (2004)의한 방법을 이용하였다. 최종적으로 각 시료내에 포함된 난 단백질의 총량은 microplate내에 포함된 참굴 알 표준물질의 흡광도와 참굴 알 중량과의 상관 회귀곡선을 통하여 추정되었다. 최종적으로 번식량은 total tissue weight (총 체조직무게)에 대한 알의 무게 (알의 무게는 ELISA로부터 추정된 난 단백질 양x2.4, Kang et al. 2003) 비율 (gonad somatic index, GSI)로 표시하였다.

2.5. Standardized measurements

실험에 사용된 참굴의 크기에 차이에 따른 오차를 최소화 하기 위해, 2009년 2월부터 2010년 12월까지 전체 굴 시료의 평균 각고 70.2 mm에 대한 건 중량을 표준화 하였다. 표준화된 건 중량 값에 독립적으로 체내 포함하고 있는 egg mass 값의 변화를 평가하였다. 채집된 참굴의 각고에 대한 건중량의 상대 측정식은 로그 변형 (\log^{10} 건중량에 대한 \log^{10} 각고)하여 직선회귀분석식 $Y=aX^b$ (X: 전체 참굴의 각고 평균, a: 상관관계상수, b: 상관관계식 기울기)를 이용하여 산출하였다. 산출한 참굴 건 중량의 절대값은 동일한 일반 성장식을 이용하여 참굴 알 무게를 산출하였다 mg/standard animal \pm 95% confidence index로 나타내었다 (Mondol et al., 2015).

2.6. Statistical analysis

이 연구로부터 얻어진 자료의 통계적 분석은 SPSS (version 21.0)를 사용하였다. 70.2 mm에 표준화 시킨 두 지역 참굴의 조직 건 중량 및 총 단백질, 총 탄수화물 과 생식소 지수 (GSI, 완숙기 암컷 개체 선별), Egg mass (완숙기 암컷 개체 선별 후 표준화) 항목은 총 4회 (2009-2010년 대조구 참굴, 2009-2010년 유류유출사고 지역 참굴, 2009년 대조구 참굴과 유류유출사고 지역 참굴, 2010년 대조구 참굴과 유류유출사고 지역 참굴)의 Independent samples *t*-test를 통해 표준화된 각 측정 항목 값에 대한 분산을 Levene의 *F* 검정 결과로 판단하여 $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 판단하였다. 그리고 두 지역간의 2009년과 2010년, 지역간 2009년과 2010년 참굴의 각고와 비만도에 유의성을 검정하기 위해 Two-way ANOVA를 실시하였다. 또한, 유류유출 사고 해역 참굴 [2008 (Lee, 2010)-2010년]에 대한 각 항목간 증감 유의성을 검정하기 위해 one-way ANOVA를 실시하였고, Duncan test를 통해 $P < 0.05$ 수준에서 유의차를 비교하였다.

3. Result

3.1. Growth and CI

연구기간 동안 유류피해지역 참굴의 표준화된 조직 건 중량은 2009년 1359.5 mg standard animal⁻¹(11월)- 11965.6 mg standard animal⁻¹(6월), 2010년 1206.0 mg standard animal⁻¹(9월)- 2494.4 mg standard animal⁻¹(7월)의 범위를 보였다 (Fig. 5, Table 4). 2009년 유류피해지역 참굴의 조직 건 중량은 2월 (1638.3 mg standard animal⁻¹) 부터 서서히 증가하기 시작하여 6월 (1965.6 mg standard animal⁻¹) 최고 값을 보인 이후 급격히 8월 (1489.6 mg standard animal⁻¹)까지 감소하였다. 이후 유류피해지역 참굴의 조직 건 중량은 증감을 되풀이하며 변동하였다. 이에 반해 2010년 유류피해지역 참굴의 조직 건 중량은 3월 (1341.5 mg standard animal⁻¹)부터 7월 (2494.4 mg standard animal⁻¹)까지 증가하였고 이후 8월 (1351.4 mg standard animal⁻¹)에 급격히 감소한 이후 9월 (1206.0 mg standard animal⁻¹)에 최저 값을 보였다 (Fig. 5, Table 4). 이후 조직 건 중량은 12월 (1955.4 mg standard animal⁻¹)까지 증가하였다. 유류피해지역 참굴의 조직 건 중량 최고 값은 2009년 6월 (1965.6 mg standard animal⁻¹)에 보인 반면 2010년에는 7월 (2494.4 mg standard animal⁻¹)에 측정되었고 최저 값은 2009년 11월 (1359.5 mg standard animal⁻¹), 2010년에는 1월 (1208.6 mg standard animal⁻¹)에 측정되었다. 대조구 참굴의 2009년 조직 건 중량은 957.4 – 2149.8 mg standard

animal^{-1} 의 범위를 보였고 가장 높은 조직 건 중량은 6월, 가장 낮은 값은 8월에 관찰되었다 (Fig. 5, Table 5). 2010년 대조구 참굴의 조직 건 중량은 2009년과 에 비해 비슷한 범위 ($942.7 - 2191.7 \text{ mg standard animal}^{-1}$)를 보였고 가장 높은 조직 건 중량은 2009년 비해 두 달 빠른 4월, 가장 낮은 값은 2009년과 동일한 시기인 8월에 측정되었다. 유류피해지역 참굴의 2009년 연 평균 조직 건 중량은 $1592.2 \text{ mg standard animal}^{-1}$ 로 2010년 연 평균 $1580.2 \text{ mg standard animal}^{-1}$ 에 비해 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$; Fig. 5, Table 4, 6). 그리고 2009년 연 평균 유류피해지역 참굴의 조직 건 중량 ($1663.2 \text{ mg standard animal}^{-1}$)은 대조구 참굴의 2009년 조직 건 중량 연 평균 ($1447.3 \text{ mg standard animal}^{-1}$)에 비해 높았으며 이와 같은 결과는 유의적인 차이를 보였다 ($P < 0.05$; Fig. 5, Table 4, 6). 2009년 유류피해지역 참굴의 높은 연 평균 조직 건 중량 값은 2010년 ($1580.2 \text{ mg standard animal}^{-1}$)에도 대조구 참굴 연 평균 ($1415.8 \text{ mg standard animal}^{-1}$) 조직 건 중량보다 높았으나 유의적인 차이를 보이지 않았다.

연구기간 동안 측정된 유류피해지역 참굴의 2009년 비만도 범위는 $8.1 \pm 0.4 - 13.2 \pm 0.4$ 이었고 가장 높은 비만도는 7월 (13.2 ± 0.4), 가장 낮은 비만도는 11월 (8.1 ± 0.4)에 관찰되었다 (Fig. 4, Table 4). 2009년 유류피해지역 참굴 비만도

는 연구 초기 2월 (10.0 ± 0.3)부터 서서히 증가하기 시작하여 7월 (13.2 ± 0.4)에 가장 높은 비만도를 보인 이후 8월 (10.7 ± 0.3)에 급격히 감소한 이후 11월 (8.1 ± 0.4)까지 지속적으로 감소하였다. 이에 반해 2010년 유류피해지역 참굴의 비만도는 $6.7 \pm 0.3 - 16.2 \pm 0.5$ 의 범위를 보였고 조사 초기 1월 (8.1 ± 0.4)부터 2월 (9.1 ± 0.4)까지 증가하였지만 증감 없이 4월까지 지속되었다 (Fig. 4, Table 4). 이후 유류피해지역 참굴의 비만도는 5월 (9.7 ± 0.4)부터 급격히 증가하였는데 7월 (16.2 ± 0.5)에 최고 값을 보인 이후 8월 (7.8 ± 0.2)에 급격히 감소하였고 9월 (6.7 ± 0.3)에 가장 낮은 비만도를 보였다. 유류피해지역 참굴의 비만도는 두 해 모두 비슷한 계절적 패턴을 보였다. 유류피해지역 참굴의 가장 높은 비만도는 두 해 모두 7월 (2009, 13.2 ± 0.4 ; 2010, 16.2 ± 0.5)에, 가장 낮은 비만도는 2009년 11월 (8.1 ± 0.4), 2010년에는 9월 (6.7 ± 0.3)에 관찰되었다. 2009년 대조구 참굴의 비만도는 2009년 $6.6 \pm 0.2 - 16.9 \pm 0.6$ 이었고 가장 높은 비만도는 5월 (16.9 ± 0.6), 가장 낮은 비만도는 8월 (6.6 ± 0.2)에 관찰되었다 (Fig. 4, Table 5). 2009년 비만도는 2월 (8.9 ± 0.4)부터 5월 (16.9 ± 0.6)까지 증가해 최고 값을 보인 이후 비만도가 급격히 8월 (6.6 ± 0.2)까지 감소하였다. 2010년 대조구 참굴의 비만도는 $5.5 \pm 0.2 - 12.0 \pm 0.6$ 이었고 가장 높은 비만도는 4월 (12.0 ± 0.6), 가장 낮은 비

만도는 8월 (5.5 ± 0.2)에 관찰되었고 계절적 변동은 2009년과 비슷하였다 (Fig. 4, Table 5).

Table 4. Annual variation of oyster Tissue Dry Weight (TDWT), Condition Index (CI), percentage of total protein and carbohydrate, Gonad Somatic Index (GSI) and Egg mass at the of contaminated area from February 2009 to December 2010. All the values are mean \pm 95% confidence interval.

Years	Month	TDWT (mg standard animal ⁻¹)	CI	Carbohydrate (%)	Protein (%)	GSI (%)	Egg mass (mg standard animal ⁻¹)
2009	Feb	1638.3 \pm 111.1	10.0 \pm 0.3	19.4 \pm 0.6	30.2 \pm 0.6	N.D	N.D
	Mar	1658.3 \pm 142.2	11.8 \pm 0.4	20.2 \pm 0.9	32.1 \pm 0.7	2.0 \pm 0.5	39.9 \pm 10.4
	Apr	1667.2 \pm 179.8	10.9 \pm 0.5	17.9 \pm 1.0	33.2 \pm 0.7	2.0 \pm 0.3	35.4 \pm 5.3
	May	1697.1 \pm 148.8	10.8 \pm 0.4	16.1 \pm 0.7	35.4 \pm 0.6	8.1 \pm 1.7	124.7 \pm 37.9
	Jun	1965.6 \pm 176.4	12.5 \pm 0.4	13.9 \pm 0.7	36.0 \pm 0.6	25.2 \pm 2.8	481.1 \pm 102.3
	Jul	1895.7 \pm 145.5	13.2 \pm 0.4	7.9 \pm 0.7	37.9 \pm 0.8	32.3 \pm 5.7	669.6 \pm 131.3
	Aug	1489.6 \pm 107.7	10.7 \pm 0.3	18.6 \pm 0.8	35.8 \pm 0.7	12.2 \pm 1.2	175.6 \pm 23.4
	Sep	1680.5 \pm 201.9	10.8 \pm 0.5	21.8 \pm 1.5	34.3 \pm 0.7	22.7 \pm 3.9	374.9 \pm 108.4
	Oct	1537.8 \pm 165.8	9.9 \pm 0.7	23.6 \pm 1.4	35.6 \pm 0.7	2.5 \pm 2.1	19.9 \pm 17.4
	Nov	1359.5 \pm 167.0	8.1 \pm 0.4	21.4 \pm 1.4	37.7 \pm 0.9	1.7 \pm 0.9	17.3 \pm 3.4
	Dec	1705.3 \pm 220.7	9.3 \pm 0.4	23.0 \pm 1.3	35.0 \pm 0.7	N.D	N.D
	2010	Jan	1208.6 \pm 163.0	8.1 \pm 0.4	16.3 \pm 1.2	36.1 \pm 0.6	N.D
Feb		1460.0 \pm 182.9	9.1 \pm 0.4	14.8 \pm 0.8	34.1 \pm 0.6	N.D	N.D
Mar		1341.5 \pm 140.7	9.1 \pm 0.4	18.0 \pm 0.9	34.5 \pm 0.5	N.D	N.D
Apr		1353.1 \pm 119.4	9.1 \pm 0.4	15.3 \pm 0.9	33.9 \pm 0.5	1.8 \pm 0.1	23.9 \pm 11.2
May		1690.9 \pm 203.3	9.7 \pm 0.4	15.2 \pm 0.8	33.0 \pm 0.7	10.9 \pm 3.3	149.2 \pm 72.7
Jun		2454.8 \pm 234.8	16.1 \pm 0.4	14.8 \pm 0.6	33.9 \pm 0.4	22.8 \pm 5.0	457.2 \pm 133.8
Jul		2494.4 \pm 235.3	16.2 \pm 0.5	8.8 \pm 0.7	39.2 \pm 0.8	33.5 \pm 6.6	695.3 \pm 245.1
Aug		1351.4 \pm 91.7	7.8 \pm 0.2	14.2 \pm 0.7	34.5 \pm 0.7	25.7 \pm 5.2	294.7 \pm 63.6
Sep		1206.0 \pm 110.6	6.7 \pm 0.3	17.2 \pm 1.1	34.5 \pm 0.7	20.3 \pm 6.7	206.6 \pm 140.8
Oct		1572.0 \pm 181.7	10.7 \pm 0.5	18.9 \pm 1.0	34.4 \pm 1.5	1.6 \pm 0.5	40.1 \pm 63.9
Nov		1739.7 \pm 167.4	11.9 \pm 0.5	21.5 \pm 1.4	30.7 \pm 0.8	N.D	N.D
Dec		1955.4 \pm 225.5	11.4 \pm 0.5	23.1 \pm 1.3	33.9 \pm 0.5	N.D	N.D

Table 5. Annual variation of oyster Tissue Dry Weight (TDWT), Condition Index (CI), percentage of total protein and carbohydrate, Gonad Somatic Index (GSI) and Egg mass at the of control area from February 2009 to December 2010. All the values are mean \pm 95% confidence interval.

Years	Month	TDWT (mg standard animal ⁻¹)	CI	Carbohydrate (%)	Protein (%)	GSI (%)	Egg mass (mg standard animal ⁻¹)
2009	Feb	1797.8 \pm 135.2	8.9 \pm 0.4	17.5 \pm 0.9	33.9 \pm 0.5	1.2 \pm 0.1	23.3 \pm 8.1
	Mar	1120.8 \pm 66.3	10.2 \pm 0.3	17.6 \pm 0.9	33.9 \pm 0.6	2.6 \pm 1.5	17.1 \pm 16.7
	Apr	1830.9 \pm 113.7	15.4 \pm 0.5	29.5 \pm 1.8	31.2 \pm 0.4	9.6 \pm 2.1	136.8 \pm 43.4
	May	2032.4 \pm 129.9	16.9 \pm 0.6	22.8 \pm 1.4	34.4 \pm 0.6	22.0 \pm 5.1	514.1 \pm 119.8
	Jun	2149.8 \pm 160.6	15.6 \pm 0.5	11.1 \pm 0.6	34.5 \pm 0.7	37.8 \pm 7.5	745.5 \pm 226.0
	Jul	1203.2 \pm 95.8	7.5 \pm 0.2	7.9 \pm 0.6	38.6 \pm 0.8	21.9 \pm 2.7	253.8 \pm 56.3
	Aug	957.4 \pm 76.6	6.6 \pm 0.2	11.3 \pm 0.9	40.0 \pm 0.7	14.8 \pm 4.5	118.9 \pm 32.5
	Sep	1221.1 \pm 111.5	7.2 \pm 0.3	15.7 \pm 1.2	39.0 \pm 0.7	14.8 \pm 7.2	103.9 \pm 69.8
	Oct	1164.9 \pm 150.5	8.0 \pm 0.7	18.6 \pm 1.3	39.4 \pm 0.9	2.0 \pm 0.5	31.1 \pm 36.4
	Nov	1143.8 \pm 105.9	7.3 \pm 0.3	18.8 \pm 1.4	38.0 \pm 0.6	N.D	N.D
	Dec	1297.7 \pm 101.1	8.7 \pm 0.3	22.9 \pm 1.4	34.2 \pm 1.1	N.D	N.D
	2010	Jan	1206.9 \pm 107.4	6.8 \pm 0.2	12.8 \pm 1.1	37.8 \pm 0.5	N.D
Feb		1275.9 \pm 79.4	8.5 \pm 0.4	17.4 \pm 1.1	34.7 \pm 0.5	N.D	N.D
Mar		1582.9 \pm 125.1	10.2 \pm 0.8	24.5 \pm 1.2	32.0 \pm 0.5	N.D	N.D
Apr		2191.7 \pm 270.9	12.0 \pm 0.6	30.9 \pm 1.6	29.9 \pm 0.5	8.6 \pm 2.8	145.2 \pm 64.8
May		1382.8 \pm 283.6	10.4 \pm 0.6	26.6 \pm 1.1	30.6 \pm 0.6	12.0 \pm 2.5	124.4 \pm 63.7
Jun		1727.1 \pm 219.4	11.2 \pm 0.4	16.8 \pm 1.0	33.5 \pm 0.6	30.8 \pm 6.0	464.5 \pm 156.7
Jul		1521.3 \pm 218.1	11.3 \pm 0.7	12.8 \pm 0.9	37.1 \pm 1.1	37.0 \pm 8.5	483.9 \pm 268.7
Aug		942.7 \pm 96.6	5.5 \pm 0.2	14.2 \pm 0.9	35.7 \pm 0.3	10.0 \pm 3.6	77.3 \pm 37.4
Sep		1265.9 \pm 119.4	6.2 \pm 0.2	15.9 \pm 0.9	37.1 \pm 0.7	7.8 \pm 5.5	57.5 \pm 127.8
Oct		1218.2 \pm 158	8.6 \pm 0.4	16.5 \pm 1.9	31.0 \pm 0.4	N.D	N.D
Nov		1333.3 \pm 160.7	8.8 \pm 0.4	20.1 \pm 0.9	29.5 \pm 0.7	N.D	N.D
Dec		1340.9 \pm 243.7	8.8 \pm 0.6	16.6 \pm 1.3	35.1 \pm 0.4	N.D	N.D

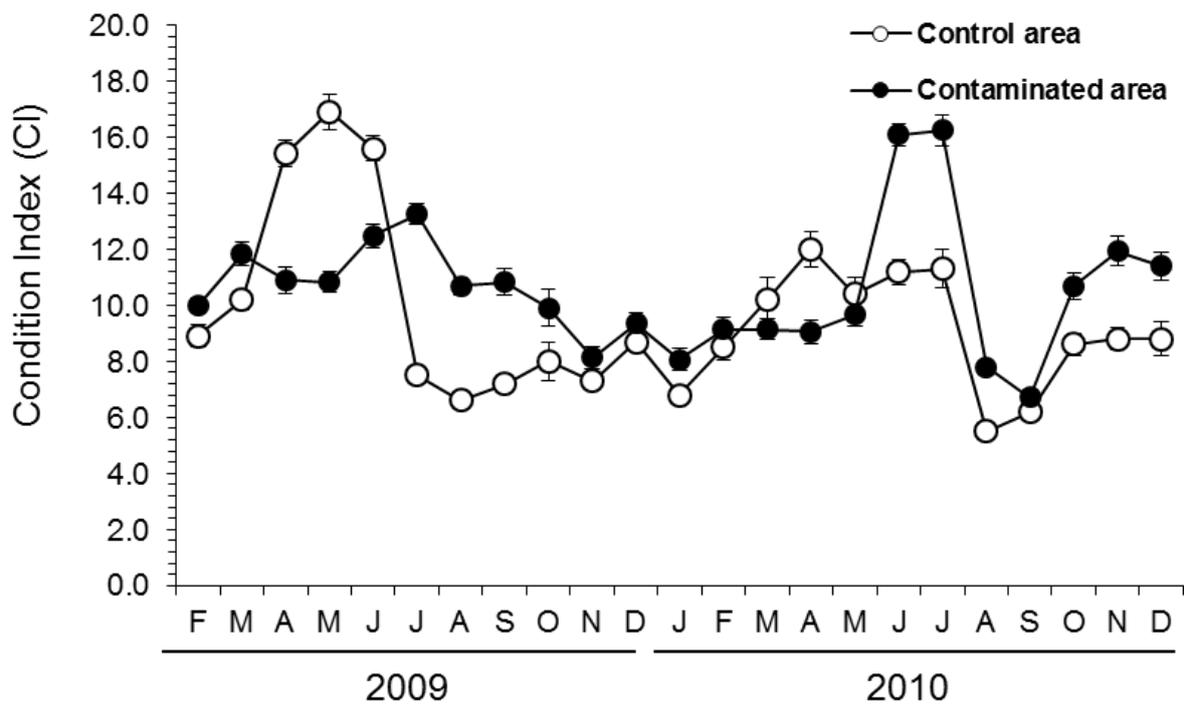


Fig. 4. Annual variations in condition index of Pacific oyster in the control area and the oil contaminated area from February 2009 to December 2010. Values represent mean \pm standard error ($n=30$)

3.2 Biochemical composition

연구기간 동안 측정된 유류피해지역 참굴의 2009년 체 조직 내 총 탄수화물량은 7.9 – 23.6%의 범위를 보였고 가장 높은 값은 10월 ($23.6 \pm 1.4\%$)에 관측된 반면, 가장 낮은 총 탄수화물량은 7월 ($7.9 \pm 0.7\%$)에 관찰되었다 (Fig. 5, Table 4). 유류피해지역 참굴의 체 조직 내 탄수화물 총량은 연구 초기 $19.4 \pm 0.6\%$ (2월)을 시작으로 지속적으로 7월 ($7.9 \pm 0.7\%$)까지 감소한 이후 8월 ($18.6 \pm 0.8\%$)에 급격히 증가한 이후 10월 ($23.6 \pm 1.4\%$)에 최고 값을 보인 이후 감소하는 계절적 변동을 보였다. 2010년에는 3월 ($18.0 \pm 0.9\%$)부터 7월 ($8.8 \pm 0.7\%$)까지 지속적으로 감소한 이후 8월 (14.2%)부터 12월 ($23.1 \pm 1.3\%$)까지 다시 증가하였고 최고 값을 보였다 (Fig. 5, Table 4). 유류피해지역 참굴의 2009-2010년 체 조직 내 탄수화물은 봄부터 여름 (7월)까지 감소하고 8월 이후부터 가을 및 겨울까지 증가하는 계절적 패턴을 보였다. 대조구 참굴의 체 조직 내 총 탄수화물량은 2009년 7.9 – 20.9%의 범위를 보였고 가장 높은 값은 4월 ($29.5 \pm 1.8\%$), 가장 낮은 값은 7월 ($7.9 \pm 0.6\%$)에 관찰되었다 (Fig. 5, Table 5). 유류피해지역 참굴의 2009년 연 평균 총 탄수화물 량 (18.6%)은 2010년 평균 (16.8%)보다 높았으나 유의적인 차이를 보이지 않았다. 대조구 참굴은 2009년 7.9 – 29.5%의 범위를 보였고, 2월 ($17.5 \pm 0.9\%$)부터 4월 ($29.5 \pm 1.8\%$)까지 급격히 증가해 최고 값을 보인

이후 7월 ($7.9 \pm 0.6\%$)까지 급격히 감소한 이후 8월 ($11.3 \pm 11.3\%$)이후부터 12월 ($22.9 \pm 1.4\%$)까지 지속적으로 증가하는 계절적 패턴을 보였다. 이와 같은 계절적 패턴은 2010년에도 관찰되었으며 12.8 – 30.9%의 범위를 보였다 (Fig. 5, Table 5). 2009년과 마찬가지로 가장 높은 총 탄수화물량은 4월 ($30.9 \pm 1.6\%$), 가장 낮은 값은 7월 ($12.8 \pm 0.9\%$)에 관찰되었다. 대조구 참굴의 2009년 연 평균 총 탄수화물량 (17.6%)은 2010년 평균 (18.7%)보다 낮았으나 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 6). 두 지역 참굴의 체조직 내 총 탄수화물량은 서로 다른 계절적 패턴을 보였는데, 유류피해지역 참굴의 총 탄수화물량은 2월부터 7월까지 급격히 감소한 이후, 8월부터 급격히 그 값이 증가해 10월에 최고값을 보이는 반면, 대조구 참굴의 총 탄수화물량은 1월부터 4월까지 급격히 증가해 최고 값을 보인 이후 7월까지 감소한 이후 8월부터 다시 증가하는 계절적 변동을 보였다. 2009년 유류피해지역 참굴의 연 평균 탄수화물 총량 (18.6%)은 대조구 참굴 (17.6%)보다 1% 가량 유의적 ($P < 0.05$)으로 높았다. 그러나 2010년에는 유류피해지역 참굴의 총 탄수화물량 (16.8%)이 대조구 참굴 (18.7%)보다 약 2% 가량 유의적 ($P < 0.05$)으로 낮았다 (Table 6).

연구기간 동안 측정된 유류피해지역 참굴의 체조직 내 단백질 총량은

2009년 30.2 – 37.9%의 범위를 보였다 (Fig. 5, Table 4). 유류피해지역 참굴의 체 조직 내 단백질 총량은 연구 초기 $30.2 \pm 0.6\%$ (2월)을 시작으로 지속적으로 7월 ($37.9 \pm 0.8\%$)까지 서서히 증가한 이후 8월 ($35.8 \pm 0.7\%$)에 감소해 9월 ($34.3 \pm 0.7\%$)까지 감소하였고 이후 증감을 반복하였다. 유류피해지역 참굴의 2010년 체조직 내 단백질 총량은 1월 ($36.1 \pm 0.6\%$)이후부터 6월 ($33.9 \pm 0.4\%$)까지 감소하였으나, 7월 ($39.2 \pm 0.8\%$)에 급격히 증가해 최고 값을 보인 이후 11월 ($30.7 \pm 0.8\%$)까지 감소하였다 (Fig. 5, Table 4). 유류피해지역 참굴의 2009 – 2010년 체 조직 내 총 단백질량은 별다른 차이를 보이지 않았다. 2009년 대조구 참굴의 총 단백질량은 31.2 – 40.0%, 2010년에는 29.5 – 37.8%의 범위를 보였다 (Fig. 5, Table 5). 두 지역 참굴의 체 조직 내 총 단백질량은 산란 직전 시기에 연중 가장 높은 값을 보였고 두 지역 간 차이는 보이지 않았다 (Table 6).

Table 6. Independent t-test result of average value for the effects of years (control site vs. contaminated site) and treatments (2009 vs. 2010) on the standardized tissue dry weight, protein, carbohydrate, gonad somatic index and egg mass.

Variables	Contaminated area		Control area		2009		2010	
	2009	2010	2009	2010	Contaminated area	Control area	Contaminated area	Control area
Tissue dry weight (mg standard animal ⁻¹)	1592.2	1580.2*	1447.3	1415.8	1592.2	1447.3*	1580.2	1415.8
Protein (%)	34.8	34.4	36.1	33.7*	34.8	36.1	34.4	33.7
Carbohydrate (%)	18.6	16.8*	17.6	18.7	18.6	17.6*	16.8	18.7*
Egg mass (mg standard animal ⁻¹)	460.9	540.4	457.7	383.2	460.9	457.7	540.4	383.2
GSI (%)	27.7	34.7*	29.7	33.3	27.7	29.7	34.7	33.3*

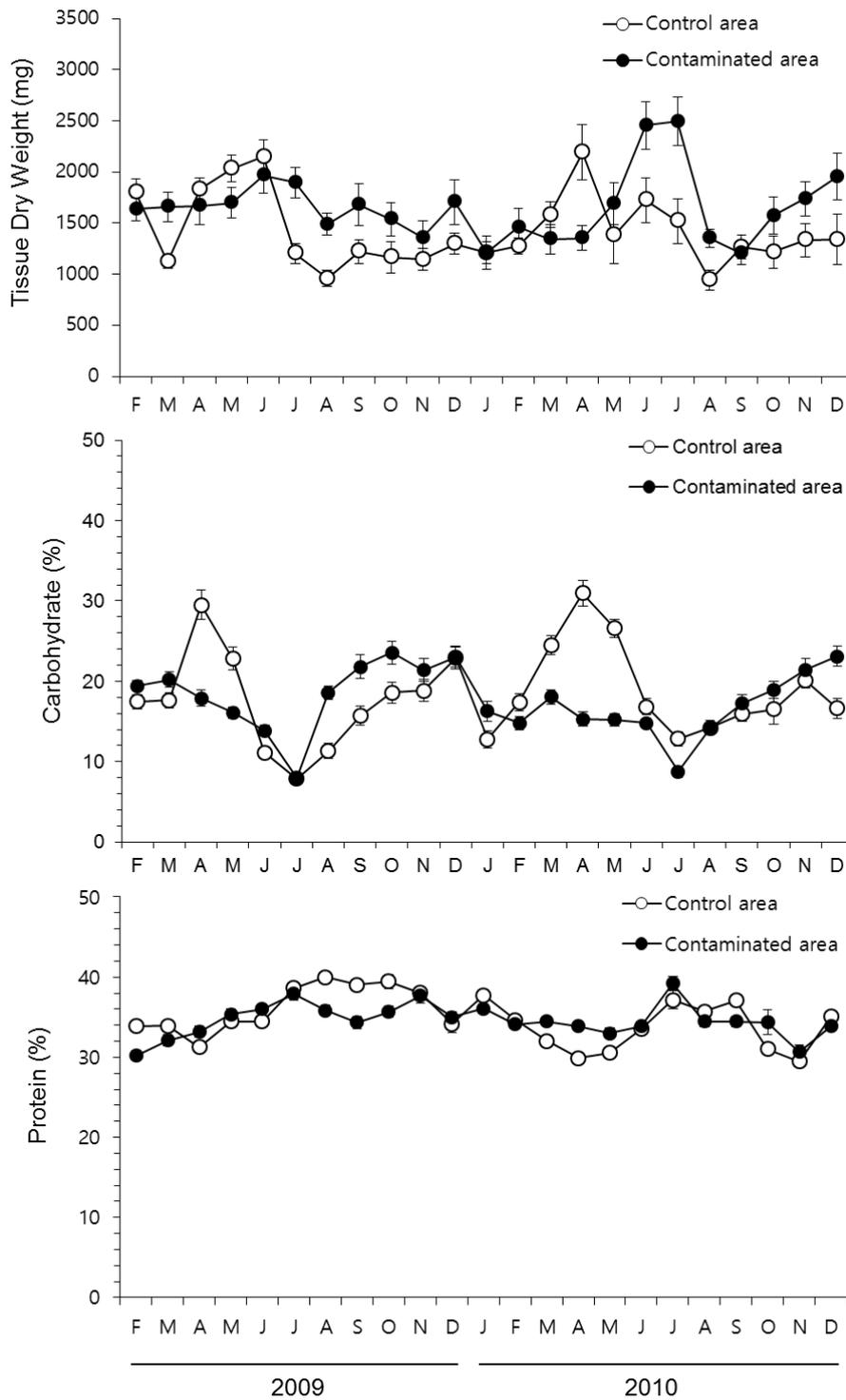


Fig. 5. Annual variations in tissue dry weight in a standard animal of a shell height 70.2 mm and percentage of total protein and carbohydrate in the control area and the oil contaminated area. Vertical bars represent 95% confidence interval in tissue dry weight and standard error in total protein and carbohydrate.

3.3 Reproductive effort

조직학적 방법을 이용하여 유류피해지역 참굴의 생식소를 관찰한 결과 실험 초기인 2009년 2월 휴지기 단계 (15.0%), 초기발달단계 (77.5%), 후기발달 단계 (7.5%)가 관찰되었다 (Fig. 6). 휴지기 상태의 참굴은 2월부터 4월까지, 10월부터 12월까지 관찰되었다. 유류피해지역 참굴의 초기발달 단계는 2월 (77.5%)부터 7월 (3.3%)까지 관찰되었다. 완숙기 참굴은 6월 (20.0%)에 처음 관찰되어 9월 (20.0%)까지 지속적으로 관찰되었다. 부분산란기는 8월 (86.7%)에 처음 관찰되었고 11월 (3.3%)까지 지속되었다. 주된 산란의 경우, 8월 (86.7%)과 9월 (80.0%)사이에 집중적으로 관찰되었다. 유류피해지역 참굴의 2010년 첫 배우자 형성은 1월 (26.7%)에 처음 관찰되었고, 초기 발달단계는 1월 (26.7%)부터 5월 (43.3%)까지 관찰되었다 (Fig. 6). 완숙기 참굴은 6월 (26.7%)에 처음 관찰되어 9월 (3.3%)까지 지속적으로 관찰되었다. 부분산란기는 8월 (86.7%)에 처음 관찰되었고 10월 (6.7%)까지 지속되었다. 주된 산란의 경우, 8월 (73.3%)과 9월 (96.7%)사이에 집중적으로 관찰되었다. 연구기간 동안 측정된 유류피해지역 참굴의 성 성숙과 산란은 유사한 계절적 양상을 보였다. 대조구 참굴의 생식소 발달단계를 관찰한 결과 2009년 실험 초기 대부분의 참굴이 초기발달단계 (62.5%)였다 (Fig. 6). 이후, 완숙기의 참굴은 5월 (13.3%)에 처음 관찰되었고 부분 산란은 6월 (13.3%)에 개시하여 10월 (6.7%)까지

관찰되었다. 주 산란시기는 7-8월 (50%, 83.3%)에 관찰되었다. 대조구 참굴의 2010년은 2009년과 동일하게 완숙기 참굴이 5월 (3.3%)에 처음 관찰된 7월 (100%) 모든 개체가 완숙기 단계였다 (Fig. 6). 이후 부분 산란은 2009년 보다 한달 늦은 8월 (80%)에 개시하여 9월 (3.3%)에 종료되었고 주 산란시기는 8월 (80%)이었다. 2009년 유류피해지역 참굴과 대조구 참굴의 생식소 발달단계를 비교해본 결과 유류피해지역 참굴의 생식소 발달이 대조구 참굴에 비해 모든 단계에서 한달 가량 더디게 진행되었다. 2009년 유류피해지역 참굴에서 처음 완숙기가 관찰된 시기는 6월 (20.0%)이었던 반면 대조구 참굴은 5월 (55.2%)에 관찰되었고, 부분산란 단계 역시 유류피해 지역 참굴은 8월 (86.7%)에 처음 관찰된 반면 대조구 참굴은 두달 빠른 6월 (13.3%)에 관찰되었다. 주 산란기 역시 유류피해지역 참굴은 8-9월이었던 반면 대조구 참굴은 한달 빠른 7-8월에 관찰되었다. 2010년 처음 완숙기가 관찰된 시기는 2009년과 마찬가지로 유류피해지역 참굴 (6월, 26.7%)에 비해 대조구 참굴 (5월 3.3%)이 한달 먼저 관찰되었다. 그러나 부분산란기는 두 지역 모두 8월 (유류피해지역 참굴, 73.3%; 대조구 참굴, 80%)이었고 주 산란시기 역시 유류피해지역 참굴은 8-9월이었고 대조구 참굴은 8월이었다.

조직학적 관찰방법으로 완숙기가 확인된 암컷 개체만을 선별하여 Kang et al. (2003)이 개발한 참굴 알에 특이적인 항체를 이용하여 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay)방법을 사용하여 두 지역간 참굴 생식소 지수 및 Egg mass를 산출하였다 (Fig. 7, Table 4). 2009년 유류피해지역 참굴의 생식소 지수는 $1.7 \pm 0.9\%$ - $32.3 \pm 5.7\%$ 의 범위를 보였고 3월 ($2.0 \pm 0.5\%$) 이후 7월 ($32.3 \pm 5.7\%$) 까지 급격히 증가하였고 이후 8월 ($12.2 \pm 1.2\%$) 에 급격히 감소한 이후 9월 ($22.7 \pm 3.9\%$) 에 증가 후 다시 급격히 11월 ($1.7 \pm 0.9\%$) 까지 감소하는 계절적 패턴을 보였다. 2010년에는 4월 ($1.8 \pm 0.1\%$)에 처음 생식소 지수가 측정된 이후 7월 ($33.5 \pm 6.6\%$)까지 매월 10%씩 증가하였다 (Fig. 7, Table 4). 이후 생식소 지수는 10월 ($1.6 \pm 0.5\%$) 까지 지속적으로 감소하였다. 연구기간 동안 (2009 - 2010년) 유류피해지역 참굴 생식소 지수의 계절적 변화는, 2009년 생식소 지수 최대치 (7월, 32.3%; 9월, 22.7%)가 2회 관찰된 반면 2010년 (7월, 33.5%)에는 1회만 관찰되었다.

대조구 참굴의 2009년 생식소 지수는 $1.2 \pm 0.1\%$ - $37.8 \pm 7.5\%$ 의 범위를 보였고 2월 ($1.2 \pm 0.1\%$) 이후 6월 ($37.8 \pm 7.5\%$)까지 급격히 증가하였고 이후 8월 ($14.8 \pm 4.5\%$) 에 급격히 감소한 이후 11월 ($2.0 \pm 0.5\%$)까지 감소하는 계절적 변화 양상을 보였다 (Fig. 7, Table 5). 2010년에는 4월 ($8.6 \pm 2.8\%$)에 처음 생식소 지수가

측정된 이후 7월 ($37.0 \pm 8.5\%$)까지 증가하였다. 이후 생식소 지수는 9월 ($7.8 \pm 5.5\%$) 까지 급격히 감소하였다. 연구기간 동안 (2009 - 2010년) 대조구 참굴 생식소 지수의 계절적 변이는, 생식소 지수 최대치가 두 해 모두 1회 (2009년, 6월; 2010년 7월)만 관찰되었다. 두 지역 참굴 생식소 지수의 계절적 변화는, 생식소 발달 계절적 변동과 유사한 결과를 보였다. 조직학적 관찰방법으로 완숙기가 확인된 암컷 개체만을 선별하여 2009-2010년 두 지역 참굴의 생식소 지수를 확인하였다 (Fig. 7). 유류피해지역 참굴의 연 평균 생식소 지수는 2009년 (27.7%)에 비해 2010년 (34.7%)이 유의적 ($P < 0.05$)으로 높았다 (Table 6). 이에 반해 대조구 참굴의 연 평균 생식소 지수는 2009년 (29.7%)과 2010년 (33.3%)의 유의적인 차이는 없었다. 그리고 2009년 (유류피해지역 참굴, 27.7%; 대조구 참굴 29.7%)과 2010년 (유류피해지역 참굴, 34.7%; 대조구 참굴 33.3%) 두 지역 참굴의 연 평균 생식소 지수 결과 역시 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 6).

연구기간 동안 측정된 두 지역 참굴의 생식소지수를 표준화하여 참굴 조직 내 존재하는 알의 무게 (egg mass)를 환산한 결과 생식소지수 계절적 변동과 유사하게 조사되었다 (Fig. 7). 2009년 유류피해지역 참굴의 egg mass는 $17.3 \pm 3.4 - 669.6 \pm 131.3$ mg egg standard animal⁻¹의 범위를 보였고 3월 (39.9 mg egg standard

animal⁻¹) 이후 7월 (669.6 mg egg standard animal⁻¹) 까지 급격히 증가하였고 이후 8월 (175.6 mg egg standard animal⁻¹) 에 급격히 감소한 이후 9월 (374.9 mg egg standard animal⁻¹) 에 증가 후 다시 급격히 11월 (17.3 mg egg standard animal⁻¹) 까지 감소하는 계절적 패턴을 보였다 (Fig. 7, Table 4). 2010년에는 4월 (23.9 mg egg standard animal⁻¹)에 처음 생식소 지수가 측정된 이후 7월 (695.3 mg egg standard animal⁻¹)까지 매월 10%씩 증가하였다. 이후 생식소 지수는 10월 (40.1 mg egg standard animal⁻¹) 까지 지속적으로 감소하였다. 연구기간 동안 (2009 - 2010년) 유류 피해지역 참굴 egg mass 계절적 패턴은 생식소 지수 결과와 동일하였는데 egg mass peak (7월, 669.6 mg egg standard animal⁻¹; 9월, 374.9 mg egg standard animal⁻¹)가 2회 관찰된 반면 2010년 (7월, 695.3 mg egg standard animal⁻¹)에는 1회만 관찰되었다.

대조구 참굴의 2009년 egg mass는 $17.1 \pm 16.7 - 745.5 \pm 226.0$ mg egg standard animal⁻¹의 범위를 보였고 2월 (23.3 mg egg standard animal⁻¹) 이후 6월 (745.5 mg egg standard animal⁻¹) 까지 급격히 증가하였고 이후 10월 (31.1 mg egg standard animal⁻¹) 까지 감소하였다 (Fig. 7, Table 5). 2010년에는 4월 (145.2 mg egg standard animal⁻¹)에 처음 egg mass 가 측정된 이후 7월 (483.9 mg egg standard animal⁻¹)까지 증가하였다. 이후 생식소 지수는 9월 (57.5 mg egg standard animal⁻¹) 까지 급

격히 감소하였다. 연구기간 동안 (2009 - 2010년) 대조구 참굴 egg mass는 연중 최대치가 두 해 모두 1회 (2009년, 6월; 2010년 7월)만 관찰되었다. 조직학적 관찰방법으로 완숙기가 확인된 암컷 개체만을 선별하여 2009 - 2010년 두 지역 참굴의 egg mass를 측정한 결과, 유류피해지역 참굴의 연 평균 egg mass는 2009년 (460.9 mg eggs standard animal⁻¹)에 비해 2010년 (540.4 mg eggs standard animal⁻¹) 높았으나 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 6). 대조구 참굴의 연 평균 egg mass는 2009년 (457.7 mg eggs standard animal⁻¹)이 2010년 (383.2 mg eggs standard animal⁻¹) 보다 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 그리고 2009년 (유류피해지역 참굴, 460.9 mg eggs standard animal⁻¹; 대조구 참굴 457.7 mg eggs standard animal⁻¹)과 2010년 (유류피해지역 참굴, 540.4 mg eggs standard animal⁻¹; 대조구 참굴 383.2 mg eggs standard animal⁻¹) 두 지역 참굴의 연 평균 생식소 지수 결과 역시 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 6).

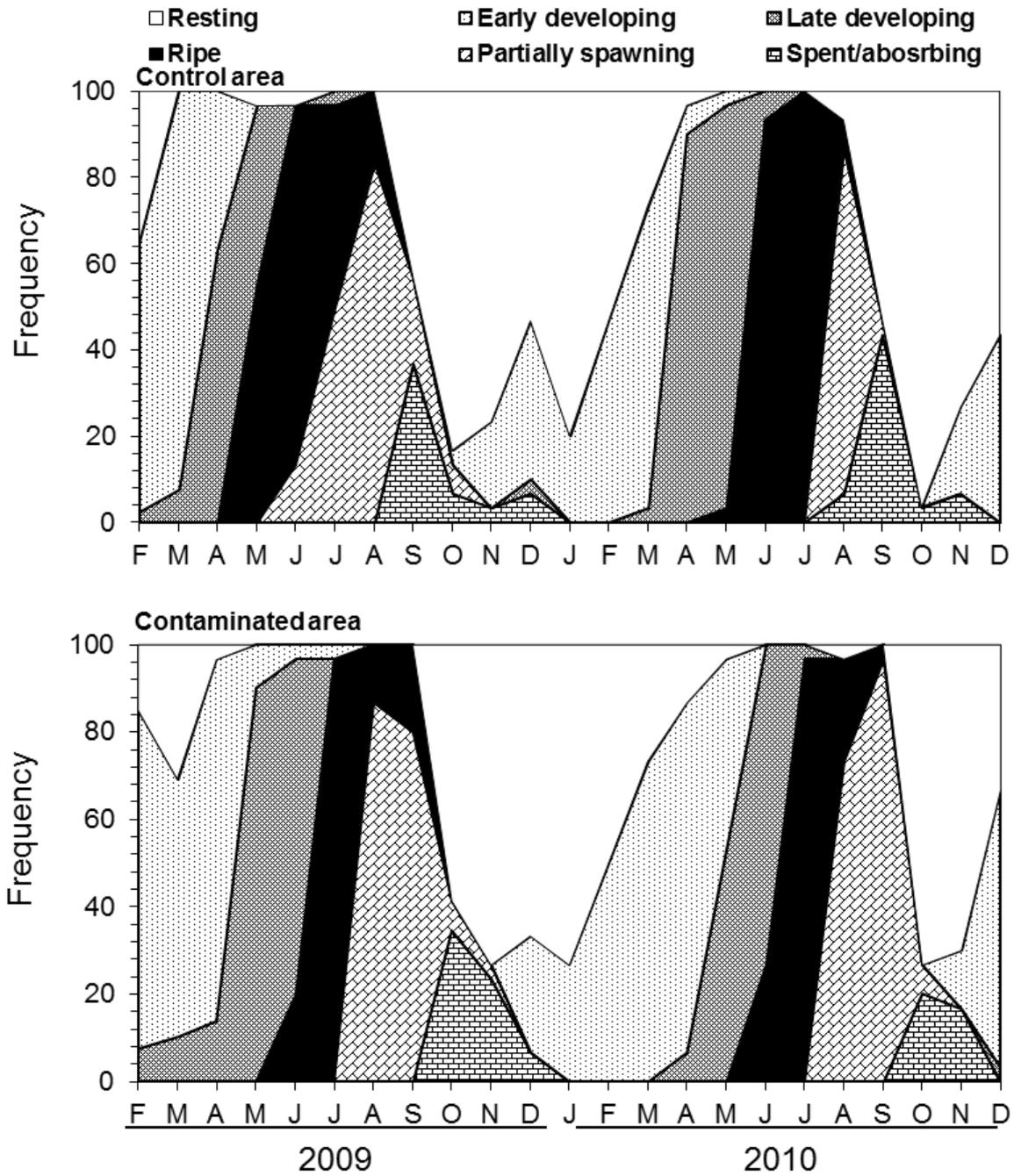


Fig. 6. Monthly percentage distribution of gametogenic stages of Pacific oyster from the control area and the oil contaminated area from February 2009 to December 2010.

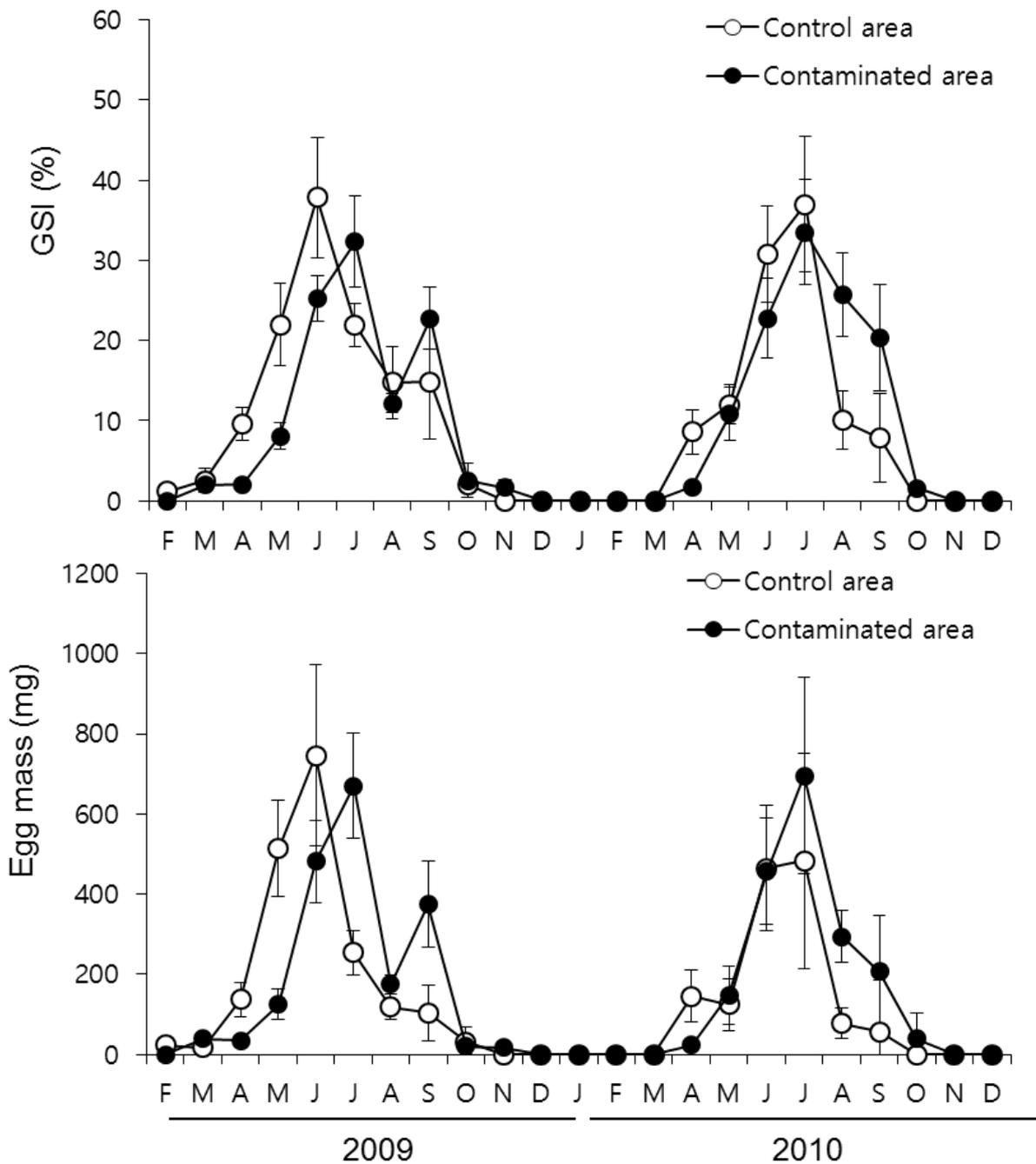


Fig. 7. Seasonal variations in Gonad Somatic Index (GSI) and the standardized egg mass of Pacific oyster in the control area and the oil contaminated area from February 2009 to December 2010. For GSI values are mean \pm standard error; egg mass vertical bars represent 95% confidence interval.

4. Discussion

4.1. Physiological parameter variation

이 연구는 *Hebei spirit* 유류유출사고 1년 후 유류피해지역 양식 참굴의 성장, 생리적 또는 번식학적 요인의 회복양상 또는 원유스트레스의 영향을 파악하기 위해 수행되었다. 해산 이매패류에게 있어 성장은 환경오염지표로서 널리 사용되고 있으며 생리상태가 성장에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Salazar and Salazar, 1991). 2009년 유류피해 참굴의 체 조직 건중량 ($1592.2 \text{ mg standard animal}^{-1}$)은 2010년 측정치보다 ($1580.2 \text{ mg standard animal}^{-1}$) 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$; Fig. 5, Table 4). 그리고 2009년 유류피해지역 참굴의 체 조직 건중량 ($1592.2 \text{ mg standard animal}^{-1}$)은 대조구 참굴 ($1447.3 \text{ mg standard animal}^{-1}$)보다 높았으나 ($P < 0.05$), 2010년에는 두 지역간 유의적인 차이는 없었다 (Table 6). 유출된 원유에서 파생된 PAHs는 해양환경에 서식하는 무척추동물 및 척추동물의 성장에 부정적인 영향을 미치며, 일반적으로 성장을 감소시키는 것으로 알려져 있다 (Thomas et al., 1999). 또한 Lee (2010)은 *Hebei Spirit* 유류유출사고 이후 유류피해지역 양식 참굴의 2008년 체 조직 건중량을 측정한 결과 $823.2 \text{ mg standard animal}^{-1}$ 로 2009년과 2010년에 비해 유의적으로 낮은 것으로 보고하였다 ($P < 0.05$; Table 7). 결과적으로 유류피해지역 참굴은 시간이 지남에 따라 체 조직 건중량이 증가한

것으로 보아 유류피해지역 참굴이 원유노출에 의한 스트레스로부터 생리적인 회복을 보인 것으로 사료된다. 이전에 보고된 연구들에 의하면 해산 이매패류의 정상적인 수준의 회복은 유류오염농도가 기준치 이하로 돌아왔을 때로 보고한 바 있다 (Laffon et al., 2006; Cajaraville et al., 2006). 국토해양부에서는 *Hebei Spirit* 유류유출사고와 관련하여 광범위한 해양 환경모니터링 프로젝트를 2008년부터 수행한 바 있는데 연구결과에 의하면 유류유출사고 10개월만에 유류유출피해지역 (유류피해지역 포함)의 유류오염물질농도가 급격히 감소하였음을 보고하였다. *Hebei Spirit* 유류유출사고 초기 유류피해지역에 서식하는 참굴의 체내 유류축적농도는 한달 사이에 급격히 증가하였고 이후 10개월가량 지속적으로 감소하였다고 보고하였다 (MLTM 2008). 이와 같은 유류오염물질의 감소경향은 Kim et al., (2010)의 연구결과와도 일치하였다. 사고해역 주변 해수 및 공극수 내 유류오염물질은 유류유출사고 15일 후 16,600 µg/L까지 증가하였고 이후 감소하였다고 보고하였다.

해산 이매패류의 성장과 회복은 이매패류의 생리상태에 따라 다르게 나타나는 것으로 알려져 있으며 해양 환경의 변화와 오염물질에 영향을 받는다 (Dame et al., 1996; Peteiro et al., 2006). 일반적으로 해산 이매패류 체 조직 성장은 PAHs 오염원에 민감하게 반응하며, 이들 오염원은 패류 성장에 부정적인 영향을

주는 것으로 알려지고 있다 (Soto et al., 2000; Le Floch et al., 2003). Lee (2010)은 *Hebei Spirit* 유류유출사고 한달 후 유류피해지역 양식 참굴의 체 조직 중량이 대조구 참굴에 비해 낮았다. 그러나 유류유출사고 6개월 후에는 대조구 참굴과 비슷한 체 조직 중량을 보였고 9개월 후부터는 대조구 참굴보다 체 조직 중량이 높았다. Peteiro et al., (2006)은 *Prestige* 유류유출사고 4개월 후 유류피해지역 지중해 담치 (*Mytilus galloprovincialis*)의 체 조직 중량은 대조구 담치에 비해 유의적으로 낮어진 것으로 보고하였으나 유류유출사고 15개월 후 유류피해지역 담치는 대조구 담치의 패각 성장 또는 조직 건조량 값과 유의적인 차이를 보이지 않았고 이와 같은 결과는 유류스트레스로부터 회복양상을 보인 결과로 판단된다고 보고한 바 있다 (Peteiro et al., 2008). 그러나 이와 반대결과의 연구도 있다. Culbertson et al., (2008)은 *Florida* 유류유출사고 38년 후 유류피해지역으로 이식한 ribbed mussel의 성장에 관한 연구를 실시하였는데 이식된 ribbed mussel의 성장이 대조구 ribbed mussel에 비해 느리게 나타나 *Florida* 유류유출사고의 영향이 장기간 지속되고 있는 것으로 사료된다고 보고하였다.

이번 연구 조사에서 측정된 두 지역 참굴 조직 건조 중량의 계절적 변동은 서로 유사한 패턴을 보였다 (Fig. 5). 유류피해지역 참굴과 대조구 참굴은 봄부터

여름철까지 조직 건 중량이 증가하였고 같은 시기의 생식소 발달은 완숙기, 비만도 역시 같은 시기에 증가하였다. 두 지역 참굴의 산란과 관련하여 조직 건 중량은 7월부터 8월까지 감소하였다. 9월 이후 대부분의 참굴은 소모기/재흡수기 및 초기발달단계로 진행되면서 조직 건 중량은 다시 증가하였다. 이와 같은 참굴의 조직 건 중량의 계절적 변동은 환경오염의 피해가 없는 자연 환경에서도 일반적으로 관찰된다 (Kang et al., 2000, 2003, 2010; Ngo et al., 2006).

비만도는 해산 이매패류에 있어 주변환경의 상태에 따른 스트레스 및 영양상태를 잘 나타내는 지수로 활용되고 있으며 (Bayne and Worrall, 1980; Lucas and Beninger, 1985; Dame 1996, Modassir and Anssari, 2000) 또한, 성장 및 해양 환경 오염 원 연구에 사용되며 계절적 먹이 수용 능력 또는 성 성숙 주기에 따라 달라지는 것으로 보고 되고 있다 (Lucas and Beninger, 1985; Pridmore et al., 1990, Dame, 1996). 이번 연구에서 측정된 두 지역 참굴의 비만도는 두 지역 참굴 모두 비슷한 계절적 변동을 보였는데, 비만도는 2월부터 6월까지 증가하였고 7월부터 8월까지 감소하였고 이 시기에 산란이 일어 났다 (Fig. 4, Table 4, 5). 산란기 이후 두 지역 참굴은 모두 가을부터 겨울철에 비만도가 증가하였는데 이와 같은 계절적 현상은 조직 건 중량의 계절적 변동과도 일치하였다. Mcdowell et al., (1999)는 PAHs에 오

염된 New Bedford Harbor에 진주 담치 (*Mytilus edulis*)을 이식하여 비만도를 측정하였는데 진주 담치 산란기의 비만도가 유의적으로 다른 집단 진주 담치 보다 낮았고, 산란이 일어남과 동시에 비만도 및 체 조직 내 지질량이 감소하였다고 보고하였다. 그러나 이번 연구결과 2009년 유류피해지역 참굴의 비만도는 대조구 참굴에 비해 유의적 ($P < 0.05$)으로 높았으며 2010년 역시 유류피해지역 참굴의 비만도가 유의적 ($P < 0.05$)으로 높게 측정되었다. Lee (2010)은 2008년에 동일한 유류피해지역의 양식 참굴의 비만도를 측정하였는데, 유류피해지역 참굴의 비만도는 2008년에 비해 2009, 2010년 모두 유의적으로 높게 측정되었다 ($P < 0.05$; Table 7). 이 결과로 미루어 볼 때 유류피해지역 참굴은 시간이 지남에 따라 유의적 ($P < 0.05$)으로 비만도가 증가한 것으로 보아 유류피해지역 참굴이 원유스트레스로부터 생리적인 회복을 보인 것으로 사료된다.

4.2. Biochemical composition variation

참굴의 체 조직은 탄수화물, 지질, 단백질로 구성되어 있으며 이중 탄수화물은 해산 이매패류의 생식 및 번식활동을 하는데 있어 가장 중요한 에너지원으로 알려져 있다. (Gabbot, 1975; Ruiz et al., 1992; Kang et al., 2003; Ngo et al., 2006; Ojea et al., 2004; Yang et al., 2011). 또한, 탄수화물은 해산 이매패류의 배우자 형성에 있어 주된 에너지원으로 사용되며, 성 성숙과 생식소 발달에 관여 하는 것으로 알려져 있다 (Gabbott, 1983; Beninger and Lucas, 1984; Marin, 2003). 또한, 해산 이매패류의 체 조직 성분 변화는 해양환경 오염연구에 좋은 indicator로 널리 활용되고 있다 (Patel and Eapen, 1989; Peteiro et al., 2008). 유류오염 물질과 같은 오염원에 참굴을 노출 시켰을 때 체 조직 구성성분이 전체적으로 감소하는 것으로 알려져 있다 (Stekoll et al., 1980; Smolders et al., 2004; Labarta, et al., 2005; Laffon et al., 2006; Peteiro et al., 2007). Stekoll et al (1980)은 알래스카 Seward 조간대에 서식하는 *Macoma balthica*의 고농도의 유류 오염원에 대한 sub-lethal effects를 확인하기 위하여 실험을 실시 하였는데, 유류 오염원에 대한 반응으로, 총 탄수화물 량 및 단백질 량이 감소하였음을 보고하였다. Peterio et al. (2007)은 *Prestige* 유류유출 사고 4개월 후 지중해 담치 (*Mytilus galloprocincialis*)의 체 조직 성분 변화에 관한 연구를 실시하였다. 연구 기간 동안 지중해 담치 내 단백질 량은 주된 체 조직 구성

성분으로 대조구 해역의 지중해 담치 보다 유류에 노출된 해역의 지질 함량이 유의적으로 낮게 측정 되었다고 보고 하였다. 이번 연구 결과 유류피해지역 참굴의 2009년 연 평균 탄수화물 량은 대조구 참굴에 비해 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$; Fig. 5, Table 4). 그러나 2010년에는 대조구 참굴이 유류피해지역 참굴보다 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$; Fig. 5, Table 4). Lee (2010)이 보고한 2008년 평균 유류피해지역 참굴의 체조직 내 총 탄수화물 량은 $17.9 \pm 0.3\%$ 였다. 이번 연구결과 측정된 2009년 ($18.7 \pm 0.4\%$), 2010년 ($16.8 \pm 0.4\%$) 평균 총 탄수화물 량은 2008년 측정치보다 유의적 ($P < 0.05$)으로 높았다 (Table 7). 이와 같은 결과는 총 단백질 량에서도 일치하였는데, Lee (2010)가 보고한 유류피해지역 참굴의 2008년 평균 총 단백질 량은 $32.6 \pm 0.2\%$ 였다. 유류피해지역 참굴의 2009년 ($34.8 \pm 0.2\%$)과 2010년 ($34.2 \pm 0.2\%$) 총 단백질 량은 2008년 ($32.6 \pm 0.2\%$)에 비해 유의적 ($P < 0.05$)으로 높았다 (Table 7). *Prestige* 유류 유출 사고 15개월 후 Peteiro et al. (2008)는 유류유출 해역의 지중해 담치와 대조구 해역 지중해 담치의 체 조직 성분 함량은 차이를 보이지 않았고 이와 같은 결과는 유류 스트레스로부터 회복된 결과일 것이라고 보고하였다. 위 결과로 미루어 보았을 때, 유류피해지역 참굴의 체 조직 성분에 대한 원유스트레스는 유류유출사고 1년 후부터 회복양상을 보인 것으로 사료된다.

4.3. Gametogenesis and reproductive effort variation

일반적으로 유류오염물질은 연중 생식소 발달에 부정적인 영향을 주며 산란 활동을 저지하는 것으로 알려져 있다 (Bayny et al., 1982). Chu et al., (2003)은 PCB (Polychlorinated biphenyl)이 혼합된 먹이생물을 대서양 굴에게 공급하였을 때 대조구 그룹에 비해 생식소 완숙기 도달이 늦어지고 번식량이 감소한다고 보고하였다. 또한, *Hebei Spirit* 유류유출사고의 영향으로 참굴에서도 마찬가지로 생식소 발달이 저하되고 번식량이 대조구 참굴에 비해 낮게 나타났다 (Lee 2010). Lee (2010)은 유류피해지역 참굴의 성 성숙은 6월에 관찰되었고 산란은 대부분 9월-10월 연중 2회 산란 패턴이 관찰된 반면, 대조구 참굴의 산란은 6월 말부터 8월에 연중 1회 산란이 관찰되었다. 또한, 대조구 참굴 생식소 지수는 산란시기 이후 급격히 감소한 반면 유류피해지역 참굴은 완만하게 감소하였다. 그러나 *Hebei Spirit* 유류유출사고 2년 후 유류피해지역 참굴의 생식소 발달단계 변동은 대조구 참굴과 동일 관찰되었고 산란 활동도 동일한 시기에 관찰되었고, 생식소 지수와 egg mass도 산란시기 이후 동일하게 감소하였다 (Mondal et al., 2015). 조직학적 방법을 이용해 두 지역간 생식소 발달 단계를 관찰한 결과 유류유출 사고 1년 후에는 대조구 참굴에 비해 생식소 발달이 한달 가량 더디게 관찰되었으나 유류유출사고 2년 후에는 두 지역 참굴 모두 유사한 생식소 발달 양상을 보였고 산란시기 역시

동일한 시기에 관찰되었다 (Fig 6). 또한, 두 지역 참굴의 2009년 생식소 지수와 egg mass결과 유류피해지역 참굴의 증가양상이 대조구 참굴에 비해 한달 가량 차이가 있었으나 2010년에는 두 지역 참굴 모두 완숙기인 7월까지 급격히 증가하였고 산란기 이후 생식소 지수는 8월까지 급격히 감소하였다. 이매패류의 성 성숙 능력 및 변화에 관한 연구 수행 시 조직학적 관찰방법과 ELISA 방법을 동시에 사용하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

PCB나 PAHs와 같은 화학물질은 해산이매패류의 번식에 부정적 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다. PCB는 참굴의 번식활동에 부정적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Wade et al., 1992; Chu et al., 2003). McDowell et al., (1999)는 PCB와 PAHs 추출물을 진주 담치에 노출 시킨 결과 유의적으로 대조구 담치에 비해 번식량이 감소하였다고 보고 하였다. 또한, 유류오염물질은 참굴의 번식량에 부정적인 영향을 주는 것을 *Hebei spirit* 유류유류출사고 에서 확인할 수 있었다 (Lee 2010). Lee (2010)은 ELISA 방법을 사용하여 유류피해지역 참굴의 생식소 지수를 2008년에 측정하였는데, 대조구 참굴의 최대 생식소 지수는 45.7%로 유류피해지역 참굴은 29.9%였다. ELISA 방법을 사용하여 조직학적 관찰로 완숙기 단계에 있는 암컷을 선별하여 생식소 지수와 번식량을 측정한 결과 두 지역 간 2009-2010

년 참굴의 생식소 지수는 연구기간 동안 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 7, Table 6). 그러나 유류피해지역 참굴의 경우 2009년 (27.7%)에 비해 2010년 (34.7%) 생식소 지수 평균 유의적 ($P < 0.05$)으로 높았다 (Table 4). 그리고 3년간 유류피해지역 참굴의 생식소 지수를 모니터링 한 결과 생식소 지수는 *Hebei Spirit* 유류유출 사고 직후인 2008년 (24.7%)과 2009년 (27.7%)까지는 유의적인 차이가 없었으나 2010년 (34.7%)에는 유의적으로 증가하였고 대조구 참굴의 생식소 지수와도 유의적인 차이가 없었다 ($P < 0.05$; Table 7). 위 결과를 종합해 볼 때 유류피해지역 참굴은 *Hebei Spirit* 유류유출사고 2년 후부터 번식생리학적 측면에서 고찰할 때, 사고 이전의 상태로 회복하고 있는 것으로 사료된다. 또한 2008년부터 2010년까지 두 지역 참굴의 생식소 지수를 표준화하여 암컷 완숙기 참굴 내 존재하는 알의 무게 (egg mass)로 환산한 결과 2008년 egg mass는 2009-2010년에 비해 유의적으로 낮았고 ($P < 0.05$) 2009년과 2010년에는 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 7). 이와 같이 유류피해지역 참굴의 번식량이 시간이 지남에 따라 증가하고는 경향은 생리적으로 회복양상을 보이고 있는 것으로 사료된다. 또한 *Hebei Spirit* 유류유출사고 이후 유류피해지역 주변 해양환경이 과 먹이가용능력이 좋아져 생긴 결과로 판단된다. 유류피해지역 내 먹이가용능력이 좋아졌다고 사료되는

것은 유류피해지역 참굴의 증가된 조직 건 중량, 비만도, 총 탄수화물 양으로 확인할 수 있었고 결과적으로 충분히 섭이한 에너지원은 생식소 지수와, egg mass 값 증가하여 유류피해지역 참굴이 원유스트레스로부터 회복양상을 보이는 것으로 사료된다.

Table 7. One-way ANOVA test for the impacts for *Hebei spirit* oil spill for 3 years (2008 to 2010) on the CI, standardized tissue dry weight, percentage of the total protein and carbohydrate, percentage of GSI (Ripe stage of Female), standardized egg mass (Ripe stage of Female). The values are mean \pm 95% confidence interval.

	2008	2009	2010	F-ratio	P-value
	LEE (2010)	Present study			
Condition index	9.3 \pm 0.1 ^a	10.8 \pm 0.1 ^b	10.5 \pm 0.2 ^b	27.030	<i>P</i> <0.05
Tissue dry weight (mg standard animal ⁻¹)	823.2 \pm 78.6 ^a	1592.2 \pm 43.5 ^b	1580.2 \pm 119.7 ^b	28.954	<i>P</i> <0.05
Protein (%)	32.6 \pm 0.2 ^a	34.8 \pm 0.2 ^b	34.4 \pm 0.2 ^b	33.153	<i>P</i> <0.05
Carbohydrate (%)	17.9 \pm 0.3 ^{ab}	18.6 \pm 0.4 ^{ab}	16.8 \pm 0.4 ^a	4.341	<i>P</i> <0.05
Egg mass (mg standard animal ⁻¹)	218.7 \pm 15.2 ^a	460.9 \pm 92.0 ^b	540.4 \pm 120.3 ^b	6.594	<i>P</i> <0.05
GSI (%)	24.7 \pm 0.9 ^a	27.7 \pm 1.9 ^a	34.7 \pm 3.2 ^b	7.851	<i>P</i> <0.05

Reference

- Auffret, M., Duchemin, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., Marhic, A. 2004. Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the “Erika” oil spill. *Aquatic Living Resources* 17, 297-302.
- Bayne, B. L., Worrall, C. M. (1980). Growth and production of mussels *Mytilus edulis* from two populations. *Marine Ecology Progress Series*. 3: 317-328.
- Bayne, B.L., Widdows, J., Moore, M.N., Salkeld, P., Worrall, C.M., Donkin, P. 1982. Some ecological consequences of the physiological and biochemical effects of petroleum compounds on marine molluscs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 297, 219-238.
- Beninger, P.G., Lucas, A., 1984. Seasonal variation in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitats: *Tapes decussatus* L. (Jeffrey), and *Tapes philippinarum* (Adame & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 79, 19-37.
- Bocquene, G., Chantereau, S., Clerendeau, C., Beausir, E., Menard, D., Raffin, B., Minier, C., Burgeot, T., Leszkowicz, A.P. 2004. Biological effects of the “Erika” oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources* 17, 309-316.
- Cajaraville, M.P., Garmendia, L., Orbea, A., Werding, R., Gomez-Mendikute, A., Izagirre, U., Doto, M., Marigomez, I. 2006. Sign of recovery of the mussels health two years after the Prestige oil spill. *Marine Environmental Research* 62, 337-341.
- Carls, M.G., Babcock, M.M., Harris, P.M., Irvine, G.V., Cusick, J.A., Rice, S.D. 2001. Persistence of oiling in mussel beds after the *Exxon Valdez* oil spill. *Marine Environmental Research* 51, 167-190.
- Chu, F.E., Soudant, P., Hale, R.C., 2003. Relationship between PCB accumulation and

- reproductive output in conditioned oysters *Crassostrea virginica* fed a contaminated algal diet. *Aquatic Toxicology* 65, 293-307.
- Chiffolleau, J.F., Chauvaud, L., Amouroux, D., Barats, A., Dufour, A., Prcheyrans, C., Roux, N. Nickel and vanadium contamination of benthic invertebrates following the "Erika" wreck. *Aquatic Living Resources* 17, 273-280.
- Culbertson, J.B., Valiela, I., Olsen, Y.S., Reddy, C.M. 2008. Effect of field exposure to 38-year-old residual petroleum hydrocarbons on growth, condition index, and filtration rate of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. *Environmental Pollution* 154, 312-319.
- Dame, R.F., 1996. Bivalves as components of ecosystem health. In the ecology of marine bivalves. An ecosystem approach, pp. 213–226. Ed. by R. F. Dame. CRC Marine Science Series, CRC Press, Boca Raton, FA. 254 pp.
- Donaghy, D., Hong, H.K., Lee, H.J., Jun, J.C., Park, Y.J., Choi, K.S., 2010. Hemocyte parameters of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, a year after the *Hebei Spirit* oil spill off the west coast of Korea. *Helgoland Marine Research* 64, 349-355.
- Dyrynda, E.A., Law, R.J., Dyrynda, P.E.J., Kelly, C.A., Pipe, R.K., Graham, K.L., Ratcliffe, N.A. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 77, 281-284.
- Dyrynda, E.A., Law, R.J., Dyrynda, P.E.J., Kelly, C.A., Pipe, R.K., Ratcliffe, N.A. 2000. Changes in immune parameters of natural mussel *Mytilus edulis* populations following a major oil spill ('Dea Empress', Wales, UK). *Marine Ecology Progress Series* 206, 155-170.
- Gabbott, P.A., 1975. Storage cycle in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between the glycogen metabolism and gametogenesis. In: Barnes, A. (ed.), proceeding of the 9th European Marine Biology Symposium. Aberdeen University press,

pp. 191-211.

Gabbott, P.A., 1983. Development and seasonal metabolic activities in marine mollusks. In: Saleuddin ASM, Wilbur KM, editors. The Mollusca. Vol. 2. New York: Academic Press; pp 165-217.

Choi, K.S. 2008. Oyster capture-based aquaculture in the Republic of Korea. In: Lovatelli, A., Holthus, P.F. Ieds.). Capture-Based Aquaculture: Global overview 508. FAO, Rome, pp. 271-286, FAO Fisheries Technical Paper. No. 508.

Fry, B. and Anderson, L.C. 2013. Minimal incorporation of Deepwater Horizon oil by estuarine filter feeders. Marine Pollution Bulletin 80, 282-287.

Hong, H.K., Donaghy, L., Kang, C.K., Kang, H.S., Lee, H.J., Park, H.S., Choi K.S. 2016. Substantial changes in hemocyte parameters of Manila clam *Ruditapes philippinarum* two years after the *Hebei spirit* oil spill off the west coast Korea. Marine Pollution Bulletin 108, 171-179.

Hong, S., Khim, J.S., Ryu, J., Kang, S.G., Shim, W.J. 2014. Environmental and ecological effects and recoveries after five years of the *Hebei spirit* oil spill, Taean, Korea. Ocean & Coastal Management 102, 522-532.

International Tanker Owner Pollution Federation Ltd. (ITOPF), 2008. The environmental impact of Hebei Spirit oil spill, Taean, South Korea.<[http:// www.itopf.com/news-and-events/documents/HEBEISPIRIT-EnvironmentalImpact. pdf](http://www.itopf.com/news-and-events/documents/HEBEISPIRIT-EnvironmentalImpact.pdf) >(07.12.07).

Jung, Y.H., Park, H.S., Yoon, K.T., Lee, H.G., Ma, C.W. 2013. Structure change of macrobenthic community on rock shores after the *Hebei spirit* oil spill. Ocean and Polar Research, 35(3), 219-228.

Jung, J.H., Kim, M, Yim, U.H., Ha, S.Y., An, J.G., Won, H.W., Han, G.M., Kim, N.S., Addison, R.F., Shim, W.J. 2011. Biomarker responses in pelagic and benthic fish over 1

- year following the *Hebei spirit* oil spill (Taeon, Korea). *Marine Pollution Bulletin* 62, 1859-1866.
- Kang, C.K., Park, M.S., Lee, P.Y., Choi, W.J., Lee, W.C., 2000. Seasonal variation in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in two coastal bays in Korea. *Journal of Shellfish Research* 19, 771-778.
- Kang, S.G., Choi K.S., Bulgacov, A.A., Kim, Y., Kim, S.Y., 2003. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 282, 1-21.
- Kang, D.H. Fu-Lin E.C., Yang, H.S., Lee, C.H., Koh, H.B., Choi, K.S., 2010. Growth, reproductive condition, and digestive tubule atrophy of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Gamakman bay off the southern coast of Korea. *Journal of Shellfish Research* 29(4), 839-845.
- KCG (Korea Coast Guard). 2008. Korea coast guard 2008 white paper.
- Kim, M., Yim, U.H., Hong, S.H., Jung, J.H., Choi, H.W., An, J., Won, J., Shim W.J., (2010). *Hebei Spirit* oil spill monitored on site by fluorometric detection of residual oil in coastal waters off Taeon, Korea. *Marine Pollution Bulletin* 60, 383-389.
- Kim, M., Yim, U.H., Hong, S.H., Jung, J.H., Choi, H.W., An, J., Shim, W.J. 2009. *Hebei spirit* oil spill monitored on site by fluorometric detection of residual oil in coastal waters off Taeon, Korea. *Marine Pollution Bulletin* 60, 383-389.
- Kim, M., Hong, S.H., Won, J., Yim, U.H., Jung, J.H., Ha, S.Y., An, J.G., Joo, C., Kim, E., Han, G.M., Baek S., Choi, H.W., Shim, W.J. 2013. Petroleum hydrocarbon contaminations in the intertidal seawater after the *Hebei spirit* oil spill – Effect of tidal

- cycle on the TPH concentrations and the chromatographic characterization of seawater extracts. *Water Research* 47, 758-768.
- KOSIS. (2015) Statistic Database for Reclamation Extent. Retrieved from <http://kosis.kr/wnsearch/totalSearch.jsp>
- Labarta, U., Ferná'ndez-Reiriz, M. J., Garrido, J. L., Babarro, J. M. F., Bayona, J. M., Albaige's, J., 2005. Response of mussel recruits to hydrocarbon pollution from the Prestige oil spill along the Galicia coast. A biochemical approach. *Marine Ecology Progress Series* 302, 135–145.
- Laffon, B., Ra'bade, T., Pa'saro, E., Me'ndez, J., 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environment International* 32, 342–348.
- Law, R.J., Kelly, C.A., Nicholson, M.D. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in shellfish affected by the *SEA Empress* oil spill in Wales in 1996. *Polycyclic Aromatic Compounds* 17, 229-239.
- Lee, C.I., Kim, M.C., Kim, H.C. 2009. Temporal variation of chlorophyll a concentration in the coastal waters affected by the *Hebei spirit* oil spill in the West sea of Korea. *Marine Pollution Bulletin* 58, 496-502.
- Lee, C.H., Lee, J.H., Sung, C.G., Moon, S.D., Kang, S.K., Lee, J.H., Yim, U.H., Shim, W.J., Ha, S.Y. 2013. Monitoring toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in intertidal sediments for five years after the *Hebei spirit* oil spill in Taean, Republic of Korea. *Marine Pollution Bulletin* 76, 241-249.
- Lee, H.J., 2010. Impacts 2007 *Hebei Spirit* oil spill on reproductive physiology of Pacific

- oyster, (*Crassostrea gigas* Thunberg, 1793) in Taean, off the west coast of Korea. Masters Science Thesis, Jeju National University, Korea. pp. 40.
- Lee, H.J., Shim, W.J., Lee, J., Kim, G.B. 2011. Temporal and geographical trends in the genotoxic effects of marine sediments after accidental oil spill on the blood cells of striped beakperch (*Oplegnathus fasciatus*). *Marine Pollution Bulletin* 62, 2264-2268.
- Lee, H.M and Yoon, K.T. 2014. Comparison of recruitment and growth patterns of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) between a natural rocky shore and farming substrate within an oil spill contaminated area of Korea. *Ocean and Polar Research* 36(2), 145-156.
- Lemiere, S., Cossu-Leguille, C., Bispo, A., Jourdain, M.J., Lanhers, M.C., Burnel, D., Vasseur, P. *Mutation Research* 581, 11-21.
- Le Floch, S., Guyomarch, J., Merlin, F., Borseth, J.F., Lee Corre, P., Lee, K. 2003. Effects of oil and bioremediation on mussel (*Mytilus edulis* L.) *Environmental Technology* 24(7), 175-187.
- Lucas, A., Beninger, P.E., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve. *Aquaculture* 44, 187-200.
- Marin, M.G., Moschino, V., Deppieri, M., Lucchetta, L., 2003. Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *T. philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture* 219, 859-871.
- McDowell, J.E., Lancaster, B.A., Leavitt, D.F., Rantamaki, P., Ripley, B., 1999. The effects of lipophilic organic contaminants on reproductive physiology and disease process in marine bivalve molluscs. *Limnology and Oceanography* 44, 903-909.
- Ministry of Land, Transport and Maritime Affairs, Republic of Korea (MLTM), 2008. Environmental impact assessment of the *Hebei Spirit* oil spill. MLTM reports number 11-1611000-000392-01 (in Korean with English summary).

- Ministry of Land, Transport and Maritime Affairs, Republic of Korea (MLTM), 2009. Environmental impact assessment of the *Hebei Spirit* oil spill. MLTM reports number 11-1611000-001143-01 (in Korean with English summary).
- Ministry of Land, Transport and Maritime Affairs, Republic of Korea (MLTM), 2010. Environmental impact assessment of the *Hebei Spirit* oil spill. MLTM reports number 11-1611000-001643-01 (in Korean with English summary).
- Modassir, Y., and Ansari, A. 2000. Effect of petroleum hydrocarbon on physiological and biochemical parameters in an estuarine clam (*Paphia malabarica*). *Fishery Technology*, 37: 40-45
- Mondal, M.R., Keshavmurthy, S., Lee, H.J., Hong, H.K., Park, H.S., Park, S.R., Kang, C.K., Choi, K.S. 2015. Recovery of wild Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in terms of reproduction and gametogenesis two-years after the *Hebei spirit* oil spill accident off the west coast of Korea. *Continental Shelf Research* 111, 333-341.
- National Fisheries Research and Development and Institute (NFRDI). 2012. Standard manual of Pacific oyster hanging culture. NFRDI Publication Number Ed-2012-AQ-001, pp 205 (in Korean with English summary, Table and Figures)
- Ngo, T.T.T., Kang, S.G., Kang D.H., Sorgeloos, P., Choi, K.S., 2006. Effect of culture depth on the proximate composition and reproduction of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* from Gosung Bay, Korea. *Aquaculture* 253, 712-720.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martinez, D., Novoa, S., Sanchez, J.L., Abad, M., 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of tissues of *Ruditapes philippinarum* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 241, 45-468.
- Ordas, M. C., Albaiges, J., Bayona, J.M., Ordas, A. Figueras, A., 2007. Assessment of in vivo effects of the prestige fuel oil spill on the Mediterranean mussel immune system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 200-206.

- Park, K.I., Figueras, A., Choi, K.S., 2006. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. *Aquaculture* 251, 182-191.
- Park and Choi. 2004. Application of enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) I. quantifying eggs. *Aquaculture* 241, 667-687.
- Patel, B., Eapen, J.T., 1989. Biochemical evaluation of naphthalene intoxication in the tropical acrid blood clam *Anadara granosa*. *Marine Biology* 103, 203–209.
- Peteiro, L.G, Babarro, J.M.F., Labarta, U., Ferná'ndez-Reiriz, M.J., 2006. Growth of *Mytilus galloprovincialis* after the *Prestige* oil spill. *ICES Journal of Marine Science* 63, 1005–1013.
- Peteiro, L.G., Labarta, U., Ferná'ndez-Reiriz, M.J., 2007. Variability in biochemical components of the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) cultured after *Prestige* oil spill. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 145, 588–594.
- Peteiro, L.G., Filgueira, R., Labarta, U., Ferná'ndez-Reiriz, M.J., 2008. Growth and biochemical responses of the offspring of mussels directly affected by the *Prestige* oil spill. *ICES Journal of Marine Science* 65, 509-513.
- Pridmore, R.D., Roper, D.S., Hewitt, J.E. 1990. Variation in composition and condition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, along a pollution gradient in Manukau Harbour, New Zealand. *Marine Environmental Research* 30, 163-177.
- Roberts, P.O., Henry, C.B., Shigenaka, G., Fukuyama, A. 1999. Weathered petroleum “Bioavailability” to intertidal bivalves species after the *T/V Exxon Valdez* incident 1999

(1) 1003-1005.

- Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., Garcia-Martin, L.O., Sanchez Lopez, J.L., 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 155, 249– 262.
- Salazar, M.H. and Salazar, S.M. 1991. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Marine Environmental Research* 32, 131-150.
- Shigenaka, G., Coats, D.A., Fukuyama, A.K., Roberts, P.O. 1999. Effects and trends in Littleneck clams (*Protothaca staminea*) impacted by the *Exxon Valdez* oil spill 1999 (1) 349-356.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution* 129, 99–112.
- Soniat, T.M., King, S.M., Tarr, M.A., Thorne, M.A., 2011. Chemical and physiological measure of oysters (*Crassostrea gigas*) from oil exposed sites in Louisiana. *Journal of Shellfish Research* 30, 713-717.
- Soto, M., Ireland, M.P., Marigomez, I. 2000. Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in "Mussel Watch" Programmes. *Science of the Total Environment* 247, 175-187.
- Stekoll, M.S., Clement, L.E., Shaw, D.G., 1980. Sublethal effects of chronic oil exposure on the intertidal clam, *Macoma balthica*. *Marine Biology* 57, 51-60.
- Taylor, K.A.C.C., 1994. A modification of the phenol/sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbance. *Applied Biochemistry and*

Biotechnology 53, 207-214.

- Thomas, R.E., Brodersen, C.B., Carls, M.G., Babcock, M., Rice, S.D. 1999. Lack of physiological responses to hydrocarbon accumulation by *Mytilus trossulus* after 3-4 years chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William Sound. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 122, 153-163.
- Thomas, J.C., Wafula, D., Chauhan, A., Green, S.J., Gragg, R., Jagoe, C. 2014. A survey of deepwater horizon (DWH) oil-degrading bacteria from the Eastern oyster biome and its surrounding environment. *Frontiers in Microbiology* 5, 149.
- Vignier, J., Donaghy, L., Soudant, P., Chu, F.L.E., Morris, J.M., Carney, M.W., Lay, C., Krasnec, M., Robert, R., Volety, A.K. Impacts of *Deepwater Horizon* oil and associated dispersant on early development of the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Pollution Bulletin* 100 (1), 426-437.
- Wade, T.L., Powel, E.N., Jakson, T.J., Brooks, J.M., 1992. Processes controlling temporal trends in Gulf Mexico oyster health and contaminant concentrations. In: *Global Ocean Partnership Proceedings*. Washington, DC, MTS. *Marine Technology Society* 92, 223–229.
- Xia, K., Hagood, G., Childers, C., Atkins, J., Rogers, B., Ware, L., Armbrust, K., Jewell, J., Diaz, D., Gatian, N., Folmer, H. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Mississippi seafood from areas affected by the Deepwater Horizon oil spill. *Environmental Science & Technology* 46, 5310-5318.
- Yang, H.S., 2011. Annual variation of reproductive effort, biochemical composition and *Perkinsus olseni* infection in Manila clam, *Ruditapes Philippinarum*, off the west coast of Korea. Ph. D. Thesis, Jeju National University, Korea. pp. 157.
- Yim, U.H., Kim, M., Ha, S.Y., Kim, S.H., Shim, W.J., 2012. Oil spill environmental

forensics: the *Hebei Spirit* oil spill case. *Environmental Science and Technology* 46, 6431-6437.

Acknowledgements

2008년 대학원에 진학 하겠다고 무턱대고 실험실에 들어 온지도 8년이 되었습니다. 8년이라는 시간 동안 저는 대학원생에서 박사과정연구원, 박사수료생, 조교, 남편, 두 아이의 아빠로 변해 왔습니다. 그 동안 수없이 찾아온 좌절과 시련을 벗 삼아 지금까지 달려 올 수 있었습니다. ‘노력은 배신하지 않는다’는 최고 수님의 말씀을 믿고 후회 없이 도전한 시간이었습니다. 저 혼자 능력으로는 절대 이 자리에 설 수 없었음을 고백하며 이 연구논문을 통해 감사인사를 드리고자 합니다.

공부, 연구라는 것이 무엇인지도 모르는 학부 4학년 이었던 저를 아무 의심하지 않으시고 받아주신 최광식 교수님. ‘Hello’밖에 할 줄 몰랐던 저에게 대학원생으로서 첫 학회발표를 ‘2008 World aquaculture’에 구두 발표를 시키신 교수님을 발표 전날까지 원망했었음을 고백합니다. 수첩에 한글로 영어를 적어 읽다시피 한 저에게 ‘수고했고, 잘했다’라고 이야기 해주신 교수님! 그 계기를 통해 지금의 해양수산연구사 이희중이 되었습니다. 스스로 답을 찾을 수 있도록 지도해주시고, 보고서를 쓰게 하시고, 논문 집필, 도서집필, 포스터제작, 해양생태해설사 과정 운영, 실험실 회계 운영, 조교 등 수업이 많은 기회를 물심양면으로 지도해주셔서 감사합니다. 또한 심사위원장을 흔쾌히 허락해주신 광주과학기술원의 강

창근 교수님, 실험실 선배로서 항상 격려해 주시고 응원해 주신 한국해양과학기술원의 강도형 박사님, 그리고 제주대학교 정석근 교수님과 박상을 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 학부, 석사, 박사과정 동안 함께 한 건물을 사용하면 서 응원해 주셨던 이경준, 김기영, 송춘복, 전유진, 이제희, 여인규, 허문수, 정준범 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

8년이라는 시간 동안 함께 지내며 가족 보다 더 많은 시간을 함께 보낸 무척추동물양식실험실 동료에게도 깊은 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 여러분들이 있었기에 지금의 제가 있을 수 있었고 함께 울고 웃고 싸우고 화해하고 지낸 시간이 그립습니다. 이 힘든 석·박사 과정 동안 여러분이 없었다면 견디기 힘들었을 겁니다. 먼저 사전에 감사인사를 드렸던 한국해양과학기술원의 강도형 박사님, 군산대학교 박경일 교수님, 캠프, 자심, 타오, 모스타피쥬, 루도빅, 이지연, 임나래, 양현성 박사님, 강현실 박사님, 흥현기 박사님, 정희도, 박아름이, 레탄크영, 이혜미, 조영관, 김영민 및 먼저 하늘나라에 가있는 나의 영원한 선배 김봉규 박사님에게도 깊은 감사의 인사를 드립니다.

서른살이 넘어서도 학교에서 공부를 하고 있는 큰아들을 끝까지 믿고 응원해주시고 격려해주신 아버지와 어머니께 박사학위를 보답 드릴 수 있어 감사함

니다. 또한, 아무것도 이룬 것 없는 저를 아무런 이유와 조건 없이 결혼을 승낙해 주신 장모님과 장인어른께도 그 동안 학위 준비한다고 가정에 충실히 하지 못한 저를 대신해 다니시던 직장도 그만두시고 뒷바라지 해주신 그 은혜 감사를 드립니다. 마지막으로 가장 힘들게 옆에서 묵묵히 가정을 지켜주고 건이와 산이를 키워준 가장 마음 고생 많았을 제 아내 김주희양과의 약속을 지킬 수 있었습니다. 고맙습니다. 사랑합니다.

마지막으로 이제 사회에 첫발을 내디뎠습니다. 항상 쓴 소리와 따끔한 충고 뜨끔한 조언 부탁 드립니다.