

해수-공기 사이의 평형을 이용한 해양동물  
호흡률의 고감도 측정 기술 개발

Measuring highly sensitive respiration rate of marine  
animals using gas equilibrium principal between air and  
sea water

한국해양과학기술원

해수-공기 사이의 평형을 이용한 해양동물  
호흡률의 고감도 측정 기술 개발

Measuring highly sensitive respiration rate of marine  
animals using gas equilibrium principal between air and  
sea water

2016. 11. 30

한국해양과학기술원

# 제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “해수-공기 사이의 평형을 이용한 해양동물 호흡률의 고감도 측정 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016년 11월

연구책임자 :	김 성	생태기반연구센터
참여연구원 :	최해영	생태기반연구센터
	조홍연	해양자료실
	오지나	생태기반연구센터
	이기섭	해양자료실

## 보고서 요약서

과제고유번호	PE99366	해당단계 연구기간	2015.08.01.~ 2016.07.31	단계구분	1단계	
연구사업명	중사업명	이사부 창의과제(창의사업)				
	세부사업명					
연구과제명	대과제명	해수-공기 사이의 평형을 이용한 해양동물 호흡률의 고감도 측정 기술 개발				
	세부과제명					
연구책임자	김 성	해당단계 참여 연구원수	총 : 5명 내부: 2명 외부: 3명	해당단계 연구비	정부 : 66백만 원 기업 : 0백만 원 계 : 66백만 원	
		총연구기간 참여 연구원수	총 : 5명 내부: 2명 외부: 3명		총연구비	정부 : 66백만 원 기업 : 0백만 원 계 : 66백만 원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원		참여기업명			
요약				보고서면수	34	
<p>조간대 해양동물의 수중과 대기 호흡률을 용존산소 지표로는 연속 측정이 어렵다. 이를 극복하기 위해 해수-공기의 기체 평형 원리를 적용한 반폐쇄 호흡률 측정 장비를 개발하였다. 이 장비를 이용하여 조간대 해양동물인 수동방게의 호흡률을 측정하였다. 수중 환경에서 실험동물의 호흡으로 인한 용존산소 및 head space의 이산화탄소와 산소 분압의 변량에 대한 상호 2차 다항회귀모형의 결정계수(<math>r^2</math>)는 <math>0.9961 \pm 0.0029</math> (<math>p &lt; 0.001</math>)였다. 이 때 용존산소와 이산화탄소 분압의 측정 변량은 측정기의 유효숫자를 기준으로 후자가 전자 보다 <math>216 \pm 110</math> 배 높았다. 수중과 대기의 두 조건에서 모두 측정된 이산화탄소 분압을 호흡률 지표로 보면 이들의 평균 호흡률은 각각 <math>102.4 \pm 32.7 \text{ CO}_2 \text{ } \mu\text{mol/h/g}</math>과 <math>4.1 \pm 0.2 \text{ CO}_2 \text{ } \mu\text{mol/h/g}</math>으로, 대기 환경의 호흡률이 수중의 약 25배였다. 이 실험을 통해 해수-공기의 기체 평형상태에서 측정된 이산화탄소 분압으로 조간대 해양동물의 수중과 대기의 호흡률 측정이 가능하고, 이 지표의 해상도는 용존산소 보다 매우 높았다.</p>						
색인어	한글	호흡률, 이산화탄소분압, 용존산소, 조간대 해양동물				
	영어	Respiration, pCO <sub>2</sub> , dissolved oxygen, intertidal animal				

# 요 약 문

## I 제목

- 해수-공기 사이의 평형을 이용한 해양동물 호흡률의 고감도 측정 기술 개발

## II 연구개발의 필요성 및 목적

- 수중과 대기에서 호흡하는 조간대 해양동물용 반폐쇄형 호흡률 측정 기술 개발

## III 연구개발의 내용 및 범위

- 해수-공기의 기체 평형 원리를 응용한 조간대 해양동물용 반폐쇄형 호흡률 측정 장치 개발
- 이산화탄소 지표를 이용한 조간대 해양동물의 수중과 대기의 호흡률 측정

## IV 연구개발 결과

### 1 해수-공기의 기체 평형 원리를 응용한 조간대 해양동물의 수중과 대기 호흡률 측정 장치 개발

- 수중 환경에서 수동방계 호흡에 의한 실험용기의 용존산소 및 head space의 산소와 이산화탄소 분압의 변량에 대한 상호 2차 다항회귀모형의 결정계수( $r^2$ )는  $0.9961 \pm 0.0029$  ( $p < 0.001$ )
- 이 때 용존산소와 이산화탄소 분압의 측정 변량은 측정기의 유효숫자를 기준으로 후자가 전자 보다  $216 \pm 110$ 배 높음

### 2 조간대 해양동물인 수동방계의 대기와 수중 환경 호흡률 측정

- 수동방계의 수중과 대기의 평균 호흡률은 각각  $102.4 \pm 32.7$  CO<sub>2</sub> umol/h/g과  $4.1 \pm 0.2$  CO<sub>2</sub> umol/h/g로 대기의 호흡률이 수중의 약 25배

### 3 결론

- 해수-공기의 기체 평형상태의 이산화탄소 분압으로 조간대 해양동물의 수중과 대기의 호흡률 측정 가능
- 해양동물의 호흡률 측정 해상도는 용존산소보다 이산화탄소 분압 지표가 매우 높음

### **V 연구개발 결과의 활용 계획**

- 양측 호흡을 하는 조간대 해양동물의 대기와 수중 환경의 호흡생리 연구
- 해양생물의 오염 없는 산소와 이산화탄소 측정 방법으로 장기간 수질 모니터링

# Summary

## I Title

Measuring highly sensitive respiration rate of marine animals using gas equilibrium principal between air and sea water

## II Necessities and Objectives of the Study

- Developing open-closed respiration chamber for the intertidal marine animals breathing in aquatic and aerial environment

## III Contents and scopes of the study

- Developing open-closed respiration chamber using gas equilibrium principal between air and sea water
- Measuring respiration rate of intertidal marine animals in aerial and aquatic environment using  $p\text{CO}_2$

## IV Results

### 1 Development of open-closed respiration chamber for intertidal marine animals using gas equilibrium principle between air and sea water

- Coefficient of determination ( $r^2$ ) of quadratic regression model between variations of the dissolved oxygen in the water chamber and the partial pressure of oxygen and carbon dioxide in the head space by respiration of test animals was  $0.9934 \pm 4.2$  ( $p < 0.001$ ).

- Based on the significant figures measured for the test animals breathing in the respiration chamber, the carbon dioxide detector was  $216 \pm 110$  times more sensitive than the dissolved oxygen sensor.

## **2 Measuring respiration rate of the intertidal marine animals in the aerial and aquatic environment**

- The average breathing rate of water and aerial on the test animals based on the carbon dioxide partial pressure was  $102.4 \pm 32.7$  CO<sub>2</sub> umol/h/g and  $4.1 \pm 0.2$  CO<sub>2</sub> umol/h/g, respectively.
- The respiration rate of the test animals in aerial is about 25 times more than that of the water environment.

## **3 Conclusions**

- The partial pressure of carbon dioxide from the head space of respiration chamber could be used as an indicator to measure respiration rate of marine animals in aerial and also water condition such as dissolved oxygen.
- The carbon dioxide detector was very sensitive more than that of the dissolved oxygen sensor for measuring respiration rate of marine animals in the water using the open-closed respiration chamber with the head space.

## **V Application plans of the results of the study**

- The respiration physiology on the intertidal marine animals breathing in aerial and aquatic environment
- Long-term aquaculture water quality monitoring with sensors of oxygen and carbon dioxide without contamination of marine organisms



## <제목 차례>

<b>제 1 장 서론</b> .....	1
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	1
1. 연구의 경제·사회·기술적 필요성 .....	1
제 2 절 연구개발 목표 및 내용 .....	2
1. 연구개발의 목표 .....	2
2. 연구 추진계획 및 수행 방법 .....	2
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b> .....	3
제 1 절 국내 연구동향 .....	3
제 2 절 국외 연구동향 .....	7
제 3 절 현재까지의 연구개발 현황 .....	10
<b>제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과</b> .....	11
제 1 절 연구 수행 내용 및 방법 .....	11
제 2 절 해수-공기의 기체 평형을 이용한 조간대 해양동물 호흡률의 고감도 측정 기술 개발 .....	14
1. 실험동물의 호흡률 지표 측정 .....	14
2. 실험동물의 수중과 대기환경의 호흡률 비교 .....	17
3. 연구개발 수행 결론 .....	18
<b>제 4 장 목표 달성도</b> .....	19
제 1 절 목표 달성도 .....	19
1. 본 연구기간 내 연구내용 대비 달성율(%) .....	19
<b>제 5 장 연구개발 결과의 활용방안 및 기대효과</b> .....	20
제 1 절 활용방안 .....	20
제 2 절 기대효과 .....	20
<b>&lt;참고문헌&gt;</b> .....	21

## <표 차례>

표 1 수동방계가 호흡하는 동안 실험용기의 용존산소와 head space의 이산화탄소 분압에 대한 선형회귀모형의 기울기 비교 .....	16
표 2 수중과 대기 환경에서 수동방계의 호흡으로 증가한 이산화탄소 분압 .....	18

## <그림 차례>

그림 1 용존산소를 이용한 해양동물의 호흡률 측정 장치 .....	3
그림 2 용존산소를 이용한 해양동물의 대사율 측정 장비 .....	4
그림 3 용존산소의 변화를 이용한 황복의 일주기 리듬 분석 .....	4
그림 4 온도변화에 따른 넙치의 용존산소 소모량 .....	4
그림 5 이산화탄소로 조절된 해수의 pH가 알테미아 cysts 부화에 미치는 영향 실험 개요도 .....	5
그림 6 이산화탄소 분압에 따른 넙치 자치어 성장률 실험 모식도 .....	6
그림 7 발생단계 따른 넙치과 어란의 호흡률 변화 .....	7
그림 8 Optode 센서를 이용한 어류의 연속 호흡률 측정 방법 .....	8
그림 9 Optode 센서를 활용한 눈 없는 어류의 생체 리듬 분석 모식도 .....	8
그림 10 어류의 크기에 따른 에너지 대사율 변화 .....	9
그림 11 대기의 산소분압 변화를 이용한 강치의 호흡률 실험 모형 .....	9
그림 12 해수-공기의 기체 평형을 이용한 해양생물의 호흡률 측정 장치 모식도 .....	13
그림 13 수동방계의 호흡에 의한 실험용기의 용존산소와 head space의 산소와 이산화탄소 분압 변화 및 각 변량의 상호 관계 .....	15
그림 14 수동방계의 호흡에 의한 실험용기의 용존산소와 head space의 이산화탄소 분압의 변화와 각 변량에 대한 선형회귀모형 .....	16
그림 15 대기와 수중 환경에서 이산화탄소분압으로 측정한 수동방계의 호흡률 .....	17

## <Table of Contents>

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	1
1 Necessity of Research .....	1
1.1 Economic·Social·Technological Aspects .....	1
2 Objectives and Contents .....	2
2.1 Objectives .....	2
2.2 Progress of project implementation .....	2
<b>Chapter 2. Research Trends</b> .....	3
1 Korean Research Trends .....	3
2 Global Research Trend .....	7
3 Up-to-Date Research Trend .....	10
<b>Chapter 3. Results</b> .....	11
1 Material and methods .....	11
2 Development of respiration chamber for intertidal marine animals using gas equilibrium principle between air and sea water .....	14
2.1 Measuring respiration factors for test animals .....	14
2.2 Comparing the respiration rate of test animals between the aerial and the aquatic environment .....	17
2.3 Conclusion .....	18
<b>Chapter 4. Achievement</b> .....	19
1 Achievement .....	19
1.1 Achievement Rate by Research Content .....	19
<b>Chapter 5. Application Plan and Expected Effects</b> .....	20
<References> .....	21

## <List of Tables>

Table 1 Comparing the slope of the linear regression equation between the concentration of the dissolved oxygen of sea water and the carbon dioxide partial pressure of the head space in the respiration chamber incubating test animals .....	16
Table 2 Partial pressure of the carbon dioxide of the aerial and aquatic respiration chamber increased by test animals breathing .....	18

## <List of Figures>

Figure 1	Respiration rate measuring device for marine animals using dissolved oxygen .....	3
Figure 2	Metabolic rate measuring system for marine animals using dissolved oxygen .....	4
Figure 3	Analysis of diurnal rhythm of river puffer using consumption rate of dissolved oxygen ...	4
Figure 4	Variation of oxygen consumption of flatfish by the water temperature change .....	4
Figure 5	Overview of experiment on the effect on <i>Artemia</i> cysts hatching rate by the sea water pH adjusted by carbon dioxide gas .....	5
Figure 6	Larval flatfish growth experiments in accordance with the partial pressure of carbon dioxide .....	6
Figure 7	Variation of respiration rate of flatfish eggs in accordance with developmental stages .....	7
Figure 8	Continuous measurement of respiration of fish using an optode sensor .....	8
Figure 9	Analysis biorhythm of eyeless cave fish using optode sensor .....	8
Figure 10	Energy metabolic rate changes according to the size of fishes .....	9
Figure 11	Sea lion respiration experiment using the change in atmospheric partial pressure of oxygen .....	9
Figure 12	Schematic respiration measurement device for marine animal using the gas equilibrium principal between air and sea water .....	13
Figure 13	Variation of the concentration of dissolved oxygen and the partial pressure of carbon dioxide and oxygen in the head space of the respiration chamber by the test animals breathing and the polynomial regression analysis on their three respiration factors .....	15
Figure 14	Variation of the concentration of dissolved oxygen and the partial pressure of carbon dioxide in the head space of the respiration chamber by the test animals breathing and the liner regression analysis between their two factors .....	16
Figure 15	Changes in respiration rate of test animals measured with the partial pressure of carbon dioxide in the aerial and aquatic environments .....	17

# 제 6 장 서론

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구의 경제·사회·기술적 필요성

#### 가. 기술적 측면

- 해양동물의 호흡률은 생물의 에너지 대사 연구의 기초 지표임
  - 대표적인 호흡률 측정 지표는 실시간 측정이 가능한 용존산소의 농도 변화임
- 용존산소의 농도 변화를 이용한 호흡률 연구 사례
  - 생물고유의 생리연구: 해양동물의 호흡률, 일주기 리듬, 운동량을 측정 등
  - 생물검정실험: 독성물질 위해도 평가, 환경변화에 대한 반응 등
- 대기에 주기적으로 노출되는 조간대 해양동물의 호흡률은 용존산소만으로 측정이 어려움
- 양측 호흡이 가능한 조간대 해양동물의 호흡률 측정을 위해서는 수중과 대기환경에서 동시에 작동이 가능한 측정 방법의 개발이 필요함
  - 이산화탄소 분압은 해수-공기의 기체 평형원리로 대기와 수중환경에서 동시 측정이 가능함
  - 해양동물은 호흡으로 소모한 산소의 일정 비율의 이산화탄소를 배출함
  - 이산화탄소 역시 용존산소와 같은 해양동물의 호흡률 측정 지표로 가능함

#### 나. 경제·산업적 측면

- 센서의 생물오염 없이 장기간 배양장의 산소와 이산화탄소 분압 모니터링

#### 다. 사회·문화적 측면

- 조간대 해양동물 중 수중과 대기 환경을 자유롭게 왕래하는 종이 있음
  - 이들의 호흡생리는 오랫동안 비밀에 쌓여 있음
  - 종에 따라서는 수중보다 대기환경을 선호함(농게류, 방게류, 말뚝망둑어, 짱뚱어류 등)
  - 이러한 조간대 해양동물의 호흡생리 특성 규명 필요

## 라. 연구소 고유기능 발전과의 연관성

- 본 과제는 [창조적 과학기술로 여는 희망의 새시대]를 비전으로 하는 제3차 과학기술 기본계획에서 5대 분야 전략기술 개발인 ‘High2, 걱정 없는 안전사회 구축’: 사회적 재난 예측 대응 기술 중 선제적 자연재해 대응과 피해 최소화에 해당함

## 제 2 절 연구개발 목표 및 내용

### 1. 연구개발의 목표

- 해수-공기의 기체 평형을 이용한 해양동물의 고감도 호흡률 측정 기술 개발

### 2. 연구 추진계획 및 수행 방법

- 해수-공기의 기체 평형을 이용한 해양동물 호흡률의 고감도 측정 장치 개발
- 호흡률 측정 장치를 이용한 조간대 해양동물의 대기/수중 환경의 호흡률 측정



# 제 7 장 국내외 기술개발 현황

## 제 1 절 국내 연구동향

### ○ 해양동물의 호흡률 측정 기술 현황

- 어류, 패류, 갑각류 등 해양동물의 대표적인 호흡률 지표는 용존산소의 변화량임
- 용존산소의 농도는 적정법, 전극법, 광전극법(optode) 등으로 측정됨
- 전극법을 활용한 해양동물 호흡률의 자동 연속 측정 기술(그림 1)을 1996년에 한국해양과학기술원에서 개발함
- 해수의 용존산소 자동 연속 측정을 통해 분석된 호흡률은 해양동물 고유의 대사활동(그림 2), 생체 리듬(그림 3), 환경변화에 따른 동물의 생리 반응(오 등, 2014), 온도에 따른 어류의 호흡률 변화(그림 4), 저농도 용존산소가 어류의 호흡에 미치는 영향(Lee et al., 2012), 독성물질의 위해도 평가(Kim et al., 1996; Kim et al., 2008) 등 다양한 연구 분야에서 활용됨

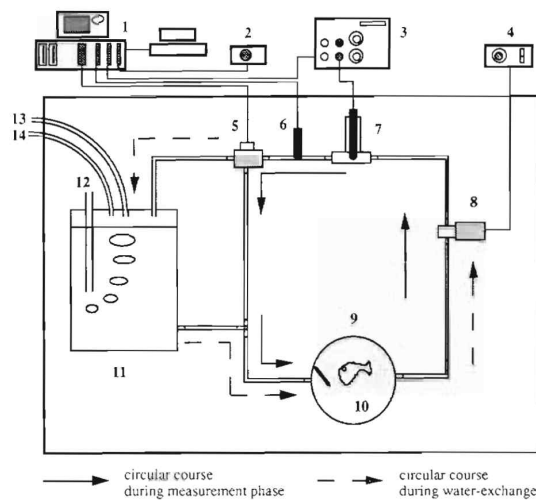


그림 1. 용존산소를 이용한 해양동물의 호흡률 측정 장치(Kim et al., 1996).

1, Computer; 2, air pressure sensor; 3, picoammeter; 4, pump control; 5, 3-way valve; 6, temperature sensor; 7, oxygen sensor; 8, toothed wheel pump; 9, chamber; 10, fish (test animal); 11, reservoir container; 12, air supply; 13, air exhaust pipe

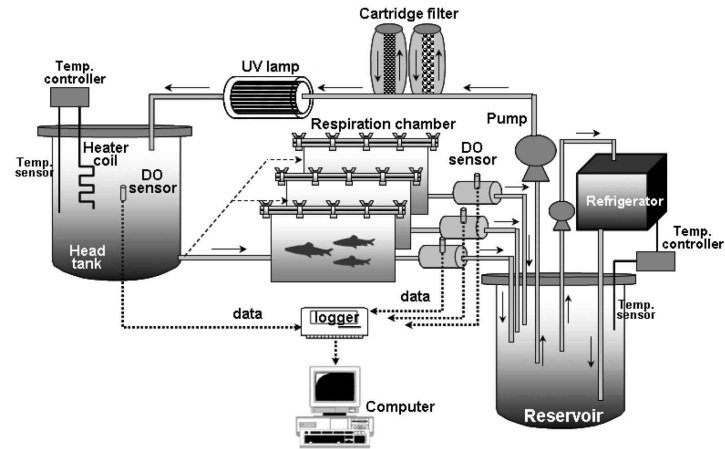


그림 2. 용존산소를 이용한 해양동물의 대사를 측정 장비(Oh and Noh, 2006).

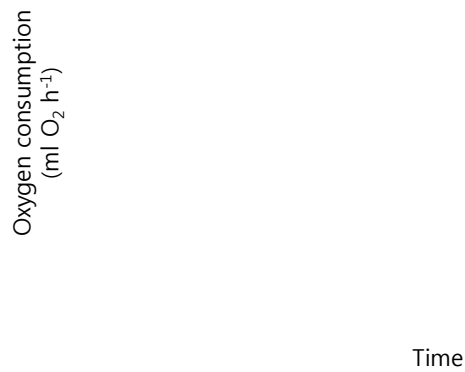


그림 3. 용존산소 변화를 이용한 황복의 일주기 리듬 분석(Kim et al., 1997).

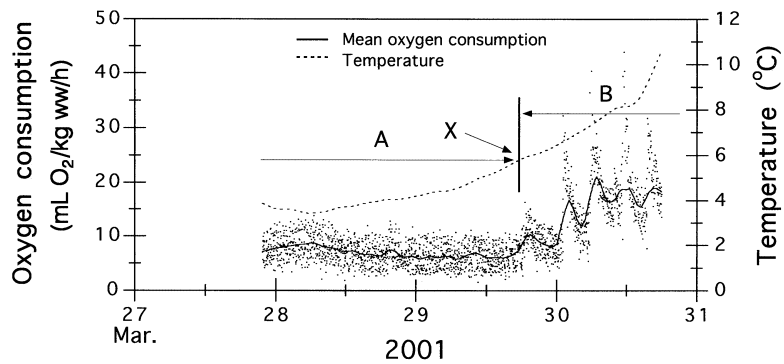


그림 4. 온도변화에 따른 넙치의 용존산소 소모량(Kim et al., 2005).

○ 이산화탄소분압을 측정한 생물검정 연구 사례

- 대기의 이산화탄소 증가에 따른 해양산성화가 해양동물에 미치는 영향 분석을 위해 해수의 pH를 측정하거나 이산화탄소 분압을 측정함
- 알테미아 cysts 배양 수조에 이산화탄소를 주입한 후 해수의 pH 측정(그림 5)
- 해수의 TA, DIC, 수온, 염분도 등을 측정한 후 CO2SYS(Lewis and Wallace, 1998)로 이산화탄소분압 추정
- 생물검정 수조에 공급되는 해수의 이산화탄소 분압을 직접 연속 측정(KIOST, 2016)
- 생물검정실험 해수에 공급되는 이산화탄소 분압의 정밀 제어 장치(그림 6)

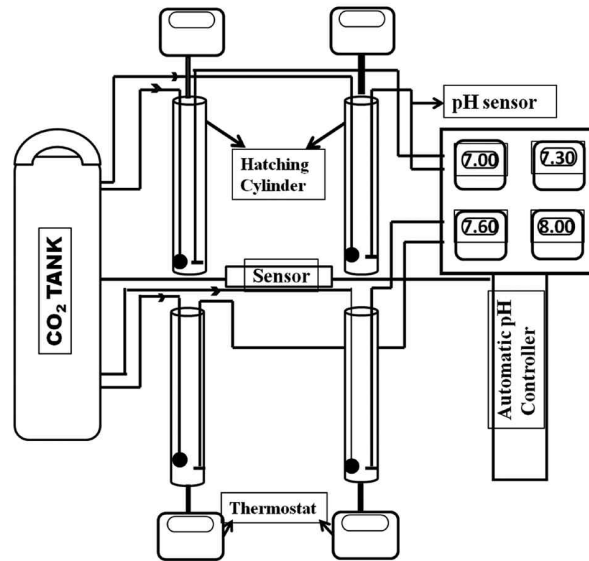


그림 5. 이산화탄소로 조절된 해수의 pH가 알테미아 cysts 부화율에 미치는 영향 실험 개요도(Salma et al., 2012).

그림 6. 이산화탄소 분압에 따른 넙치 자치어 성장률 실험 모식도(Kim et al., 2013).

## 제 2 절 국외 연구동향

### ○ 해양동물의 호흡률 측정 기술 현황

- 미국, 영국, 독일, 일본, 캐나다 등 다양한 국가에서 전극법이나 광전극법으로 용존산소의 농도 변화를 측정하여 해양동물의 대사활동 연구를 수행함
- 최근 해수의 용존산소 농도 측정에 광전극법(optode) 활용이 증가함
- 용존산소를 이용한 다양한 종류의 실험동물의 대사활동 연구 사례(그림 7~10)
- 호흡률측정: 소형 요각류, 패류, 어란(Finn et al., 1999; 그림 8), 표층 어류(Segovia et al., 2012), 중층성 어류(Torres et al., 1979), 심해동물(Kim et al., 2015) 등
- 생물 고유의 생체 리듬(Fig. 9): 동굴 어류
- 해양동물의 대사율(Fig. 10): 대형 어류
- 해양 포유류(강치)의 호흡률 측정을 위해 산소 분압 측정 전 실험동물의 호흡에 의해 발생한 이산화탄소 제거(그림 11)

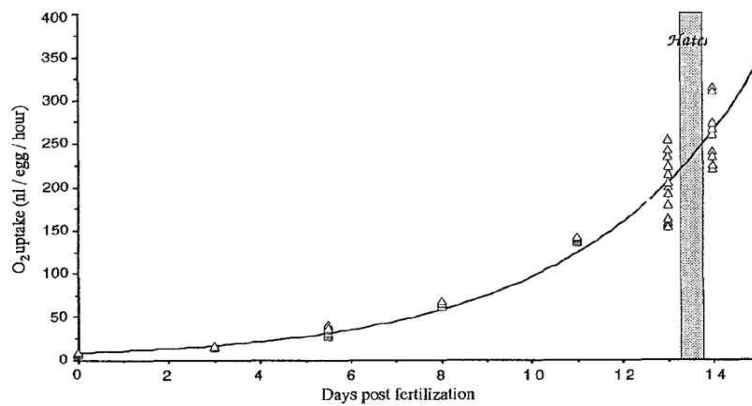


그림 7. 발생 단계 따른 넙치과 어란의 호흡률 변화(Finn et al., 1991)

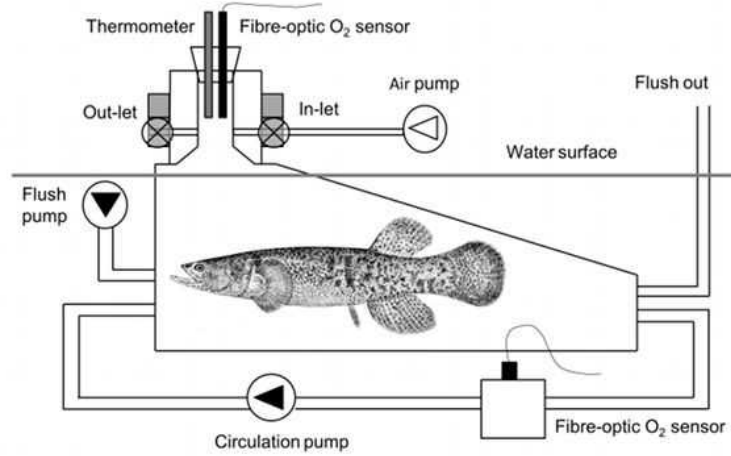


그림 8. Optode 센서를 이용한 어류의 연속 호흡률 측정 방법

(<http://www.uaa.alaska.edu/biological-sciences/dallia-pectoralis.cfm>).

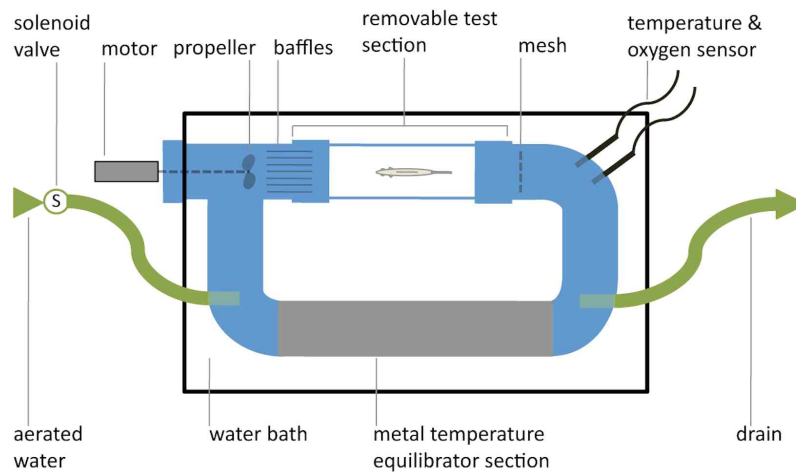


그림 9. Optode 센서를 활용한 눈 없는 어류의 고유 생체 리듬 분석 모식도

(Moran et al., 2014).

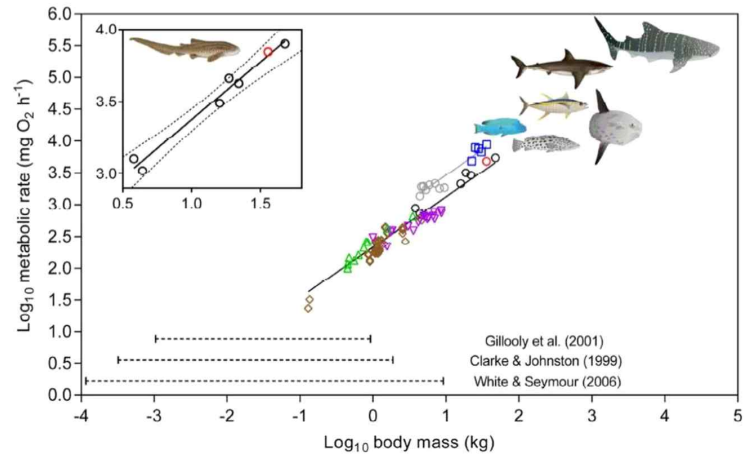


그림 10. 어류의 크기에 따른 에너지 대사율 변화(Payne et al., 2015).

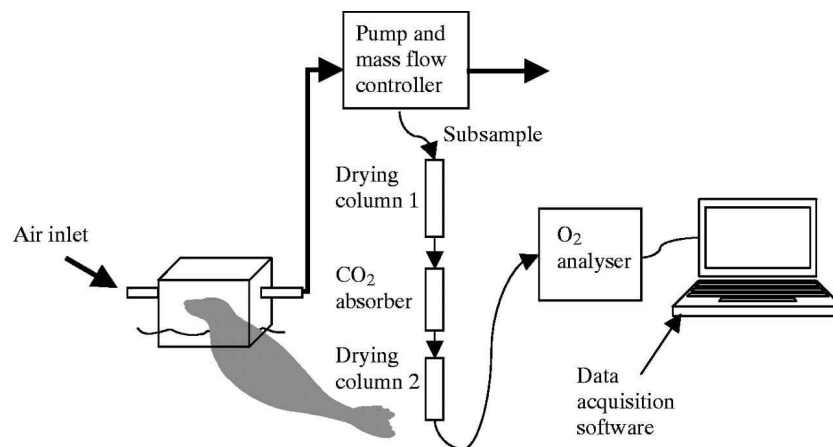


그림 11. 대기의 산소분압 변화를 이용한 강치의 호흡률 실험 모형 (Sparling and Fedak, 2004).

○ 이산화탄소분압을 측정한 생물검정 연구

- 해양산성화에 따른 해양동물의 영향 분석을 위해 해수의 이산화탄소분압을 직/간접 방법으로 측정함
- 간접적인 방법은 해수의 pH, TA, DIC, 수온, 염분도 등을 측정한 후 CO2SYS(Lewis and Wallace, 1998)로 실험해수의 이산화탄소분압 추정(Munday et al., 2009; Munday et al., 2010; Mu et al., 2015)
- 생물검정 수조에 공급하는 해수의 이산화탄소 분압 직접 연속 측정
- 생물검정 수조에 공급하는 기체의 이산화탄소 분압 측정(Benner et al., 2013)
- 생물검정 수조 내 해수의 이산화탄소 분압을 실험 전과 실험 종료 후 총 2회 직접 측정 (Checkley et al., 2009).

### 제 3 절 현재까지의 연구개발 현황

○ 해양동물의 호흡률 측정방법

- 조간대 해양동물의 대기 환경 호흡률을 밀폐환경에서 호흡으로 감소한 이산화탄소를 10% NaOH 제거한 후 감소한 기체의 부피로 측정(Gilson-type respirometer)(Jimenez and Bennett, 2005)
- 수중 환경은 적정 또는 Winkler titration(Cox, 1990)이나 전기화학센서로 측정
- 해수의 이산화탄소 분압은 고압펌프와 필터가 부착된 해수-공기의 기체 평형기를 활용하여 측정(Dickson et al., 2007)
- 한국해양과학기술원에서 알테미아 cysts를 배양하는 동안 해수의 pCO<sub>2</sub>를 연속으로 측정하는 방법을 개발함(KIOST, 2016)

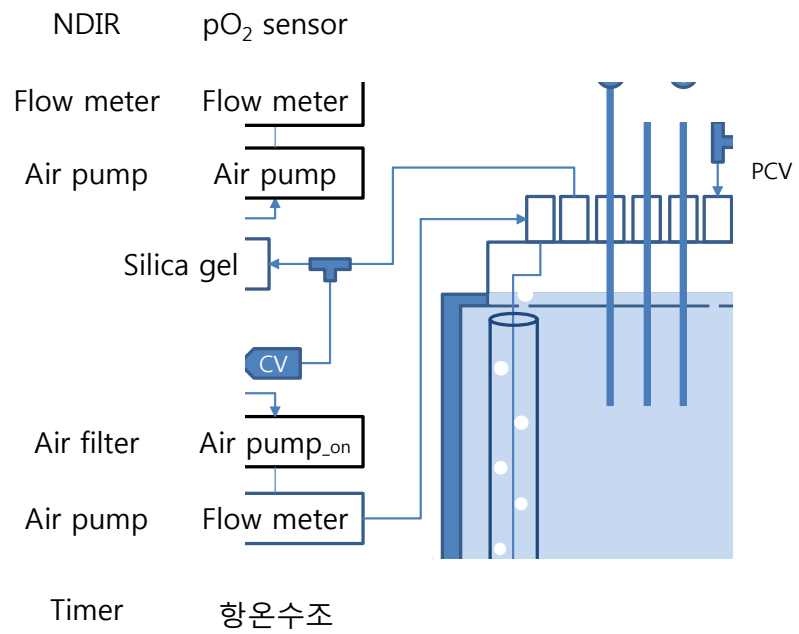


## 제 8 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구 수행 내용 및 방법

- 해수-공기의 기체 평형을 이용한 해양동물의 호흡률 측정 장치 개발
  - 해양동물의 호흡률 측정 장치 모식도(그림 12)
  - 측정 장치는 반폐쇄 실험용기(대기, 1.151 ℓ; 수중, 9.965 ℓ)와 외부의 산소가 풍부한 공기를 공급하는 공기펌프(공기 공급 속도, 1 ℓ/min), 해수의 이산화탄소와 산소를 추출하기 위해 공기를 에어스톤에 공급하는 공기펌프(공기 공급 속도, 1 ℓ/min), 실험용기 상부의 head space에서 공기를 추출하는 공기 펌프(공기 추출 속도, 200ml/min), 용존산소 측정기 (Optode, Witrox 4 oxygen meter, Loligo systems, Denmark), 기체 상태의 산소 측정기 (FC-10, Sable systems, NV, USA)와 이산화탄소 분압 측정기(Li7000과 LI-840A, Nebraska, USA), 외부에서 공급된 공기로 인해 높아진 실험용기의 압력을 줄이기 위한 압력조절관 등으로 구성됨
  - 호흡률 측정 용기의 온도를 일정하기 유지하기 위해 250 ℓ의 물 중탕용기에 수용함
- 해수-공기의 기체 평형을 이용한 수중 환경의 해양동물 호흡률 측정 과정
  - 실험동물이 수용된 반폐쇄 용기(9.965 ℓ)에 해수(13.35pus)를 넣고 소다라임으로 이산화탄소를 제거한 공기로 폭기하여 용존산소를 풍부하게 만들었음
  - 실험동물의 호흡으로 감소한 용존산소를 optode로 1초에 1회씩 약 12시간 측정함
  - 이와 동시에 실험용기의 head space(부피, 350ml)의 공기를 공기펌프로 연속으로 추출한 후 에어스톤을 경유하여 해수에 1 L/min 속도로 주입과 추출을 반복함
  - 해수를 무한 반복 통과하여 해수의 기체 분압과 평형에 도달한 head space의 공기를 연속으로 추출하여 실리카겔로 수분을 제거한 후 산소와 이산화탄소 분압을 측정한 후 head space로 다시 주입과 추출을 반복함
- 해수-공기의 기체 평형을 이용한 대기 환경의 해양동물 호흡률 측정 과정
  - 실험동물이 수용된 반폐쇄 용기(1.151 ℓ)에 해수(150ml) 주입
  - 실험용기의 산소가 감소하면 산소가 풍부한 외부의 공기를 소다라임으로 이산화탄소를 제거 후 1 L/min 속도로 주입함
  - 외부의 공기를 20분간 주입 후 60분 뒤에 다시 공급을 반복함

- 실험용기내 공기시료를 200ml/min의 속도로 연속으로 추출하여 NDIR(Li7000과 LI-840A, Nebraska, USA)로 이산화탄소 분압을 측정하고 산소 분압을 FC-10(Sable systems, NV, USA)으로 측정 후 다시 주입과 추출을 반복함
- 실험동물의 호흡으로 감소한 산소와 증가한 이산화탄소 분압을 1초에 1회씩 약 48시간 측정
- 실험해수의 살균
  - 박테리아 오염을 방지하기 위해 해수는 60°C로 1시간 저온 살균
  - 살균된 해수를 0.1µm 공극의 필터로 여과하여 실험용기에 주입함
- 실험동물
  - 실험동물인 수동방게(*Helice wuana* Tathbun, 1927) 3마리를 전남 광양시 진월면 오사리 (34°59′ 57″N 127°46′41″E)에서 2016년 7월 20일 채집함
  - 실험동물을 실험실에서 90일 이상 사육함
  - 실험동물의 3마리(습중량: a, 6.36g, b, 4.59g; c, 5.37g)
  - 탈피한 개체는 1개월 후에 실험에 사용함
- 자료분석
  - 실험동물의 호흡률을 실험동물의 호흡으로 실험용기의 용존산소 및 산소와 이산화탄소 분압에 대한 1시간 동안의 변량에 대한 선형회귀식의 기울기로 추정함
  - 선형회귀식의 기울기는 습중량으로 표준화함
  - 호흡률 측정 용기의 head space에서 측정된 이산화탄소 분압이 호흡률 지표로서 사용 여부를 확인하기 위해 측정된 용존산소, 산소분압, 이산화탄소분압의 3개 변수에 대한 상호 2차 회귀모형을 구함
  - Head space의 이산화탄소 분압은 대기의 기압과 배양수의 수온과 염분도를 고려하여 보정함(Dickson et al., 2007)



P, pH meter; T, Temperature sensor; O, Optode sensor;  
 CV, Check valve; PCV, Pressure control ventilation

그림 12. 해수-공기의 기체 평형을 이용한 해양생물의 호흡률 측정 장치 모식도

## 제 2 절 해수-공기의 기체 평형을 이용한 해양동물 호흡률의 고감도 측정 기술 개발

### 1. 실험동물의 호흡률 지표 측정

- 이산화탄소 분압을 실험동물의 호흡률 측정 지표로서의 가능성 분석을 위해 실험용기에 수동방게 1마리(5.37g)가 넣은 후 해수의 용존산소와 실험용기 상부의 head space의 산소와 이산화탄소 분압을 12시간 동안 연속으로 측정하였다(그림 13). 이들 3종류의 호흡률 측정 변수 중 이산화탄소분압은 시간에 따라 선형적으로 증가하였다. 이에 반하여 용존산소와 산소분압은 시간에 따라 비선형적으로 감소하였다. 측정값의 안정성은 이산화탄소분압이 가장 높고, 다음은 산소분압, 용존산소 순이었다. 이들 변수간의 2차 회귀모형의 결정계수( $r^2$ )는  $0.9961 \pm 0.0029$ (n, 3;  $p < 0.001$ )였다.
- 실험동물이 수용된 3개의 측정용기에서 해수의 용존산소 측정값과 head space의 이산화탄소 분압의 시간당 변량에 대한 선형회귀분석을 하였다(그림 14). 두 변량 사이의 선형회귀식의 결정계수( $r^2$ )는  $0.9580 \pm 0.0076$ (n, 3;  $p < 0.001$ )로 이산화탄소 분압이 용존산소 변량의 95%를 설명하였다. 이 때 선형회귀식의 평균 기울기는  $216 \pm 110$ 이었다. 즉, 실험동물의 호흡으로 인한 이산화탄소의 변량이 용존산소 보다 매우 높았다(표 1).

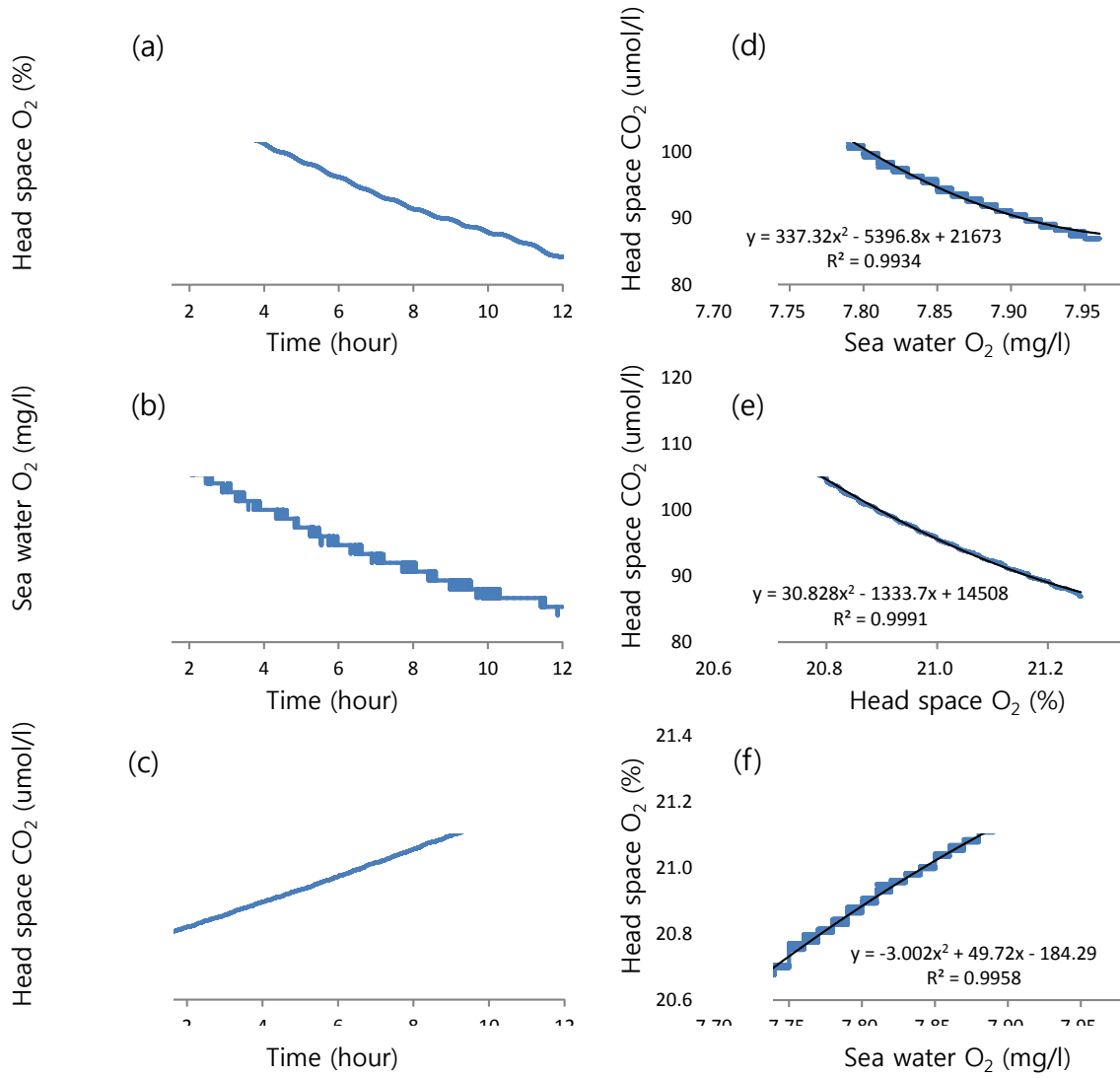


그림 13. 수동방계(5.37g)의 호흡에 의한 실험용기의 용존산소와 head space의 산소와 이산화탄소 분압 변화(그림, a-c) 및 각 변량의 상호 관계 분석(그림, d-f)

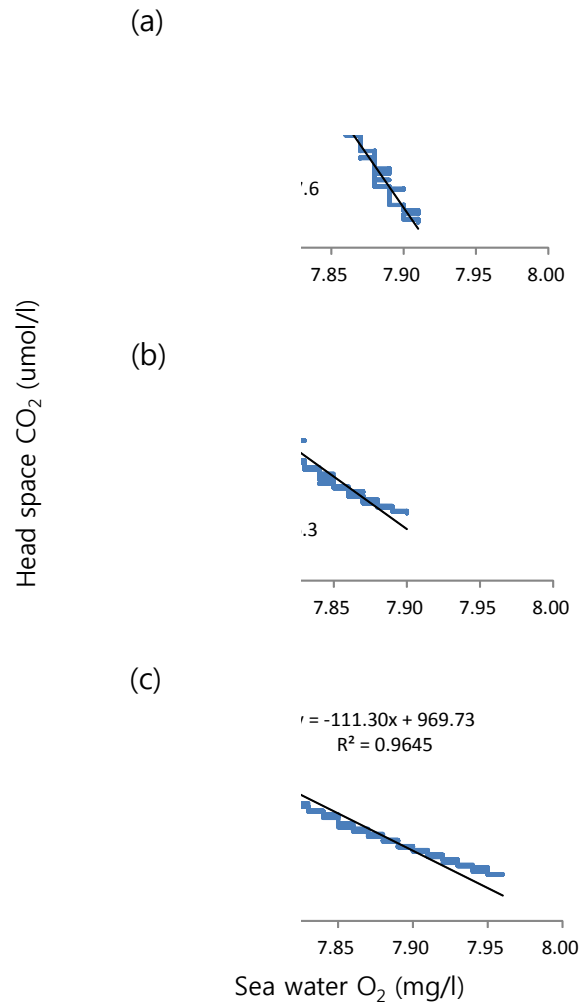


그림 14. 수동방계(a-c)의 호흡에 의한 실험용기의 용존산소와 head space의 이산화탄소 분압의 변화와 각 변량에 대한 선형회귀모형

표 1. 수동방계가 호흡하는 동안 실험용기의 용존산소와 head space의 이산화탄소 분압에 대한 선형회모형의 기울기 비교

Test animal (g)	Slope	SE	r <sup>2</sup>	N
A (6.36)	-330.55***	0.383	0.9496	39,599
B (4.59)	-207.12***	0.199	0.9599	45,000
C (5.37)	-111.30***	0.101	0.9645	44,999

\*\*\*, p < 0.001

## 2. 실험동물의 수중과 대기환경의 호흡률 비교

- 해수-공기의 기체 평형을 이용하여 실험동물인 수동방게 3마리의 개별 호흡률을 이산화소 분압으로 변화량으로 측정하였다. 대기 환경에서 48시간 동안 수동방게는 호흡으로 시간당 이산화탄소를 최소 60에서 최대 140 CO<sub>2</sub> umol/h/g를 배출하였다. 수동방게 3마리 모두 호흡률이 높은 시기는 자정전후였다. 이들 3마리의 평균 호흡률은 102.4±32.7 CO<sub>2</sub> umol/h/g이었다. 이에 반하여 수중 환경에서 약 11시간 동안 수동방게는 호흡으로 시간당 4~5 umol/h/g의 이산화탄소를 배출하였다. 이들의 3마리의 평균 4.1±0.2 CO<sub>2</sub> umol/h/g이었다. 대기와 수중 환경에서 이산화탄소 지표를 기준으로 수동방게는 대기 환경의 호흡률이 수중환경보다 약 25배 높았다(그림 15: 표 2).

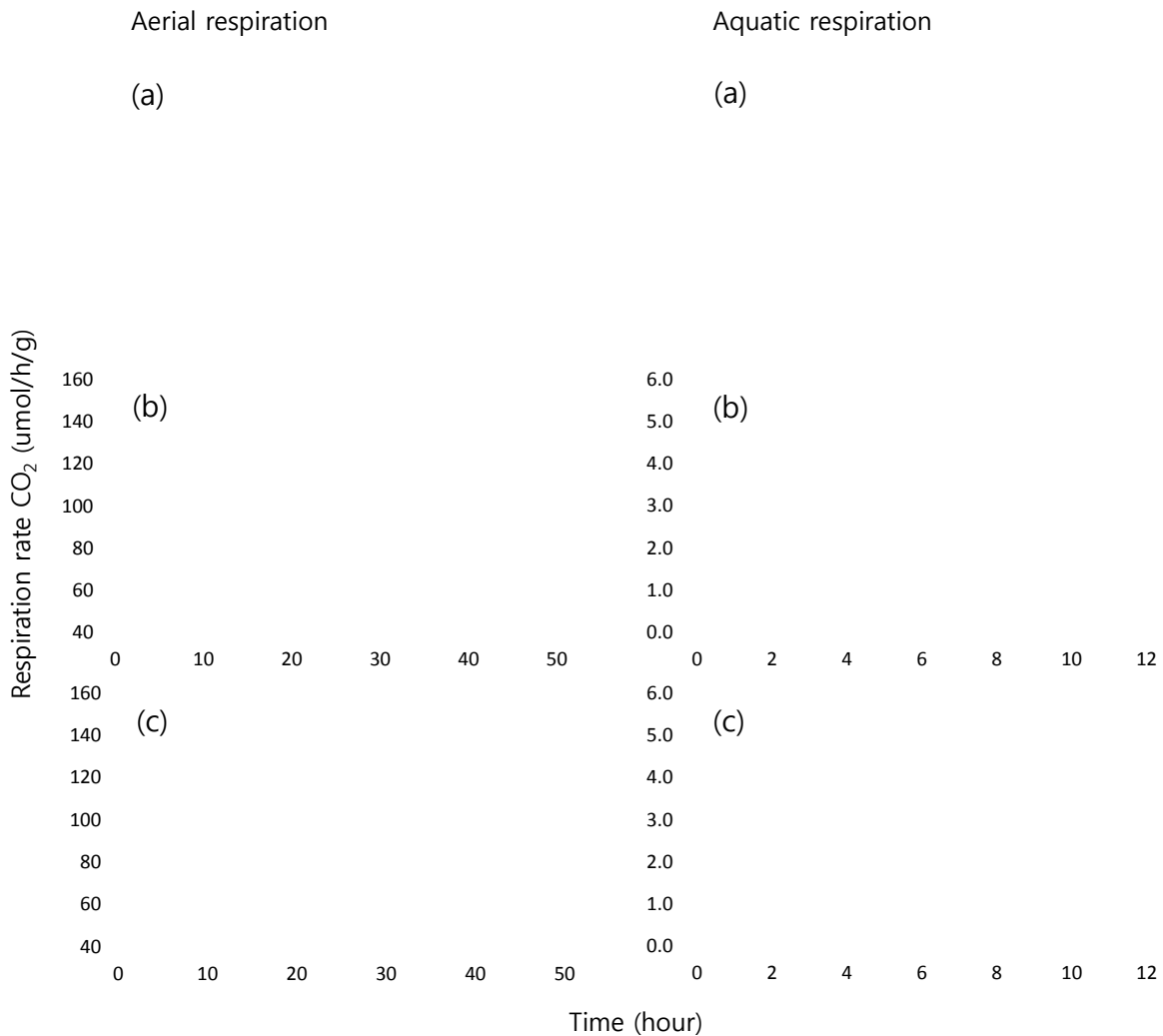


그림 15. 대기와 수중 환경에서 이산화탄소분압으로 측정한 수동방게(a-c)의 호흡률

표 2. 수중과 대기 환경에서 수동방계의 호흡에 의한 이산화탄소 분압의 증가율

Test animal	Respiration (CO <sub>2</sub> umol/h/g)					
	Aerial condition			Water condition		
	Average	SD	N	Average	SD	N
A (6.36)	104.8	40.3	36	3.6	0.2	10
B (4.59)	110.3	28.5	36	4.9	0.3	11
C (5.37)	92.1	29.3	36	3.8	0.2	11
Average	102.4	32.7		4.1	0.2	

### 3. 연구개발 수행 결론

- 해수-공기의 기체 평형 원리를 이용하여 수중 환경에서 해양동물의 호흡에 의한 용존산소의 감소량을 head space의 이산화탄소 분압으로 추정 가능
- 이 장비로 측정한 수중 해양동물의 호흡률은 용존산소 기반의 호흡률 측정법 보다 해상도가 최소 100배 이상임
- 양측 호흡을 하는 수동방계의 대기 환경 호흡률은 수중 환경의 약 25배



## 제 9 장 목표 달성도

### 제 1 절 목표 달성도

#### 1. 본 연구기간 내 연구내용 대비 달성율(%)

총 연구기간내 년차별 연구내용 대비 달성율(%)					
년차	연구성과	진척율		성취도 (정상, 부진)	특기사항 (우수성 및 부진사유)
		년차별 계획대비	총연구 기간대비		
1차년 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 해수-공기의 기체 평형을 이용한 해양동물의 고감도 호흡률 측정 장치 개발</li> <li>- 해수-기체 평형기가 부착된 해양동물의 호흡률 측정 장치로 실험동물이 호흡하는 동안의 해수의 용존산소 및 평형기의 산소와 이산화탄소 분압 동시 측정</li> <li>- 해양동물의 호흡에 의한 용존산소와 이산화탄소의 변량이 계측기의 유효 숫자를 기준으로 후자가 전자보다 최소 100배 이상 해상도가 높음</li> </ul>	100	100	정상	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 해수-공기의 기체 평형을 이용한 해양동물의 수중과 대기 호흡률 측정</li> <li>- 수동방게 3마리의 개체별 수중과 대기환경의 호흡률 측정</li> <li>- 수동방게의 대기 호흡률은 수중의 약 25배</li> </ul>	100	100		

## 제 10 장 연구개발 결과의 활용방안 및 기대효과

### 제 1 절 활용방안

- 양측 호흡을 하는 조간대 해양동물의 대기와 수중 환경 호흡생리 연구
- 해양생물의 오염 없이 장기간 양식장의 산소와 이산화탄소 분압 수질 모니터링

### 제 2 절 기대효과

- 이산화탄소 분압을 활용한 해양생물의 정밀한 호흡률 측정

## <참고문헌>

- Benner I, Diner RE, Lefebvre SC, Li D, Komada T, Carpenter EJ, Stillman JH. (2013). *Emiliana huxleyi* increases calcification but not expression of calcification-related genes in long-term exposure to elevated temperature and pCO<sub>2</sub>. *Phil Trans R Soc B* 368:20130049. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0049>
- Checkley Jr. DM, Dickson AG, Takahashi M, Radich JA, Eisenkolb N, Asch R. (2009). Elevated CO<sub>2</sub> enhances otolith growth in young fish. *Science*, 324: 26.
- Cox, GW. (1990). Measurement of dissolved oxygen. In *Laboratory Manual of General Ecology*, 6th edn (Kane K, Manders M, Selle P. eds), pp. 212-215. Debuque, IA: Wm C. Brown Publishers.
- Dickson AG, Sabine CL, Christian JR (Eds.). (2007). Guide to best practices for ocean CO<sub>2</sub> measurements. PICES Special Publication 3, 191 pp.
- Finn RN, Fyhn HJ, Evjen MS. (1991). Respiration and nitrogen metabolism of Atlantic halibut eggs (*Hippoglossus hippoglossus*). *Marine Biology*, 108: 11-19.
- Jimenez AG, Bennett WA. (2005). Respiratory physiology of three Indo-Pacific fiddler crabs: metabolic response to intertidal zonation patterns. *Crustaceana*, 78 (8): 965-974.
- Kim KS, Shim JH, Kim S. (2013). Effects of ocean acidification on the larval growth of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Biogeosciences Discuss*, 10, 7413-7431.
- Kim TW, Taylor J, Lovera C, Barry JP. (2015). CO<sub>2</sub>-driven decrease in pH disrupts olfactory behaviour and increases individual variation in deep-sea hermit crabs. *ICES Journal of Marine Science*; doi:10.1093/icesjms/fsv019.
- Kim WS, Jeon JK, Lee SH, Huh HT. (1966). Effects of pentachlorophenol (PCP) on the oxygen consumption rate of the river puffer fish *Takifugu obscurus*. *Marine Ecology Progress Series*, 143: 9-14.
- Kim WS, Kim JM, Yi SK, Huh HT. (1997). Endogenous circadian rhythm in the river puffer fish *Takifugu obscurus*. *Marine Ecology Progress Series*, 153: 293-298.
- Kim WS, Kim JW, Lee JH, Huh SH. (2008). Effects of sodium cyanide (NaCN) on the endogenous rhythm of the oxygen consumption rate in the black rockfish *Sebastes schlegelii*. *Ocean Science Journal*, 43: 107-113.
- Kim WS, Yoon SJ, Kim JM, Gil JW, Lee TW. (2005). Effects of temperature changes on the endogenous rhythm of oxygen consumption in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 71: 471-478.

- KIOST, (2016). Ecological impacts of ocean acidification (EcoAcid). KIOST Report BSPE 99317-10976-3, 240 pp.
- Lee JA, Kim JW, Oh SY, Yi SK, Noh I, Ishimatsu A, Kim WS. (2012). Effect of low dissolved oxygen on the oxygen consumption rate and rhythm of the mudskipper *Scartelaos gigas* (Pisces, Gobiidae). *Fisheries Science*, 78:1013-1022.
- Lewis E, Wallace D. (1998). Program developed for CO<sub>2</sub> system calculations. ORNL/CDIAC-105.
- Moran D, Softley R, Warrant EJ. (2014). Eyeless mexican cavefish save energy by eliminating the circadian rhythm in metabolism. *PLoS ONE* 9(9): e107877. doi:10.1371/journal.pone.0107877.
- Mu J, Jin F, Wang J, Zheng N, Cong Y. (2015). Effects of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification on early life stages of marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Biogeosciences*, 12: 3861-3868.
- Munday PL, Dixson DL, McCormick MI, Meekan M, Ferrari MCO, Chivers DP. (2010). Replenishment of fish populations is threatened by ocean acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 12930-12934.
- Munday PL, Donelson JM, Dixson DL, Endo GJK. (2009). Effects of ocean acidification on the early life history of a tropical marine fish. *Proceedings of the Royal Society B*, 276: 3275-3283.
- Oh SY, Kim CK, Jang YS, Choi HJ, Myoung JG. (2014). Effect of salinity on survival, oxygen consumption and blood physiology of Korean rockfish *Sebastes schlegelii*. *Ocean and Polar Research*, 36:135-143.
- Oh SY, Noh CH. (2006). Effects of water temperature and photoperiod on the oxygen consumption rate of juvenile dark-banded rockfish, *Sebastes inermis*. *Journal of Aquaculture*, 19: 210-215.
- Payne NL, Snelling EP, Fitzpatrick R, Seymour J, Courtney R, Barnett A, Watanabe YY, Sims DW, Squire L, Semmens JM. (2015). A new method for resolving uncertainty of energy requirements in large water breathers: the 'mega-flume' seagoing swim-tunnel respirometer. *Methods Ecol Evol*, 6: 668-677.
- Salma U, Uddowla MH, Lee G, Yeo Y, Kim HW. (2012). Effects of pH change by CO<sub>2</sub> induction and salinity on the hatching rate of *Artemia franciscana*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 15: 177-181.
- Segovia E, Munoz A, Flores H. (2012). Water flow requirements related to oxygen consumption in juveniles of *Oplegnathus insignis*. *Latin american journal of aquatic*

research, 40: 755-762.

Sparling CE, Fedak MA. (2004). Metabolic rates of captive grey seals during voluntary diving. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 1615-1624.

Torres JJ, Belman BW, Childress JJ. (1979). Oxygen consumption rates of midwater fishes as a function of depth of occurrence. *Deep-Sea Research*, 26A: 185-179.

## 주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.