

이산화탄소 농도 증가에 따른 발광미생물의 상대발광량과 밀도 변화에 대한 연구

성찬경¹ · 문성대¹ · 김혜진¹ · 최태섭¹ · 이규태¹ · 이정석^{1*} · 강성길²

¹(주)네오엔비즈 환경안전연구소
²한국해양연구원 해양시스템안전연구소

Influence of Increased Carbon Dioxide Concentration on the Bioluminescence and Cell Density of Marine Bacteria *Vibrio fischeri*

CHAN-GYOUNG SUNG¹, SEONG-DAE MOON¹, HYE-JIN KIM¹, TAE SEOB CHOI¹, KYU-TAE LEE¹,
JUNG-SUK LEE^{1*} AND SEONG-GIL KANG²

¹Institute of Environmental Protection and Safety, NeoEnBiz Co. Daewoo Technopark A-1306, Dodangdong,
Bucheon, Kyeonggi-do 420-806, Korea

²Maritime and Ocean Engineering Research Institute, KORDI, 171 Chang-dong, Yusung-gu, Daejeon 305-343, Korea

해수의 용존 이산화탄소 증가가 해양미생물인 *Vibrio fischeri*의 발광량 및 세포밀도에 미치는 영향을 규명하고자 380(대조구), 1,000, 3,000, 10,000 그리고 30,000 ppm 농도구배에 24시간 동안 노출하고, 매 6시간마다 발광미생물의 발광량과 세포밀도 변화를 측정하였다. 5개 농도구배에 노출된 발광미생물의 발광량은 12시간째에 3,000 ppm 이상의 농도구배에서 대조구와 비교하여 발광량이 유의하게 감소하는 경향을 보였다. 하지만 24시간째에는 30,000 ppm 농도 조건에서만 대조구와 유의한 차이를 보였으며, 10,000 ppm 이하 농도 조건에서는 차이를 보이지 않았다. 발광미생물의 세포밀도는 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였고, 각 농도별 시간에 따른 영향은 발광량 변화와 유사하였다. 용존 이산화탄소 농도 변화와 발광미생물의 발광량 및 세포밀도 사이에는 유의한 농도-반응 관계가 있으며, 다만 상대적으로 짧은 시간에 발생하는 저태영향으로 배양이 지속됨에 따라 뚜렷하게 회복하는 특성을 보여 증가된 농도의 이산화탄소 영향이 항상 일정하지 않음을 보여주었다. 본 연구는 해양미생물 개체군 성장에 미치는 이산화탄소의 영향을 평가한 것으로 향후 해수의 용존 이산화탄소 농도 증가가 미치는 다양한 해양생물에 대한 영향 및 위해성 예측과 평가에 활용될 수 있을 것으로 기대한다. 또한 해양미생물에 대한 생태영향평가 결과는 이산화탄소 저감을 위해 추진되고 있는 해양 지중저장사업의 환경위해성평가에도 활용될 수 있을 것이다.

An experiment was conducted to evaluate the biologically adverse effect of increased carbon dioxide in seawater on marine bacteria, *Vibrio fischeri*. We measured the bioluminescence and cell density at every 6 hours for 24 hours of the whole incubation period after exposing test microbes to a range of CO₂ concentration such as 380(Control), 1,000, 3,000, 10,000 and 30,000 ppm, respectively. Significant effect on relative luminescence (RLU) of *V. fischeri* was observed in treatments with CO₂ concentration higher than 3,000 ppm at *t*=12 h. However, the difference of RLU among treatments significantly decreased with the incubation time until *t*=24 h. Similar trend was observed for the variation of cell density, which was measured as optical density using spectrophotometer. The results showed that a significant relationship between CO₂ concentration and bioluminescence of test microbes was observed for the mean time. However, the inhibition of relative bioluminescence and also cell density could be recovered at the concentration levels higher than 3,000 ppm. The dissolved CO₂ can be absorbed directly by cell and it can decrease the intracellular pH. Our results implied that microbes might be adversely affected at the initial growing phase by increased CO₂. However, they could adapt by increasing ion transport including bicarbonate and then could make their pH back to normal level. Results of this study could be supported to understand the possible influence on marine bacteria by atmospheric increase of CO₂ in near future and also by released CO₂ during the marine CO₂ sequestration activity.

Keywords: Carbon Capture and Storage (CCS), Carbon Dioxide, Bioluminescence, CO₂ Leakage, Ocean Acidification

*Corresponding author: bioassay@neoenbiz.com

서 론

자연환경에 대한 인간 활동의 영향이 크게 증가하기 이전 650,000년간 대기에 존재하는 이산화탄소(CO₂)의 농도는 대체로 180~300 ppm 사이의 범위에서 변화하였다고 추정된다(Pearson and Palmer, 2000). 현재 대기 중 CO₂ 농도는 380 ppm 정도로 150년 전과 비교하면 이미 약 40% 높아진 상태지만, 앞으로도 매년 0.5%씩 증가할 것으로 예상된다(Forster *et al.*, 2007). 최근 대기 중 CO₂의 급격한 농도 증가의 주된 원인으로서는 화석연료의 사용과 산림, 서식지의 파괴, 농축산업의 대량화 등 인간 활동과 밀접한 관계가 있다고 한다. 여러 경우를 가정한 다양한 시나리오 예측에 따르면 대기 중 CO₂ 농도는 2100년이면 최대 1000 ppm 까지 증가할 가능성이 있다(IPCC, 2001). 이와 같은 증가 속도는 산업혁명 이전 시기의 변화속도와 비교할 때 약 100배 빠르다.

인간 활동에 의하여 현재까지 대기 중으로 방출된 CO₂ 중에서 상당부분은 해양으로 흡수되어 대기로부터 제거된 것으로 추정되고 있다(Sabine *et al.*, 2004). 해양은 대기에 비해 50배나 큰 탄소의 저장고(reservoir)로서 대기 중 이산화탄소 농도 증가를 완충하는 역할을 해왔다. 대기 중 이산화탄소 농도 증가는 필연적으로 표층 해수의 이산화탄소 유입을 증가시키는 역할을 하게 된다. 이로 인하여 대기 중 CO₂ 농도의 상승은 표층 해수의 화학적 특성을 변화시킴으로써 연안환경 및 생태계에 영향을 미칠 수 있다는 결과가 보고되고 있다(Caldeira and Wickett, 2003; Feely *et al.*, 2004 and Orr *et al.*, 2005).

해수에 녹은 CO₂는 대부분이 중탄산염(bicarbonate)으로 변환되는데 이 반응과정에서 수소이온(H⁺)이 발생하여 해수의 산성도가 증가하게 된다(Caldeira and Berner, 1999). 반면에 탄산염(carbonate) 농도는 감소하게 되는데, 이는 탄산염을 이용하여 몸체를 구성하는 여러 생물들, 특히 식물플랑크톤, 산호, 패류 등의 생리생태에 심각한 영향을 미칠 수 있다. 일례로, 대기 중 CO₂ 농도가 증가하게 되면 식물플랑크톤인 *Coccolithosphorods*의 석회 형성률(calcification rate)이 감소하게 되어 껍질질(shell)의 표면 구조가 변화되고 성장이 둔화된다(Riebesell *et al.* 2000). 뿐만 아니라 산호는 막대한 양의 탄산염을 흡수하여 탄산칼슘으로 고정하는 생물로 대기-해수 탄소 순환 과정에서 매우 중요한 역할을 하고 있으므로, 대기 중 CO₂ 농도 증가가 산호 군락의 쇠퇴를 가져올 경우 해양의 탄소 흡수 및 저장 능력 역시 큰 영향을 받을 수 있다. 이처럼 대기 중 CO₂ 농도 증가현상은 단순히 지구온난화의 관점에서 뿐만 아니라 표층 해수의 화학적 특성 변화에 따른 생태계 영향의 관점에서도 충분히 검토되고 대응할 필요가 있다.

해수의 이산화탄소 농도 증가는 pH 감소를 유발하며, 해수에 노출되어 끊임없이 물질교환을 하는 해양생물의 세포막 기능, 특히 이온교환 등에 직접적인 영향을 미칠 수 있다(Knutzen, 1981). 용존 이산화탄소는 세포막을 직접 투과하여 세포 기질의 pH를 감소 시킴으로써 해양 생물의 생리, 생화학적 특성 및 기능에 더욱 부정적인 영향을 미칠 수 있다(Prtner *et al.* 2004; Prtner, 2008). 하지만 아직까지 미생물을 포함한 다양한 생물들에 대한 이산화탄소 농도 증가 및 이에 관련된 생리 또는 생화학적 특성 변화 영향을 체계적으로 규명한 연구는 많지 않다.

최근 대기 중 CO₂ 농도 증가를 완화시키기 위한 다양한 방안들

이 모색되고 있으며, 그 중에서 대기로 방출되는 CO₂를 포집하여 해저 지질구조에 저장하는 방안은 직접적인 CO₂ 방출량 저감 효과는 크지만 저장된 CO₂가 유출될 경우 해양환경 및 생태계에 부정적인 영향을 미칠 수 있다는 점에서 우려를 낳고 있다(Seibel and Walsh, 2001). 따라서 이러한 과정에서 고농도의 CO₂가 해양 생물 및 생태계에 어떤 영향을 미칠 수 있는지에 대한 면밀한 검토가 필요하고, 만일 불가피하게 해양 처리를 하는 경우에는 생태계 영향을 최소화할 수 있는 처리 조건을 모색하는 것이 바람직할 것이다(Brewer *et al.*, 1999; IPCC, 2001). 이를 위해서는 CO₂ 농도를 비롯한 해수의 물리화학적 변화에 따라 나타날 수 있는 생물영향에 대한 연구가 충분히 수행되어야 하며, 심해환경을 재현하거나 현장 조건이 충분히 반영된 다양한 생리독성학적 평가를 실시하여야 한다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 고농도의 CO₂에 노출된 해양생물들의 반응 및 생태계영향을 정량적으로 예측할 수 있는 생태계 위해성 모델의 개발이 가능할 것이다(Auerbach *et al.*, 1997; Kita and Ohsumi, 2004).

해양미생물은 생태계 내에서 분해자로서 특히 중요한 역할을 하고 있다. 현재까지 이산화탄소의 농도증가가 미생물에게 미치는 영향에 대해서 체계적인 연구가 수행된 사례는 매우 드물다. 일본의 한 연구에서 이산화탄소를 이용하여 해수의 pH를 낮춘 다음 11종의 미생물을 배양하며 세포 수의 증가를 관찰하였는데 이때 노출에 이용한 이산화탄소의 농도와 자세한 실험 방법 등이 논문에 제시되지 않아 결과 이용에 제한이 있다(Takeuchi *et al.*, 1997). 국내에서 발광미생물을 급성 노출하여 발광저해를 관찰한 연구가 있었으나, 노출 농도 수준이 지나치게 높아 현실적이지 않았으며 또한 노출에 이용한 이산화탄소의 농도가 재현되기 어려운 실험 조건을 갖고 있었다(이 등, 2006).

본 연구에서는 CO₂ 증가 및 해수산성화가 해양생물에 미치는 영향 규명을 위해 해양성 발광미생물인 *Vibrio fischeri*에 대한 CO₂ 만성독성영향을 평가하였다. 기존 연구에서는 매우 고농도의 CO₂ 주입에 따른 미생물의 지해 영향을 주된 관찰 대상으로 하여왔다. 하지만, 대기 중의 CO₂ 농도 증가나 해양지중저장사업 과정에서 유출과 같은 원인에 의해 해양환경의 pH가 기존 연구에서 연구된 수준(해수의 pH 5~6; 대기 중 CO₂가 10% 이상)까지 도달할 가능성은 거의 없거나 시공간적으로 매우 제한적이다. 따라서 본 연구에서는 실제 현장 조건에 맞는 농도 수준(해수의 pH 7~8; 대기 중 CO₂가 3% 이하)과 노출 시간(최대 24시간) 하에서 발광미생물 개체군 성장에 대한 이산화탄소의 영향을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 개요

발광미생물(*V. fischeri*)의 발광량 및 세포밀도 변화에 대한 이산화탄소의 영향을 알아보기 위해 5개 이산화탄소 농도구배(380(대조구), 1,000, 3,000, 10,000 그리고 30,000 ppm)를 선정하였다. 배양 실험은 가스가 일정속도로 분사되는 가스 챔버(gas chamber)에서 이루어졌고, 배양 용기로는 해수 배지와 발광미생물이 들어 있는 12 well-plate를 이용하였다. 각각의 가스 챔버는 항온수평진탕배양기를 이용하여 20 °C, 180 rpm의 조건에서 일정하게 진탕되도록 하였다. 합성조제 가스는 CO₂ 농도가 380 ppm인 자연 공

기와 CO₂ 농도가 산소, 질소, 아르곤의 합과 비교하여 각각 1,000~30,000 ppm으로 혼합 조제하였으며, 조제 후 각 농도별 가스의 조성비를 다시 측정하여 이산화탄소 농도를 확인하였다. 실험에 이용한 해수배지는 인천시립 수산중요배양연구소에서 공급 받은 자연해수로 만든 멸균배지를 이용하였다.

대기 중 이산화탄소 농도(380 ppm)를 대조구로 설정하고, 이산화탄소가 1,000, 3,000, 10,000, 30,000 ppm인 농도 조건에 각각 발광미생물 *V. fischeri*가 접종된 배지를 넣고 48시간 동안 배양하였다. 배양 시간동안 매 6시간 마다 각 실험구의 발광량 및 세포 밀도(optical density), 그리고 배지의 pH를 측정하였다. 이산화탄소 노출 조건에서 배양 및 측정은 48시간까지 이루어졌으나 배양 시작 후 30시간 경과 시점부터 급격한 발광량의 저하가 관찰되어, 이산화탄소 영향에 대한 분석은 24시간까지의 자료만을 이용하였다.

발광미생물을 이용하여 유해요인에 대해 장기간 노출에 따른 만성적인 영향을 평가한 사례는 많지 않다. 이는 발광미생물을 긴 시간동안 안정적인 조건에서 배양하는 것이 어렵기 때문이다. 또한 미생물 배지는 건조되기 쉽고, 다른 미생물에 의해 오염될 가능성이 있으며, 불필요한 영양 성분이나 비효용액 등을 배지에 넣는 경우 유해 요인의 영향이 뚜렷하게 생물에 전달되지 않는 경우가 많기 때문이다(이, 2002). 따라서 본 연구에서는 24시간 배양에 필요한 최소한의 배지 성분을 제외한 다른 성분들을 모두 배제하였다. 이를 위해 본 실험 전에 다양한 배지의 성분과 농도를 조합하여 24시간 배양실험을 실시하고, 그 결과를 이용하여 최종 배지의 성분과 농도를 결정하였다.

실험 생물의 준비

발광미생물 *V. fischeri*는 해양환경의 모든 영역에서 관찰되며 독립적으로 서식하기도 하지만 특정 발광생물의 공생체로도 서식한다. 이들은 짝짓기, 먹이 유인, 포식자로부터의 자기 보호를 위해 빛을 내도록 에너지를 공급한다. 특히 먹이생물이 부족하고 수압이 높은 심해환경에 이러한 발광미생물의 분포도가 높은 것으로 알려져 있다(Hsieh *et al.*, 2004). 따라서 *V. fischeri*와 같은 발광미생물은 생태학적으로도 매우 중요한 위치를 점하고 있다고 할 수 있으며, 이미 1970년대부터 환경 시료의 생물학적 독성영향을 파악하는 평가기술에 시험생물로 이용되고 있다. 현재까지 주로 활용되는 발광미생물을 이용한 평가기술은 5분에서 30분 동안 시료에 노출한 이후 발광량 변화를 비교하는 급성평가 시험이 대부분이었다. 발광률은 급성적인 스트레스에 대한 지표로서 매우 민감하고 빠른 독성 측정치(end point)로 유용하지만, 미생물의 개체군 성장에 대한 정보는 제공하지 못하는 한계를 갖고 있다. 또한 만성적인 영향, 즉 개체군의 성장을 반영하는 노출 시간을 채용한 시험법은 현재 극히 일부 연구자들에 의해서만 시도되고 있어 보다 많은 연구가 필요하다.

실험에 이용한 발광미생물 *V. fischeri*는 동결건조된 상용의 키트(DVF-201, Neoenbiz Co., Korea)로부터 획득하였고, ISO protocol에 따라 NaCl (20psu)이 포함된 영양배지에서 활성화시킨 후 실험에 이용하였다(ISO, 2007). 발광미생물을 20 °C, 180 rpm으로 OD₆₀₀=1 (optical density at 600 nm wavelength)이 될 때까지 전배양한 후 멸균해수배지가 3 ml 씩 들어 있는 12-well plate에 발광미생물 현탁액과 배지가 1: 1000의 비율이 되도록 희석하

여 주입하였다. 멸균해수배지에는 미생물을 위한 영양분으로 Glycerol, Peptone 그리고 Yeast extract를 각각 3 ml/L, 5 g/L, 그리고 0.5 g/L 농도가 되도록 첨가하였다.

기기 분석 방법

발광량 측정은 Azur사의 Microtox를 이용하여 판매사가 제공하는 프로토콜에 따라서 수행하였다. 시험생물의 건강성과 시험 적합도를 파악하기 위하여 실험 직전에 ISO 프로토콜에서 추천하는 표준독성물질인 3,5-이염화페놀(DCP), 아연(ZnSO₄·7H₂O) 및 6가 크롬(K₂Cr₂O₇)에 대한 독성 시험을 실시하였다. 표준독성물질에 대한 시험결과는 EC20과 EC80 사이에 각각 3.4, 2.2 그리고 18.7 mg/L이 포함되어야 시험적합도를 인정받을 수 있다. 본 연구에서 DCP 3.4 mg/L는 EC42, ZnSO₄·7H₂O 2.2 mg/L는 EC36 그리고 K₂Cr₂O₇ 18.7 mg/L는 EC34로 산정되어, 시험 적합도 인정범위를 벗어나지 않았다(Fig. 1).

다양한 농도구배의 이산화탄소에 노출된 발광미생물은 96-well plate로 옮겨 발광량을 측정하였고, 또한 분광광도계(Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 600 nm파장에서 흡광도(optical density)를 측정하였다. 흡광도 측정결과는 세포밀도에 대한 간접 지표로 이용하였다(Benson, 1994; Cappuccino and Sherman, 1992).

자료의 분석

본 연구에서는 절대발광량(이하 발광량)과 상대발광도(RLU)를 모두 이용하였다. 발광량은 분석기에 제시된 숫자를 이용하였고, 상대발광도는 대조구에 대한 실험구의 발광량 비율로 정의되며, 아래와 같은 계산식을 이용하여 산출하였다.

$$RLU = \frac{\text{실험구의 발광량}}{\text{대조구의 발광량}} \times 100(\%)$$

모든 측정결과는 3회 이상 반복수의 평균만을 이용하였고, 표준편차를 계산하였다. 전체 발광량 및 흡광도의 시간별, 농도별 차이는 분산분석을 이용하여 유의성을 검증하였다. 각 시간대에서 대조구와 유의한 차이를 보이는 실험구를 파악하기 위해서는 분산분석의 다중비교(multiple comparison) 방법인 Tukey's HSD test를 이용하였다. 모든 통계분석에서 유의 수준(α)은 0.05로 설정하였다.

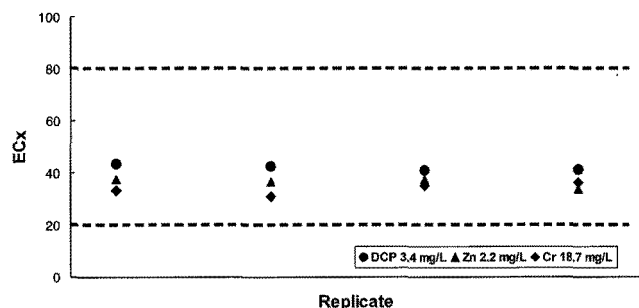


Fig. 1. Reference toxicant(3,5-dichlorophenol, ZnSO₄·7H₂O, K₂Cr₂O₇) toxicity test for health condition of *Vibrio fischeri*. (Dotted lines: test acceptable range recommended by ISO standard protocol).

각 시간대에서 농도와 발광량 또는 흡광도의 관계를 분석하여 무영향농도(NOEC), 최소영향농도(LOEC) 및 반수영향농도(EC50)를 산출하였다. NOEC와 LOEC의 산출을 위해서는 Dunnett's test를 이용하였고, EC50은 Spearmann-Karber 방법을 이용하여 산출하였다(U.S. EPA, 1999).

결 과

발광미생물의 시간에 따른 발광량과 흡광도의 변화

대조구에 대해서 48시간 동안 발광미생물의 발광량과 흡광도 및 배지의 pH를 측정하였다. 배양 시작 후 초기 24시간까지 대조구에서 발광미생물의 발광량과 흡광도는 급격하게 증가하는 경향을 보였다. 하지만 24시간 이후 48시간까지 발광량이 급속하게 감소하였으며, 발광미생물의 개체군 성장을 의미하는 흡광도 역시 배양시작 18시간 이후부터 증가속도가 현저하게 둔화되는 경향을 보였다(Fig. 2). 이는 세포 성장을 위한 조건이 24시간 이후에는 적정하지 않았음을 보여주는 결과로서, 본 논문에서는 24시간까지의 결과만을 이용하여 용존 이산화탄소의 영향을 평가하였다.

CO₂ 농도별 시간에 따른 해수의 pH 변화

발광미생물 *V. fischeri*의 CO₂ 노출시간에 따라 각 농도구마다 pH를 측정하였다. 노출시간과 CO₂ 농도 증가에 따라 해수의 pH가 뚜렷하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 대기 중 이산화탄소 농도와 평형을 이루기 전 상태인 초기 배지의 pH는 모두 8.0-8.1 수준이었으나 CO₂ 노출 6시간 경과 후 배지의 pH는, 각각의 이산화탄소 농도에 따라서 7.8~6.6의 범위로 측정되었다. 하지만 24시

간 경과시점에서는 대조구와 최대 농도 실험구 간의 pH 차이가 다소 줄어드는 경향을 보였다(Table 1).

CO₂ 농도별 시간에 따른 발광미생물의 상대발광량 변화

발광미생물의 발광량은 6시간째까지는 측정 가능한 수준이 되지 못하였으나 12시간 배양 이후에는 발광량 측정이 가능하였으며, 24시간 배양 시점까지 계속 증가하는 특징을 보였다(Fig. 2(a)와 4). 배양 12시간 시점에서 3,000 ppm 이상의 농도 조건에서는 유의한 발광저해가 나타났다. 하지만 이후 18시간 경과시점에서는 10,000과 30,000 ppm, 24시간에는 오직 30,000 ppm의 농도 조건에서만 대조구에 비해 유의한 발광저해가 나타났다(Fig. 3과 4).

상대발광량의 변화는 CO₂ 농도가 3,000 ppm인 해수에서 12시간 배양 시점에서만 대조구와 비교하여 유의한 저해영향이 관찰되었으나, 18시간 이후에는 발광률을 모두 100% 회복하였다(Fig. 3). CO₂ 농도가 10,000 ppm인 실험구에서는 12시간과 18시간 배양 시점에서 상대발광률이 각각 70, 25%였으나, 24시간 노출 시에는 모두 대조구 수준으로 회복하였다. 또한 CO₂ 농도가 30,000 ppm인 경우 12시간 배양 시점에서 90% 이상의 상대적인 저해율을 보였으나, 최종 측정 시에는 대조구의 70% 수준까지 발광량이 회복됨을 알 수 있었다.

CO₂ 농도별 시간에 따른 발광미생물의 흡광도 변화

배양 실험 시작 후 6시간 경과 시점까지는 모든 실험구에서 평균 44%의 흡광도가 증가되었으며, 실험구 간 차이는 관찰되지 않았다. 각 실험구의 흡광도는 6시간에서 18시간 시점까지 급격하게 증가하였다(Fig. 2). 배양 시작 후 12시간과 18시간 그리고 24시간 시점에서 30,000 ppm 실험구는 대조구의 약 75% 내외,

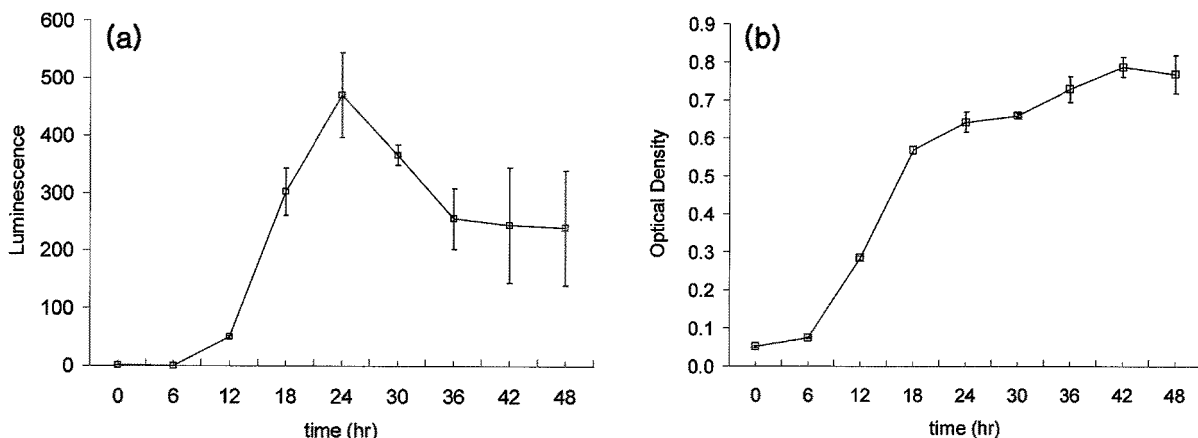


Fig. 2. Luminescence (a) and optical density (b) changing of *Vibrio fischeri* in the control for 48 hours.

Table 1. pH value of culture media in various % concentrations of CO₂ as lapse of time

CO ₂ conc (%)	pH (S.D)									
	0-hr		6-hr		12-hr		18-hr		24-hr	
Control (0.038)	8.1	(0.01)	7.8	(0.00)	7.7	(0.04)	7.7	(0.01)	7.7	(0.04)
0.1	8.1	(0.00)	7.9	(0.00)	7.6	(0.01)	7.6	(0.01)	7.6	(0.01)
0.3	8.0	(0.00)	7.3	(0.02)	7.4	(0.02)	7.4	(0.01)	7.5	(0.01)
1	8.0	(0.00)	7.0	(0.03)	7.1	(0.01)	7.2	(0.03)	7.2	(0.01)
3	8.0	(0.00)	6.6	(0.01)	6.7	(0.01)	6.7	(0.07)	6.8	(0.01)

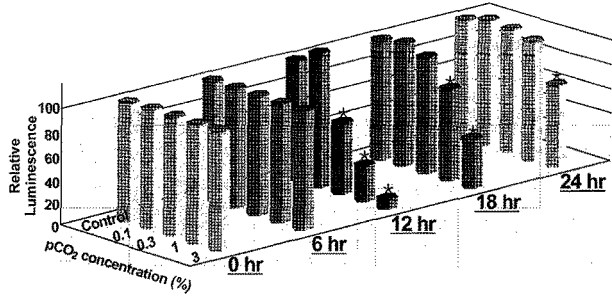


Fig. 3. Comparison of relative luminescence (RLU) among treatments with various dissolved CO₂ concentration along with different incubation time up to 24 hours. Asterisk(*) indicates significantly different with RLU (ANOVA, Tukey-test, n=3, α=0.05).

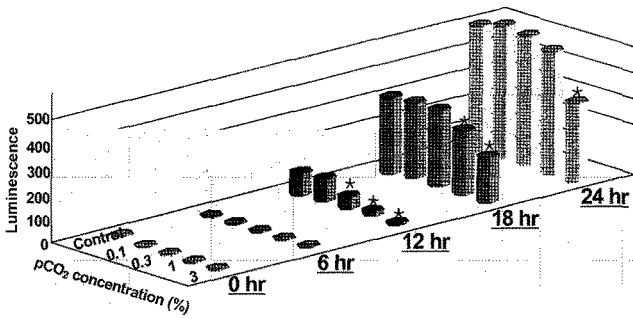


Fig. 4. Comparison of absolute luminescence with a range of dissolved CO₂ concentration along incubation time up to 24 hours. Asterisk(*) indicates significantly different with luminescence (ANOVA, Tukey-test, n=3, α=0.05).

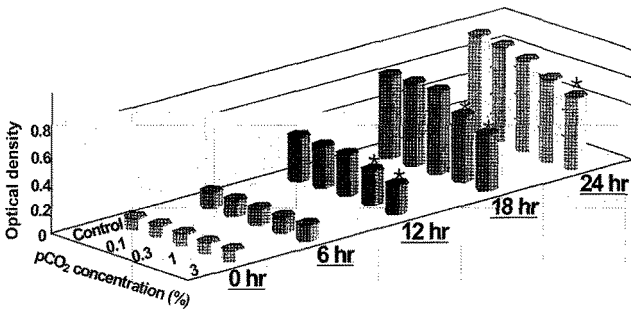


Fig. 5. Comparison of optical density among treatments with various dissolved CO₂ concentration along with different incubation time up to 24 hours. Asterisk(*) indicates significantly different with optical density (ANOVA, Tukey-test, n=3, α=0.05).

10,000 ppm 농도의 실험구는 대조구의 약 90% 내외의 흡광도를 보여 각각 대조구와 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 5). 하지만 1,000과 3,000 ppm 농도 조건에서 흡광도의 변화는 대조구와 유의한 차이를 보이지 않았다.

시간에 따른 pH와 상대발광량의 관계

용존 이산화탄소로 산성화 된 배지의 pH와 발광량을 12, 18, 24 시간별로 각각 비교하였다(Fig. 6). 해수의 pH가 7.4 보다 낮은 실험구에서는 동일한 pH에서 배양 시간별로 50% 이상 차이가 나는 상대발광량을 보였는데, 12시간 배양 후 동일한 pH 수준에서 상

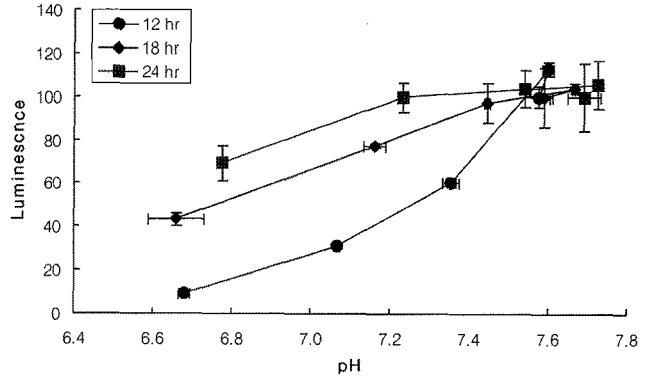


Fig. 6. Relationship between seawater pH and relative luminescence (RLU) of *Vibrio fischeri* after 12, 18 and 24 hrs of incubation time under various dissolved CO₂ concentration.

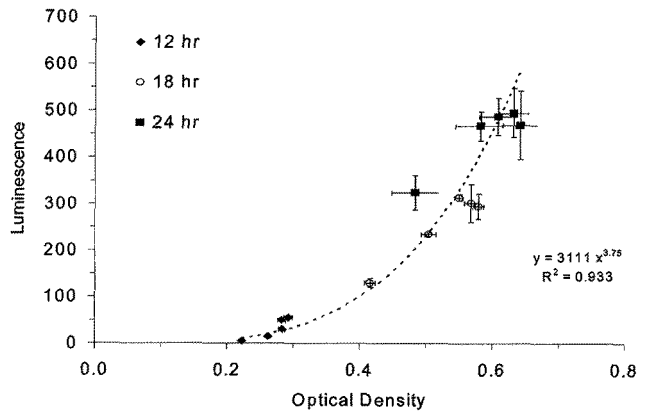


Fig. 7. Relationship between optical density and absolute luminescence of *Vibrio fischeri* after 12, 18 and 24 hrs of incubation time under various dissolved CO₂ concentration.

대발광량이 가장 낮았고, 24시간 배양 후에 동일한 pH 수준에서 상대발광량이 가장 높아, pH와 상대발광량의 관계는 배양 시간이 경과함에 따라 크게 변화하는 것으로 나타났다.

시간에 따른 흡광도(Optical Density)와 절대발광량의 관계

다양한 CO₂ 조건에서 발광미생물을 각각 12, 18, 24시간 배양 한 시점에서 발광미생물의 흡광도와 발광량의 관계는 매우 뚜렷한 상관성을 보였다(Fig. 7). 이와 같이 유의한 관계성은 세포 밀도의 증가가 발광량 증가의 주된 원인중 하나임을 지시하는 결과로 해석할 수 있다.

시간에 따른 CO₂와 pH의 독성 지표

본 연구에서는 용존 이산화탄소와 pH의 반수영향농도(EC50), 무영향농도(NOEC) 그리고 최소영향농도(LOEC)를 각각 배양 12, 18, 24시간 경과 시점에서 산출하였다(Table 2). 그 결과 이산화탄소에 대한 반수영향농도는 배양 12시간에 0.5%로 가장 낮았으나, 18시간에 2.5%로 증가하였고, 24시간에는 50% 이상 영향을 받은 실험구가 없었다. NOEC과 LOEC 역시 시간에 따라서 증가하는 특징을 보였다. 또한, pH의 경우 시간에 따라 EC50, NOEC, LOEC 값이 모두 감소하는 동일한 경향을 보였다.

Table 2. Various toxicological parameters of dissolved CO₂ and pH for the luminescence of *V. fischeri* after 12, 18 and 24 hrs of incubation time under various dissolved CO₂ concentration

	CO ₂ Concentration (%)			pH			
	EC ₅₀	NOEC	LOEC	EC ₅₀	NOEC	LOEC	
12 hr	0.5	0.1	0.3	12 hr	7.2	7.6	7.4
18 hr	2.5	0.3	1.0	18 hr	6.8	7.4	7.2
24 hr	(4.6) ¹	1.0	3.0	24 hr	(6.1) ¹	7.2	6.8

¹EC₅₀ was estimated by extrapolation.

고 찰

해수의 용존 이산화탄소에 의한 생물학적 영향에 대한 연구는 미세조류, 동물플랑크톤, 극피동물, 어류 등 다양한 해양생물을 포함하여 생물의 사망, 성장, 생식, 발생, 수정 등 다양한 생리생화학적인 영향을 평가한 사례들이 있다(이 등, 2006). 하지만 대부분의 연구는 이산화탄소의 해양처리가 상대적으로 깊은 수심에서 이루어진다는 가정 하에 심해생물을 주요 대상으로 하였으나, 최근 해양 표층의 산성화 문제가 부각되면서 연안이나 표층에서 서식하는 생물을 대상으로 생리독성 시험을 수행하는 사례가 늘고 있다.

해양미생물을 대상으로 이산화탄소에 의한 생리저해영향을 평가한 연구는 매우 드물다. 거의 유일한 사례는 일본에서 수행된 연구인데, 이 연구에서는 11종의 해양미생물을 고농도의 CO₂ 배지에서 9시간동안 배양하는 실험을 통해 pH가 5.4-6.6 수준으로 떨어진 배지에서 50%의 성장률 감소를 보이는 것으로 나타났다(Takeuchi *et al.*, 1997). 이 연구에서 *V. fischeri*의 세포수 증가에 대한 반수영향(EC₅₀) 수준은 pH 5.4였다. 이러한 pH 수준은 국내의 기존 연구에서 동일한 *V. fischeri*를 30분간 고농도의 CO₂에 노출한 결과 발광량에 대한 pH의 반수영향수준이 5.2였던 것과 비교하면 유사한 수준이었다(이 등, 2006). 하지만 본 연구에서 12시간 발광량에 대한 pH의 반수영향수준인 7.2와 비교하면 상당히 큰 차이를 보였다. 이는 Takeuchi *et al.*(1997)의 연구에서는 세포의 성장에 대한 영향을 파악한 반면 본 연구에서는 발광량에 대한 영향을 파악하였기 때문이다. 또한 본 연구에서는 흡광도가 세포 밀도에 대한 지표로 이용되었다. 하지만 흡광도는 어떤 경우에도 대조구 대비 50% 이상 감소하지 않아 EC₅₀을 산출할 수 없었다. 하지만 12시간과 24시간 각각의 배양 시점에서, pH와 흡광도의 관계식으로부터 EC₅₀을 외삽하여 산출할 경우 각각 5.5와 5.7이 산출되어 Takeuchi *et al.*(1997)의 결과와 유사함을 알 수 있다(data not shown). 본 연구에서 비록 발광량과 세포 수가 전체 실험구, 전체 배양 시간을 통합한 경우 상당히 밀접한 연관성을 갖고 있었음에도 불구하고, 각 배양 시점에서 개별적으로 영향 수준을 산출한 경우에는 상기와 같은 결과가 도출됨을 알 수 있었다. 이처럼 특정 시점에서 세포 밀도에 대한 영향과 발광량에 대한 영향이 다른 이유는 발광량은 세포 밀도뿐만 아니라 개별 세포의 생리적 스트레스 상태도 함께 반영하기 때문이다. 하지만 배양 시간이 늘어날수록 발광량과 흡광도에 대한 EC₅₀의 차이는 줄어들는데, 24시간 배양 시점에서 pH의 발광량과 흡광도에 대한 EC₅₀은 각각 6.1과 5.7로 12시간 배양 시점에서 각각이 7.2와 5.5였던 것과 비교하면 그 차이가 현격하게 줄었음을 알 수 있다.

발광미생물의 발광량은 세포 밀도와 생리적 스트레스 정도를 함

께 반영한다(Hsieh *et al.*, 2004). 본 연구에서 시간에 따른 발광량의 증가는 세포 수 증가를 반영하지만(Fig. 7), 배양 12시간 시점에서는 농도별 상대발광도는 생리적 스트레스 정도를 반영한 것으로 보인다(Fig. 3). 발광미생물은 배지와 기타 최적 조건에서 체내 생성 대사에너지의 약 10% 정도가 화학에너지로 전환되어 발광하게 된다. 이러한 기작은 세포의 호흡과 관계되어 있으며 외부 스트레스에 의해 대사과정의 변화가 생기면 인과적으로 호흡량 변화를 가져오게 되고 발광량에도 또한 변화를 준다(이, 2002). 하지만 본 연구에서 배양 18시간 이후 고농도 실험구에서 발광량의 회복은 미생물의 적응으로 미생물이 받는 스트레스 정도가 감소하였음을 의미한다.

생물이 고농도의 이산화탄소에 노출된 경우 스트레스를 받거나 성장에 저해를 받는 이유는 용존 이산화탄소가 직접 세포막을 통과하여 세포내로 유입된 다음 세포 내 수소이온을 생성하여 pH를 낮추기 때문이다. 발광미생물의 경우에도 고농도의 이산화탄소에 노출된 직후 세포 내부가 산성화되면서 효소활성저해 등 생화학적 인체 영향이 나타나게 되고 세포내 pH를 다시 회복하기 위한 항상성 기작을 위해 중탄산염 이온교환 등에 에너지를 쓰게 되는데 이로 인해 발광을 위한 추가적인 에너지 소모가 어려워졌을 것으로 추정된다. 노출된 수준이 치명적이지 않은 경우라면, 노출 시간이 어느 정도 지나면서 항상성 기작에 의해 점차 세포내 pH를 회복하기 시작한다. 하지만 원래의 pH로 회복되기까지는 상당한 시간이 소요되며, pH 변화가 급격한 경우에는 손상된 기관과 회복까지의 지연 노출로 인해 세포 내 기관들까지 영구적으로 손상될 수 있다(Seibel and Walsh, 2001). 이러한 회복 능력과 민감성은 각 생물종에 따라서 매우 큰 편차를 보인다.

본 연구에서는 배양 시작 시점에 모두 동일한 배지(pH 8.0-8.1)에 동일한 미생물을 주입하였다. 따라서 고농도 이산화탄소의 실험구에서 배양된 미생물은 초기에 정상적인 조건에서 성장을 시작하여 점차 산성화된 조건에 노출되었다. 배양 시작 후 6시간 경과 시점에서 측정된 pH는 가장 전형적인 이산화탄소 농도와 pH 관계를 나타내었는데, 사전 실험 결과 배지의 pH는 동일한 조건에서 1시간 정도면 대기 중의 이산화탄소 농도와 평형을 이루는 것으로 파악되었다. 사전에 배지를 산성화하여 발광미생물 배양을 시작하지 않은 것은 노출 시작 시점에서 급격한 pH 변화로 인한 급성적인 독성 영향을 배제하기 위한 목적이었다. 해수 분석 결과 12시간 경과 시점 이후부터 대조구와 최고 농도 실험구의 pH는 점차 가까워지는 경향을 보이는데, 이는 배양 시간이 경과하면서 배지 내 발광미생물의 세포밀도가 증가하면서 발광미생물 자체의 pH(일반적으로 미생물의 세포 내 pH는 7.4 내외)가 보다 많은 영향을 미친 결과로 추정된다.

발광미생물에 대한 이산화탄소 농도변화의 영향을 평가하기 위한 48시간 배양과정에서 대조구에서의 발광량과 흡광도의 시간적 변화를 통해 만성 시험의 최적 노출 시간에 대한 중요한 정보를 파악할 수 있었다. 즉, 일정 시간 이상 배양이 진행되면 미생물의 성장이 둔화되거나 생리적인 활성이 크게 감소하게 되는데 그 원인으로서는 영양 성분의 고갈, 다른 미생물에 의한 오염 증가, 사망 개체에 의한 수질 악화, 생리적 분비물에 의한 암모니아 등과 같은 독성 물질의 누적 등을 들 수 있다. 본 연구에서는 매우 적은 양의 미생물을 배지에 접종하여 약 24시간 동안 성공적으로 미생물 개체군의 성장을 유도할 수 있었다. 이러한 조건은 미생물 개체군 성장에 대한 영향을 평가하는 다른 연구에도 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

해양유입 이산화탄소의 생태계에 대한 위해 정도를 파악하기 위해서는 이산화탄소의 생물영향에 대한 기초를 이해하고 다양한 생물종과 생물학적 과정에 대한 영향 수준을 정확하게 파악하는 것이 매우 중요하다. 특히 이산화탄소는 보존성이 있거나 축적성이 있는 물질이 아니고 쉽게 다른 물질로 변환되는 특성을 갖고 있어 이에 대한 독성학적 평가는 매우 어려운 것이 사실이다. 특정 생물의 특정 과정은 매우 낮은 수준의 이산화탄소 농도 증가에 반응하여 저해 영향을 받기도 한다. 예를 들면 산호의 일부 종은 대기 중 이산화탄소 농도가 지금의 두 배 정도만 증가하여도 석회형성을 감소로 성장과 생존에 심각한 위해가 나타날 수 있다고 한다(Gattuso and Buddemeier, 2000). 또한 성계 정자와 알의 수정률은 1,000 ppm 수준의 용존 이산화탄소 농도에 잠시 노출된 이후에 유의한 저해가 관찰되기도 하였다(Kurihara, 2004). 반면에 선충류의 일종은 수 %의 용존 이산화탄소에 노출되어도 아무런 영향을 받지 않았다(Takeuchi *et al.*, 1997). 실제 해저면에는 많은 열수구(hydrothermal vent)가 존재하는데 이 주변에서는 저층에서 이산화탄소가 뿜어져 나오는 것을 쉽게 관찰할 수 있는 만큼, 해수 내 용존 이산화탄소의 농도가 수 %에 이를 정도로 매우 높다. 하지만 열수구 주변에는 매우 다양한 생물들이 군락을 이루며 서식하고 있는데, 이들이 진화적으로 오랫동안 특수한 조건에 적응하여 살아온 생물들이다(Childress and Fisher, 1992).

아직까지 전 세계적으로 이산화탄소 유입에 의한 해수의 화학적 변화, 그리고 그로 인한 생물학적 영향에 대한 연구는 매우 초보적인 수준에 머무르고 있다. 해양미생물은 해양생태계, 나아가 전 지구적 환경에서 간과할 수 없는 중요한 기능을 하고 있다. 해양미생물은 분해자로서의 역할 뿐만 아니라, 많은 물질의 순환 과정에서 핵심적인 고리를 담당하고 있으며, 다양한 다세포 생물과 공생 관계를 이루며 필수적인 생태학적 기능을 담당하고 있다. 발광미생물인 *V. fischeri* 역시 전 세계적으로 분포하면서, 독립적인 개체로도 서식하지만, 또한 수많은 다른 발광생물들과 공생관계를 이루며 살아가는 중요한 해양미생물의 한 종류이다. 이들에 대한 이산화탄소의 저해 영향과 이들 미생물이 갖고 있는 적응 능력에 대한 본 연구의 결과는 향후 보다 심화된 연구 결과들과 함께 해양미생물에 대한 고농도 이산화탄소 유입의 영향을 이해하는 데에 활용될 수 있을 것이다. 또한 용존 이산화탄소 농도 증가에 따른 생물학적 저해 영향에 대한 체계적인 규명은 향후 증가된 이산화탄소 환경에서 해양 생태계가 겪게 될 변화와 피해를 예측하는 데에도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 이규태, 2002. 마이크로톡스 생물검정법의 실험방법 개량과 현장적용에 관한 연구. 서울대학교 대학원 박사학위논문.
- 이정석, 이규태, 김찬국, 박건호, 이종현, 박영규, 강성길, 2006. 해수 중 용존 CO₂ 농도 증가가 해양생물 및 해양생태계에 미치는 국내외 연구사례. 해양환경공학회지, 9(4): 243-252.
- Auerbach, D.L., J.A. Caulfield, E.E. Adams and H.J. Herzog, 1997. Impacts of ocean CO₂ disposal on marine life: A toxicological assessment integrating constant-concentration laboratory assay data with variable-concentration field exposure. Environ. Modeling assessment, 2: 333-343.
- Benson, H.J., Microbiological application, 6th ed., 1994, 87 pp.
- Brewer, P.G., G. Friederich, E.T. Peltzer and F. Orr, 1999. Direct experiments on the ocean disposal of fossil fuel CO₂. Science, 284: 943-945.
- Caldeira, K., R. Berner, E.T. Sundquist, P.N. Pearson, and M.R. Palmer, 1999. Seawater pH and atmospheric carbon dioxide. Science, 286: 2043.
- Caldeira, K. and M.E. Wickett, 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. Nature, 425: 365.
- Cappuccino, J.G. and N. Sherman, 1992. Microbiology-a laboratory manual, 3rd ed., 117 pp.
- Feely, R.A., C.L. Sabine, K. Lee, W. Berelson, J. Keelypas, V.J. Fabry, and F.J. Millero, 2004. Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. Science, 305: 362-366.
- Forster, P., V. Ramaswamy, P. Artaxo, T. Berntsen, R. Betts, D.W. Fahey, J. Haywood, J. Lean, D.C. Lowe, G. Myhre, J. Nganga, R. Prinn, G.M.S. Raga, and R. Van Dorland, 2007. Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. edited by S. Solomon *et al.*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Gattuso, J.P. and R.W. Buddemeier, 2000. Calcification and CO₂. Science, 407: 311-312.
- Childress, J.J. and C.R. Fisher, 1992. The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry and autotrophic symbioses. Oceanography and Marine Biology. Annual Review, 30: 337-441.
- Hsieh, C.Y., M.H. Tsai, D.K. Ryan and O.C. Pancorbo, 2004. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox chronic toxicity test. Sci. Tot. Environ., 320: 37-50.
- IPCC, 2001. Climate Change 2001: Scientific Basis. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 994 pp.
- ISO, 2007. Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test), Part 3: Method using freeze-dried bacteria, ISO 11348-3.
- Kita, L. and T. Ohsumi, 2004. Perspectives on biological research for CO₂ ocean sequestration. J. Oceanogr., 60: 695-703.
- Knutzen, J., 1981. Effects of decreased pH on marine organisms. Mar. Pollut. Bull., 12: 25-29.
- Kurihara, H. and Y. Shirayama, 2004. Effect of increased atmospheric CO₂ on sea urchin early development. Mar. Ecol. Res.

- Ser., **274**: 161–169.
- Orr, J.C., W.J. Fabry and O.A. Aumont, 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Science*, **437**: 681–686.
- Pearson, R.N. and M.R. Palmer, 2000. Atmospheric carbon dioxide concentrations over the past 60 million years. *Science*, **406**: 695–699.
- Prtner, H.O., M. Langenbuch and A. Reipschlagler, 2004. Biological impact of elevated ocean concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *J. Oceanography*, **60**: 705–718.
- Prtner, H.O., 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **373**: 203–217.
- Riebesell, U., I. Zondervan, B. Rost, P.D. Tortell, R.E. Zeebe and F.M.M. Morel, 2000. Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂. *Nature*, **407**: 364–367.
- Sabine, C.L., R.A. Feely and N. Gruber, 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science*, **305**: 367–371.
- Seibel, B.A. and P.J. Walsh, 2001. Potential impacts of CO₂ injection on deep-sea biota. *Science*, **294**: 319–320.
- Takeuchi, K., Y. Fujioka, Y. Kawasaki and Y. Shirayama, 1997. Impacts of high concentration of CO₂ on marine organisms; acidification of CO₂ ocean sequestration, *Energy Convers. Mgmt.*, **38**: Suppl., S337–S341.
- U.S. EPA., 1999. Trimmed Spearman-Kärber estimation of LC50 Values Users' Manual, U. S. EPA, Office of Research and Development, National Exposure Research Laboratory-Ecosystems Research Division, Center for Exposure Assessment Modeling (CEAM), Athens, Georgia.

2009년 12월 15일 원고접수
 2010년 2월 24일 수정본 채택
 담당편집위원: 한정호