KJEE 50(4): 432-440 (2017)
https://doi.org/10.11614/KSL.2017.50.4.432
ISSN: 2288-1115 (Print), 2288-1123 (Online)

Original article

금강 하구 생태계에서 아미노산의 질소 안정동위원소비를 이용한 섭식생물의 영양단계 파악

최현태 · 최보형 · 신경훈*

한양대학교 해양융합공학과

Determination of Trophic Position Using Nitrogen Isotope Ration of Individual Amino Acid in the Geum Estuary. *Choi, Hyuntae* (0000-0001-5647-5046), *Bohyung Choi* (0000-0001-6998-400X) *and Kyung-Hoon Shin** (0000-0002-3169-4274) *(Department of Marine Sciences and Convergent Technology, Hanyang University)*

Abstract Compound specific isotope analysis of amino acids (CSIA-AAs) is being highlighted as an alternative approach for overcoming some restrictions in application of stable isotope analysis of bulk tissue (SIA) for trophic position (TP) estimation. However, this approach has rarely been applied in Korea. The present study determines TP of two Polychaeta (Nephtyidae and Glyceridae) and two fish species (*Platycephalus indicus* and *Lophius litulon*) collected from the Geum River estuary using nitrogen isotope ratio of amino acid and compared with the TP values estimated by SIA. The Polychaeta species, sampled in two sites, showed similar TP between SIA (2.7 and 3.1) and CSIA-AAs (2.6 and 3.1). However, for both fish species, TP values displayed a large difference between SIA (3.1 and 2.3) and CSIA-AAs (3.8 and 3.7). In this study TP values estimated by CSIA-AAs showed more similar to the previously reported gut content analysis of both fishes compared with the results of SIA. Current study suggests the applicability of nitrogen isotope ratio of amino acid to understand coastal ecosystem structure and trophic ecology.

Key words: amino acid, compound-specific stable isotope analysis, trophic position, nitrogen stable isotope, estuary

서 론

수생태계 내에서 생물의 영양단계 정보는 기초생산자로부터 생산된 에너지의 흐름 경로를 파악하는 매우 중요한 연구 주제로써, 먹이망 및 먹이사슬 구조 파악(Kang *et al*., 2007; Doi *et al*., 2009; Gal *et al*., 2012), 오염물질의 생물 축적 과정 파악(Borgå *et al*., 2011; Kim *et al*., 2012) 등에 주로 사용되고 있으며, 특히 섭식자의 영양단계에 따른 차이를 나타내는 질소 안정동위원소비는 생물의 영양단계를 파악하는데 활용도가 매우 높은 것으로 알려져 있다(DeNiro and Epstein, 1981; Minagawa and Wada, 1984). 특히 질소 안정동위원소비는 생물 체내에 축적된 정보를 제공함으로써, 기존의 위 내용물 분석법, 현장 관찰 등에 비해 비교적 긴 시간에 대한 함축적 정보를 획득할 수 있는 장점을 가지고 있다.

그러나 질소 안정동위원소비를 활용한 영양단계 산출은 생태계 내 섭식 생물 중 먹이원과 섭식자의 차이를 이용하여 산출하기 때문에 기초생산자의 질소 안정동위원소비에 대한 정보가 필수적이다. 기초생산자의 질소 안정동위원소비는 광합성에 사용되는 무기질소의 안정동위원소비에 의

Manuscript received 10 November 2017, revised 7 December 2017, revision accepted 16 December 2017
* Corresponding author: Tel: +82-31-400-5536, Fax: +82-31-416-6173, E-mail: shinkh@hanyang.ac.kr

ⓒ The Korean Society of Limnology. All rights reserved.
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

해 결정된다. 예를 들어, 탈질산화 과정에서 나타나는 동위원소 분별작용은 잔여 질산염의 ^{15}N 비율을 증가시키고, 이러한 환경에서 서식하는 기초생산자의 질소 안정동위원소비 또한 무거워진다(Kellman and Marcel, 2003). 반면에, 빈영양 환경에서 질소고정의 증가는 기초생산자의 질소 안정동위원소비를 0‰에 가깝게 변화시킨다(Sherwood *et al*., 2014). 따라서 수생태계 내에서 정확한 기초생산자의 질소 안정동위원소비의 파악은 생물의 영양단계 산출을 위한 정보뿐만 아니라, 수생태계의 질소원의 추적에도 활용될 수 있다(Schell *et al*., 1998; Hong *et al*., 2001; Watanabe *et al*., 2009).

한편, 최근 연구들에서 비교적 긴 시간이 축적된 섭식생물의 질소 안정동위원소비에 비해 기초생산자의 빠른 체내 안정동위원소 회전율(isotopic turnover rate)은 영양단계 산출에 오류를 유발할 수 있는 것으로 알려졌다(Rolff, 2000; Hannides *et al*., 2009). 특히 하천 및 호수, 연안과 같이 다양한 질소원이 존재하는 환경에서는 기초생산자 질소 안정동위원소비의 시간적, 공간적 변화가 크기 때문에 영양단계 산출을 위한 활용에 제약을 받게 된다(Kim *et al*., 2014). 이에 따라 최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위한 다양한 연구 방법의 개발이 진행되고 있다.

1999년 GC-IRMS를 이용한 생물 체내에서 아미노산의 질소 안정동위원소 분석 기법이 보고된 이후(Macko *et al*., 1997), 다양한 연구에서 아미노산의 질소 안정동위원소비를 기존의 bulk tissue의 질소 안정동위원소 분석 기법(Stable Isotope Analysis, SIA)의 대체 연구기법이 될 수 있을 것으로 전망했다. 아미노산은 질소 안정동위원소비의 특성에 따라, 먹이원과 섭식자 간 차이가 거의 없는 source amino acids (source AAs)와 먹이원에 비해 무거운 동위원소비를 나타내는 trophic amino acids (trophic AAs)로 구분되는 것으로 알려져 있으며, 한 섭식생물 체내에서 분석된 trophic AAs와 source AAs의 질소 안정동위원소비를 활용한 영양단계 산출이 가능한 것으로 보고되었다(McCarthy *et al*., 2007; Popp *et al*., 2007; Hannides *et al*., 2009). 아미노산의 질소 안정동위원소비 분석 기법은 단일 섭식자의 체내 Trophic AAs와 Source AAs의 질소 안정동위원소비를 활용함으로써, 기존의 SIA 활용 기법에 비해 먹이원과 섭식자 간 안정동위원소 회전율의 차이에 의한 오차를 줄일 수 있으며, 또한 먹이원의 질소 안정동위원소비에 대한 정보를 요구하지 않음으로써 시료의 채집에 대해서도 큰 장점이 있는 것으로 보고된 바 있다(Chikaraishi *et al*., 2009). 특히 Bowes and Thorp (2015)은 아미노산의 질소 안정동위원소비를 활용한 영양단계(TP_{AAs}) 산출기법이 기존의 SIA 활용에 비해 오차율이 매우 작은 것으로 보고하였으며, 이에 따라 국외에서는 TP_{AAs} 산출이 널리 활용되고 있다. 그럼에도 불구하고, 국내 연구 사례는 Choi *et al*. (2017)에 의해 진행된 연안 해초생태계의 영양단계 산출이 거의 유일하다고 할 수 있다.

본 연구에서는 아미노산의 질소 안정동위원소비를 활용하여 국내 서해안에 위치한 금강 하구역 생태계의 섭식 생물에 대한 영양단계를 산출하고 이를 기존의 연구방법인 SIA를 통해 산출한 영양단계(TP_{bulk})와 비교하였다. 하구역은 육상기원 질소원의 유입이 큰 해역으로써, 기초생산자의 질소 안정동위원소비의 시공간적 변화가 큰 것으로 알려져 있다. 이를 통하여 하구역에 서식하는 생물의 영양단계 차이를 비교하여 CSIA-AAs 기법의 유용성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시료 채집 및 보관

질소 안정동위원소 분석을 위한 시료는 금강 하구역 내 2개 정점(St.1, St.2)에서 2016년 5월에 채집을 실시하였다(Fig. 1). 입자성 유기물(Particulate Organic Matter, POM)은 표층 해수를 채집 후 200 μm mesh로 크기를 구분하여 채집하였으며, 미리 태운 GF/F 여과지(Whatman, 공경 0.7 μm)로 여과 후 사용하였다. 저서동물은 Van veen grab을 이용하여 채집한 퇴적물을 공경 1 mm의 체로 걸러낸 후 골라내었으며, 채집 직후 GF/F 여과지로 여과한 해수에 24시간 동안 청장과정을 거친 후 분석에 사용하였다. 어류 시료는 St. 2에서 통발을 이용해 채집하였으며, 채집 후 근육 부분을 절개하여 분석에 사용하였다. 저서동물 및 어류 시료는 동결 건조 후 막자 사발을 이용하여 균질화 하였으며, 탄소 안정동위원소 분석을 위한 여과지 시료와 저서동물 시료는 각각 12 M의 염산과 1 M의 염산을 이용하여 무기탄소를 제거하였고 어류 시료와 저서동물 시료는 클로로포름과 메탄올 혼합용액(2/1, v/v)을 이용하여 지질을 제거한 후 분석을 실시하였다. 모든 시료에서 bulk tissue의 탄소 및 질소 안정동위원소 분석 시료는 위와 같은 전처리를 실시하지 않은 시료로 분석을 실시하였다.

2. Bulk tissue의 질소 안정동위원소비 분석

POM과 섭식생물의 bulk tissue의 탄소 및 질소 안정동위원소비(각각 $\delta^{13}C_{bulk}$, $\delta^{15}N_{bulk}$)는 EA (Euro vector, GV instrμment, Italy)와 연계된 IRMS (Isoprime 100, Isoprime, UK)로 분석을 실시하였으며, 결과는 δ값으로 나타내었다.

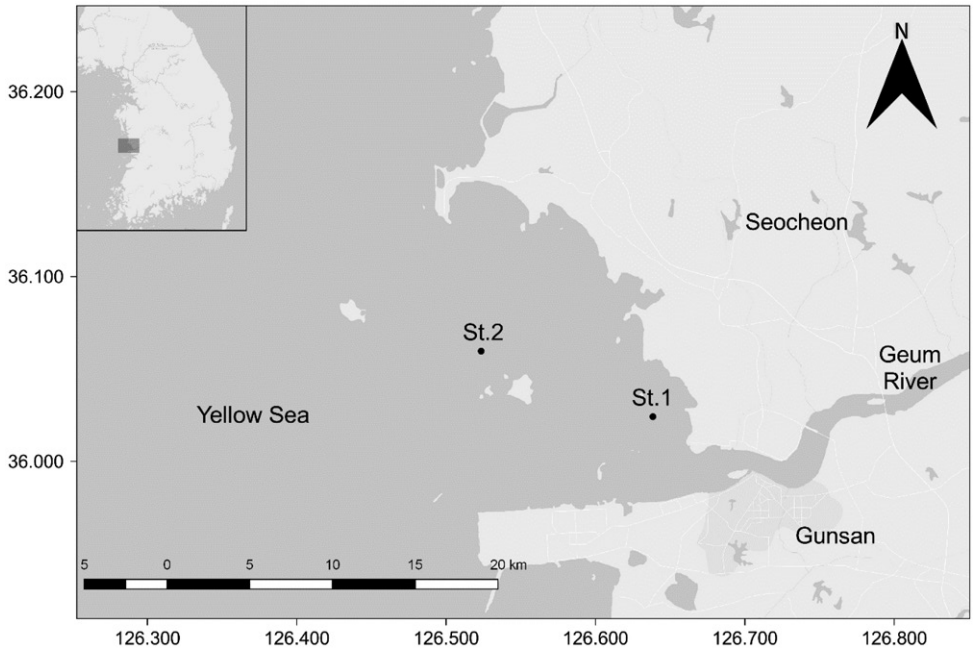

Fig. 1. Sampling sites of this study.

각 정점에서 채집된 생물 시료는 1~5개체에 대한 평균값을 사용하였으며, POM은 3개체에 대한 평균 값을 사용하였다. 분석 중 10개의 시료마다 동위원소비가 알려져 있는 표준물질(탄소: CH-6, IAEA, −10.4±0.03‰ 질소: N-1, IAEA, 0.4±0.2‰)을 분석하여 기기의 오차범위를 확인하였으며, 0.2‰ 이내의 오차범위에서 분석을 실시하였다.

3. 아미노산의 질소 안정동위원소비 분석

섭식생물 시료의 아미노산 질소 안정동위원소비($\delta^{15}N_{AAs}$) 분석을 위한 전처리는 Chikaraishi *et al*. (2007)에 의해 정립된 방법을 이용하여 가수분해 및 유도체화를 실시하였다. 먼저 균질화된 섭식자 시료 5 mg을 12 M HCl을 이용하여 110°C에서 12~24시간 가수분해한 후, 3 : 2 n-hexane/dichloromethane (v/v)를 이용하여 시료로부터 친지성 화합물질을 제거하였다. 이후 아미노산 분자의 휘발성을 높이기 위해 1 : 4 thionyl chloride/2-propanol (v/v)와 1 : 4 pivaloyl chloride/dichloromethane (v/v)에 의한 유도체화 반응을 110°C에서 2시간 동안 순서대로 진행하고, 반응이 끝난 아미노산 분자는 3 : 2 n-hexane/dichloromethane (v/v)를 이용하여 추출하였다.

유도체화를 완료한 아미노산 시료는 가스 크로마토그래피(Agilent 6890N)과 GV instrμment 사의 안정동위원소 질량 분석기(Isoprime)를 연결한 가스 크로마토그래피/안정동위원소 질량 분석기(Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry, GC/C/IRMS)를 이용하여 시료 내의 $\delta^{15}N_{AAs}$를 분석하였다.

GC oven의 승온 조건은 40°C에서 2.5분 동안 유지하고, 15°C/분의 속도로 110°C까지 승온, 3°C min^{-1}의 속도로 150°C까지 승온, 이후 6°C min^{-1}의 속도로 220°C까지 승온 시킨 후 17.3분간 유지하였다. 이동상(He)의 flow rate는 1.2 mL min^{-1}으로 설정하였다. 산화관은 CuO, NiO, Pt wire가 충진된 석영관을 950°C에서 가열하여 사용하였으며, 환원관은 Cu, Rh wire가 충진된 세라믹관을 상온에서 사용하였다. 시료의 $\delta^{15}N_{AAs}$ 분석의 정확성을 확인하기 위해 질소 안정동위원소비가 알려진 8종의 아미노산 표준 물질(alanine, glycine, leucine, norleucine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, phenylalanine)을 시료 분석 4~5회마다 분석하였으며 이를 이용하여 시료의 아미노산 질소 안정동위원소비 값을 보정하였다.

각 아미노산 표준 물질의 질소 안정동위원소비는 시료의 $\delta^{15}N_{AAs}$의 보정 과정에서 0.7‰ 미만의 표준 오차를 나타내었다.

4. 영양단계 산출

본 연구에서 채집된 섭식자 시료의 $\delta^{15}N_{bulk}$를 활용한 영양단계(TP_{bulk})는 POM을 먹이원으로 가정하여 Vander

zanden and Ramussen (1999)에 의해 정의된 식을 사용하여 산출하였다.

$$TP_{bulk} = (\delta^{15}N_{con} - \delta^{15}N_{base}) / TDF + \alpha \quad \text{(eq. 1)}$$

여기서, $\delta^{15}N_{con}$와 $\delta^{15}N_{base}$는 각각 섭식생물과 기저생물의 $\delta^{15}N_{bulk}$를 뜻하며, α는 기저생물의 영양단계를 의미한다. 최근의 연구 결과들에서 기초생산자의 질소 안정동위원소비와 섭식생물 간 안정동위원소 회전율의 차이에 의한 영양단계 산출의 오차를 보정하기 위한 방법으로 기저생물을 1차 섭식자로 활용하는 방안에 대하여 논의된 바 있기 때문에, 본 연구에서는 입자성 유기물을 크기별로 구분하여 $\delta^{15}N_{base}$로 각각 활용하고 차이를 확인하고자 하였다 (Vander zanden and Ramussen, 1999). 따라서, POM (<200 μm)을 $\delta^{15}N_{base}$로 활용한 영양단계 산출식은 α값을 1로 사용하였으며, POM (>200 μm)물을 $\delta^{15}N_{base}$로 활용한 영양단계 산출식은 α값을 2로 가정하였다. 또한 두 식에서 모두 TDF (Trophic Discrimination Factor)는 Minagawa and Wada (1984)가 제안한 값인 3.4‰을 사용하였다.

TP_{AAs} 산출은 trophic AAs와 source AAs으로써 glutamic acid와 phenylalanine의 질소 안정동위원소비를 각각 사용하였으며, 다음과 같은 식을 사용하여 영양 단계를 계산하였다.

$$TP_{AAs} = (\delta^{15}N_{glu} - \delta^{15}N_{Phe} - \beta) / TDF + 1 \quad \text{(eq. 2)}$$

$\delta^{15}N_{glu}$와 $\delta^{15}N_{Phe}$는 각각 glutamic acid와 phenylalanine의 질소 안정동위원소비를 의미한다. β는 기초생산자 내에서 $\delta^{15}N_{glu}$와 $\delta^{15}N_{Phe}$의 차를 뜻하고, TDF는 두 아미노산의 영양단계별 질소 안정동위원소비의 차이를 의미한다. 본 연구에서 β와 TDF값은 Chikaraishi *et al*. (2009)에 의해 정의된 값을 각각 사용하였다 (β: 3.4, TDF: 7.6)

결과 및 고찰

1. Bulk Tissue의 탄소 및 질소 안정동위원소비

TP_{bulk} 산출에는 기저생물의 질소 안정동위원소비 값이 필수적으로 요구된다. 일반적으로 해양생태계의 기저생물은 식물플랑크톤과 같은 기초생산자를 칭한다. 그러나 안정동위원소비 분석을 위한 순수한 식물플랑크톤 채집은 매우 어렵기 때문에, 본 연구에서는 POM의 질소 안정동위원소비를 식물플랑크톤의 질소 안정동위원소비로 활용하였다. 또한 크기가 큰 POM 은 식물플랑크톤보다 동물플랑크톤과 같은 상위 영양단계의 생물이 포함될 가능성이 크기 때문에, 본 연구에서는 200 μm를 기준으로 POM을 크기에 따라 구분하여 채집하여 질소 안정동위원소비 분석을 실시하였다.

탄소 안정동위원소비는 상대적으로 먹이원과 섭식자 간에 차이가 거의 없거나 작다고 알려져 있다 (Deniro and Epstain, 1978) 따라서 본 연구에서는 POM이 섭식자의 먹이원으로써의 적합성을 확인하기 위해 탄소 안정동위원소 분석을 동시에 진행하였다.

두 정점에서 채집된 POM (<200 μm)의 탄소 안정동위원소비는 각각 −22.8±0.2‰과 −21.6±0.2‰로 유사하였으나, 질소 안정동위원소비는 각각 5.3±0.1‰과 7.8±0.2‰로 비교적 큰 차이가 확인되었다. 반면에 POM (>200 μm)의 탄소 및 질소 안정동위원소비는 두 정점 간 유사한 것으로 확인되었으며, 특히 두 정점에서의 질소 안정동위원소비가 각각 11.6±0.4, 11.0±0.1‰로 200 μm 이하의 POM에 비해 무거운 값을 가지고 있는 것으로 나타났다. POM (<200 μm)의 질소 안정동위원소비의 정점별 차이는 각 정점에서 기초생산자가 사용하는 질소원의 안정동위원소비의 차이에 기인한다. 본 연구에서는 입자성 유기물에 포함된 동물플랑크톤 및 식물플랑크톤을 직접 동정하지 않았으나, POM (>200 μm)에서 나타난 무거운 질소 안정동위원소비는 해당 크기 입자성 유기물 내에 상위 영양단계 생물 (eg., 동물플랑크톤)의 생물량이 높기 때문인 것으로 추정하였다.

St.2에서 크기별 POM의 탄소 및 질소 안정동위원소비의 차이는 각각 약 1.7‰, 3.2‰로 기존의 연구들에서 보고된 먹이원과 섭식자 간 탄소 및 질소 안정동위원소비의 차이와 매우 유사한 것으로 나타났으며 (Deniro and Epstain, 1978; DeNiro and Epstein, 1981; Minagawa and Wada, 1984), 이를 통해 POM (>200 μm)을 1차 섭식자의 대표값으로 활용 가능함을 확인하였다. 반면에 St.1에서 크기별 POM의 탄소 및 질소 안정동위원소비의 차이는 St.2에 비해 큰 것으로 확인되었으며, 이는 POM (>200 μm)의 탄소 및 질소 안정동위원소비가 매우 유사함을 고려하면, 금강 하구역 내 기초생산자의 질소원의 공간적 변화가 매우 빠르고 안정동위원소비의 체내 회전율에 있어 식물플랑크톤과 같은 1차생산자과 동물플랑크톤과 같은 1차 섭식자 사이에 다르기 때문일 수 있다. 일반적으로 상위 섭식자로 갈수록 안정동위원소비 체내 반영 시간이 더 긴 것으로 알려져 있기 때문에, 기저생물의 질소 안정동위원소비의 차이에 따라 POM (>200 μm)의 영양단계는 정점에 따라 다른 값을 나타낼 수 있다고 볼 수 있다. St.1과 St.2에서 각각 채집된 상위 섭식생물 중 다모류인 Nephtyidae와 Glyceridae의 탄소 및 질소 안정동위원소비는 큰 차이가 나타나지 않는 것으로 확인되었으나, St.2에서 채집된 두

어류(양태, *Platycephalus indicus*, 황아귀, *Lophius litulon*)는 채집된 정점이 유사함에도 불구하고 탄소 및 질소 안정동위원소비의 차이가 확인되었다(Table 1). 채집된 어류 간 탄소 안정동위원소비의 차이는 각 어류의 먹이원의 차이를 의미한다. 본 연구에서 분석된 저서동물인 다모류의 탄소 안정동위원소비가 POM에 비해 매우 무거운 값을 나타냄에 따라, 황아귀(*L. litulon*)보다 양태(*P. indicus*)의 무거운 탄소 안정동위원소비 또한 양태가 저서성 먹이를 주로 섭식하기 때문에 나타난 결과로 해석할 수 있다. 일반적으로 먹이망 구조에서 섭식자 사이의 질소 안정동위원소비의 차이는 영양단계의 차이로 해석되며, 따라서 본 연구에서 두 어류 간 질소 안정동위원소비 차이 또한 영양단계의 차이로 해석될 수 있다. 그러나 탄소 안정동위원소비를 통한 두 어류 간 먹이원의 차이도 질소 안정동위원소비의 차이를 야기할 수 있다. 본 연구에서 분석된 TP_{AAs}를 통해 정확한 해석이 가능할 것으로 생각된다.

2. 아미노산의 질소 안정동위원소비

본 연구에서 섭식생물의 영양단계를 산출하기 위해 분석한 $\delta^{15}N_{AAs}$를 Table 2에 나타내었다. 아미노산 중 Alanine (Ala), Leucine (Leu), Aspartic acid (Asp), Glutamic acid (Glu)는 Glycine (Gly), Methionine (Met), Phenylanalnine (Phe)에 비하여 모든 종에서 무거운 질소 안정동위원소비를 나타내었으며, 이는 기존의 연구 결과들에서 나타난 $\delta^{15}N_{AAs}$ 경향과 매우 유사하다(McClelland and Montoya, 2003; Chikaraishi *et al*., 2009). 따라서 Ala, Leu, Asp, Glu는 trophic AAs로, Gly, Met, Phe는 Source AAs로 정의할 수 있는 것으로 확인되었다. 특히 대표적인 Source AAs로 알려진 Phe의 질소 안정동위원소비는 다모류인 Nephtyidae와 Glyceridae에서 어류에 비해 무거운 값이 나타났으며, 두 어류 간에는 양태에서 황아귀의 $\delta^{15}N_{Phe}$보다 비교적 무거운 질소 안정동위원소비가 확인되었다(Fig. 2). Source AAs는 먹이원과 섭식자 간의 질소 안정동위원소비가 매우 작기 때문에 먹이원의 질소원 추적에 활용 가능한 것으로 알려져 있다(Vokhshoori and McCarthy, 2014; Lorrain *et al*., 2015). 본 연구에서 나타난 섭식자 간 $\delta^{15}N_{Phe}$ 또한 같은 해역에서 채집된 섭식생물임에도 불구하고 먹이원의 차이가 존재함을 보여준다. 한편 대표적인 Trophic AAs로써 $\delta^{15}N_{glu}$는 섭식생물에 따라 다르고 각 섭식생물의 $\delta^{15}N_{glu}$는 $\delta^{15}N_{bulk}$보다 무거운 것으로 나타났으며(Fig. 2), 이는 기존의 연구결과와 유사한 경향으로 확인되었다.

TP_{AAs}는 두 다모류 간에서는 차이가 나타난 반면, 어류 간 차이는 매우 작은 것으로 확인되었으며, 어류의 영양단계가 다모류에 비해 높은 것으로 나타났다(Table 2). 특히 황아귀(3.7)와 양태(3.8)의 TP_{AAs}는 포식성 어류임을 의미하며 이는 기존의 연구에서 위 내용물 분석을 통해 황아귀와 양태가 어식성 어류임을 보고한 결과와 유사한 것으로 확인되었다(Cha *et al*., 1997; Kwak and Huh, 2002).

3. 영양단계의 비교

본 연구에서 TP_{bulk}와 TP_{AAs}를 비교하고자 하였으며, TP_{bulk}의 경우, 기저생물을 각각 1차 생산자(200 μm 이하의 POM)과 1차 섭식자(200 μm 이상의 POM)을 기저생물로 활용할 경우를 함께 비교하여 Fig. 3에 나타내었다.

TP_{bulk}의 경우, St. 1에서는 기저생물에 따라 Nephtyidae

Table 1. Isotope signature of carbon and nitrogen within bulk tissue of biota samples and size-fractionated particulate organic matter.

Site	Sample type & species	n	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{15}N$ (‰)
St.1	POM (<200 μm)	3	−22.8±0.2	5.3±0.1
	POM (>200 μm)	3	−19.9±0.1	11.6±0.4
	Nephtyidae	1	−14.8	14.0
St.2	POM (<200 μm)	3	−21.6±0.2	7.8±0.2
	POM (>200 μm)	3	−19.9±0.2	11.0±0.1
	Glyceridae	1	−15.3	14.7
	Platycephalus indicus	5	−15.4±0.2	14.8±0.5
	Lophius litulon	3	−17.4±0.5	12.2±1.5

Table. 2. $\delta^{15}N$ of individual amino acids and trophic position calculated from $\delta^{15}N$ of glutamic acid and phenylalanine ($TP_{Glu-Phe}$) within biota samples.

Species	$\delta^{15}N$ (‰)							TP
	Ala	Gly	Leu	Asp	Met	Glu	Phe	
Nephtyidae	21.6	11.1	17.4	18.8	6.2	23.1	7.4	2.6
Glyceridae	25.5	15.6	20.4	17.5	9.9	26.4	7.0	3.1
Platycephalus indicus	28.8	7.0	24.9	20.6	10.9	30.9	6.4	3.8
Lophius litulon	29.2	8.3	22.2	25.0	10.8	29.8	5.8	3.7

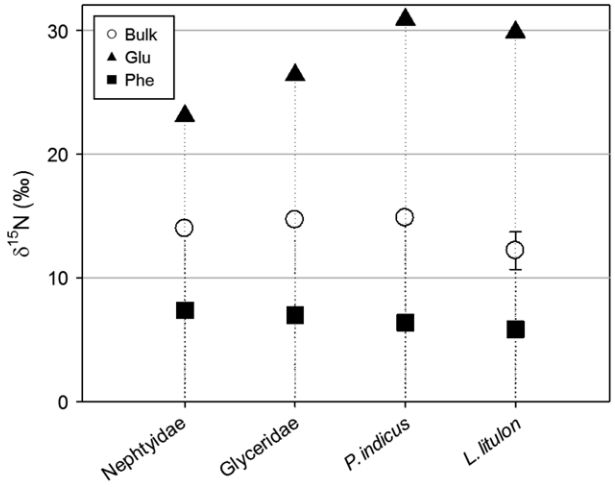

Fig. 2. Nitrogen isotope ratio ($\delta^{15}N$) of bulk tissue, glutamic acid, and phenylalanine in each consumer.

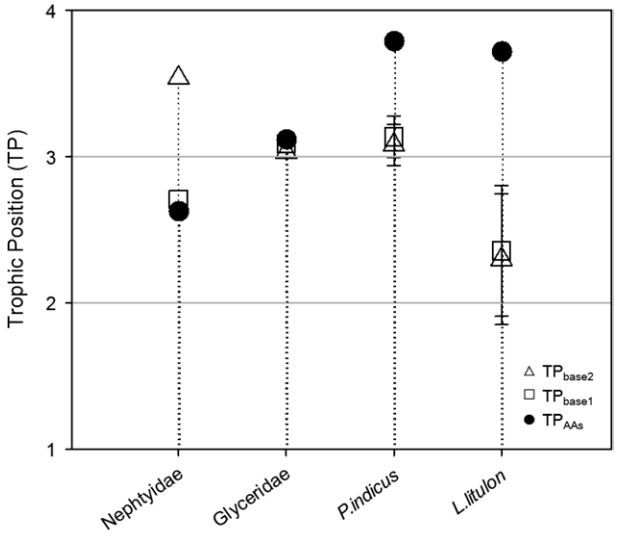

Fig. 3. Trophic position of each organisms estimated by different equations. TP_{base1} and TP_{base2} were calculated by eq 1, and TP_{AAs} was calculated by $\delta^{15}N$ of glutamic acid and phenylalanine (eq. 2). $\delta^{15}N$ of POM (<200 μm) and POM (>200 μm) was used for TP_{base1} and TP_{base2} as basal food sources, respectively.

의 TP_{bulk}가 2.7 (TP_{base2})에서 3.5 (TP_{base1})로 큰 차이가 나타난 반면, St.2의 섭식생물은 기저생물의 변화에 의한 TP_{bulk}의 차이가 매우 작은 것으로 나타났다(Fig. 3) 이는 크기별 POM의 질소 안정동위원소비의 차이가 St.2에서는 TDF와 유사한 반면, St.1은 TDF에 비해 큰 차이로 해석된다. 또한 어식성 어류로 알려져 있는 양태의 TP_{bulk}가 TP_{base1}과 TP_{base2}에서 모두 3.1로서 2차 섭식자에 가까운 것으로 나

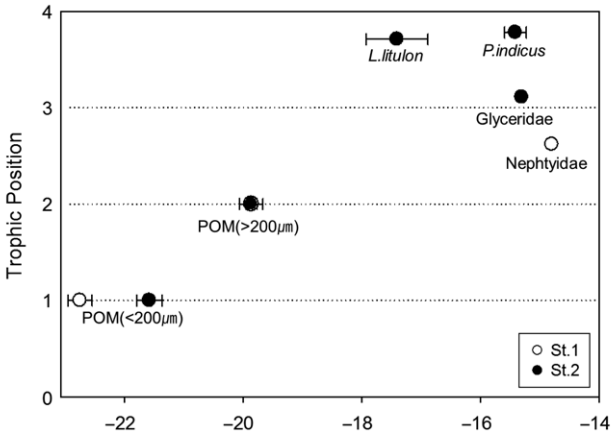

Fig. 4. TP_{AAs} and carbon isotope ratio ($\delta^{13}C$) of each organism. TP of POM (<200 μm) and POM (>200 μm) was regarded and displayed as 1 and 2, respectively.

타난 반면, 황아귀의 경우 각각 2.3, 2.4로 잡식성 생물의 TP_{bulk}와 유사한 것으로 확인되었다. 각 정점에서 채집된 다모류인 Nephtyidae (St.1)와 Glyceridae (St.2)의 TP_{AAs}는 각각 2.6, 3.1로 서로 다른 것으로 확인되었으며, 이는 St.1에서의 TP_{base1}을 제외하고 TP_{bulk}와 유사한 것으로 확인되어, 두 분석 방법 모두 섭식생물의 영양단계 산출에 활용이 가능한 것으로 보여졌다. 그러나 TP_{AAs}는 두 어류에서 각각 3.7, 3.8로 TP_{base1}과 TP_{base2}에 비해 높게 나타났다. 기존의 위 분석법 연구들에서 두 어류가 어식성으로 나타난 것을 고려하면 (Cha *et al*., 1997; Kwak and Huh, 2002) TP_{base1}과 TP_{base2}에 비해 TP_{AAs}가 더 정확한 값을 나타내는 것으로 판단되며, 두 어류의 TP_{bulk} (TP_{base1}, TP_{base2})는 이들의 섭식형태에 비해 낮은 값을 보이는 것으로 확인되었다. 이는 시간적으로 배경 질소 안정동위원소비가 변화하는 하구역과 같은 환경에서 $\delta^{15}N_{bulk}$는 먹이원과 섭식자 간 안정동위원소 회전율의 차이에 기인한 것으로 해석될 수 있다. 예를 들어 O'Reilly and Hecky (2002)는 각 생물군의 서로 다른 안정동위원소 회전율은 서로 다른 시간 동안 축적된 동위원소비를 반영하기 때문에 각 영양단계별 생물군의 질소 안정동위원소비를 활용함에 주의가 필요함을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 St.1과 St.2의 크기별 POM의 탄소 및 질소 안정동위원소비 차이를 통해 정점 간 기저생물 (기초생산자)에 대한 질소원의 차이를 확인하였으며, 또한 각 생물군에 따른 안정동위원소 회전율의 차이에 의한 TP_{bulk}의 변화를 확인하였다 (Fig. 3). 특히, 본 연구 해역과 같은 하구역은 육상 기원 질소원의 유입에 따른 기저생물의 질소 안정동위원소의 변화가 매우 큰 환경으로 잘 알려져 있으며 (McClelland and Valiela, 1998), 동물플랑크

톤과 식물플랑크톤에 비해 어류의 안정동위원소비 회전율이 느린 것으로 기존의 연구에서 보고된 다 있다(Coulter, 1991; O'Reilly and Hecky, 2002). 따라서 금강 하구역에서 채집된 어류의 경우에도 기저생물들로 사용된 크기별 POM에 비해 상대적으로 빠른 안정동위원소비 회전율에 의해 TP_{bulk}가 비교적 낮게 나타난 것으로 생각할 수 있다.

또한, 본 연구에서는 TP_{bulk}를 산출하기 위해 평균적인 TDF 값으로 알려진 3.4‰ (DeNiro and Epstein, 1981; Minagawa and Wada, 1984)을 사용하였지만, 최근의 연구들에서 생물의 종에 따른 TDF의 다양성에 대해 논의가 되고 있으며(Vander zanden and Rasmussen, 2001; Post, 2002; Dubois *et al*., 2007), 따라서 TP_{bulk}를 산출하기 위해서는 해당 생물에 대한 TDF를 활용하는 것이 가장 이상적이다. 그러나 현재까지 본 연구에 활용된 어류(*P. indicus*, *L. litulon*)들의 TDF에 대한 보고가 없기 때문에, 정확한 TP_{bulk}를 산출하는 것은 매우 어려운 실정이다.

4. 먹이망 구조

본 연구 정점에서 TP_{AAs}와 $\delta^{13}C_{bulk}$를 이용하여 먹이망 구조를 나타내고자 하였으며, 이를 위해 아미노산의 질소 안정동위원소비 분석이 실시되지 않은 크기별 POM의 영양단계는 각각 1 (200 μm 이하)과 2 (200 μm 이상)로 가정하여 도시하였다(Fig. 4). 부유성 어류를 주로 섭식할 것으로 추측되는 *L. litulon*은 해당 정점의 POM들과 탄소 안정동위원소의 낮은 분별 작용을 가지고 일직선상에 위치하기 때문에, POM들과 같은 먹이망에 속해 있는 것으로 확인된다. 반면 *P. indicus*, Glyceridae, Nephtyidae는 저서성 먹이원을 섭식하는 것으로 추측되어, 해당 정점의 POM들과 다른 먹이망에 속해 있는 것으로 생각할 수 있다. 본 연구에서 사용된 시료가 적음에도 불구하고, 채집된 생물들의 TP_{AAs}와 $\delta^{13}C_{bulk}$를 이용하여 금강 하구역 연안 생태계의 먹이망 구조를 일부 파악할 수 있었다. 기존의 $\delta^{15}N_{bulk}$로는 영양 단계에 대한 정보와 먹이망 구조가 쉽게 파악되기 어려웠던 점을 고려하였을 때, CSIA-AAs는 상당히 높은 활용 가능성을 가진 분석 기법임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 연안 섭식생물들의 영양단계 산출에서 TP_{AAs}를 활용하는 것이 기존의 TP_{bulk}에 비해 더 정확하다는 것을 확인하였다. 따라서 추후 CSIA-AAs를 적용하여 다양한 해양 생물들을 대상으로 보다 정확한 국내 연안 서식생물의 영양단계 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 연구는 먹이망 구조 파악, 생태계 기능 해석, 오염물질의 생물전달 과정 등의 연구에 활용될 수 있을 것으로 전망된다.

적 요

CSIA-AAs은 섭식 생물의 영양단계 산출 연구에서 SIA를 대체할 수 있는 연구 방법으로 크게 주목 받고 있지만, 최근까지 국내 연구 사례는 매우 부족하다. 본 연구에서는 금강 하구역에서 채집된 두 종의 다모류(Nephtyidae, Glyceridae)와 두 종의 어류(*Platycephalus indicus*, *Lophius litulon*)에 대한 영양단계를 $\delta^{15}N_{AAs}$를 통해 산출하고 이를 $\delta^{15}N_{bulk}$를 이용해 산출한 영양단계와 비교하고자 하였다. 두 정점에서 채집된 다모류의 TP_{bulk}는 각각 2.6과 3.1로 다른 것으로 확인되었으며, 두 산출기법(TP_{base2}, TP_{base1})에 따른 차이는 작은 것으로 나타났다. 반면에, 본 연구에서 분석된 두 어종에 대한 TP_{bulk}는 각각 3.1과 2.3으로 어종 간 차이가 확인되었으나, TP_{AAs}는 3.8과 3.7로 어종 간 차이가 매우 작고 상대적으로 높은 영양단계가 확인되었다. 이는 두 어종이 어식성 어류임을 고려할 때 TP_{AAs}가 보다 더 신뢰할 수 있는 기법이라는 것을 확인할 수 있었으며, 본 연구는 한국 연안 생태계에서 CSIA-AAs의 활용 필요성과 그 유용성을 보여주고 있다.

사 사

본 연구는 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구입니다(아미노산 질소 안정동위원소비를 이용한 해양 유입 질소 기원 및 거동 연구).

REFERENCES

Borgå, K., K. Kidd, D. Muirm O. Berglund, J.M. Conder, F. Gobas, J. Kucklick, O. Malm and D.E. Powell. 2012. Trophic magnification factors: considerations of ecology, ecosystems, and study design. *Integrated Environmental Assessment and Management* **8**(1): 64-84.

Bowes, R.E. and J.H. Thorp. 2015. Consequences of employing amino acid vs. bulk-tissue, stable isotope analysis: a laboratory trophic position experiment. *Ecosphere* **6**(1): 1-12.

Cha, B.Y., B.Q. Hong, H.S. Jo, H.S. Sohn, Y.C. Park, W.S. Yang and O.I. Choi. 1997. Food habit of the yellow goosefish, *Lophiuslitulon*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **30**(1): 95-104.

Chikaraishi, Y., N.O. Ogawa, Y. Kashiyama, Y. Takano, H. Suga, A. Tomitani, H. Miyashita, H. Kitazato and N. Ohkouchi. 2009. Determination of aquatic food-web structure based

on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography: Methods* **7**(11): 740-750.

Chikaraishi, Y., Y. Kashiyama, N.O. Ogawa, H. Kitazato and N. Ohkouchi. 2007. Metabolic control of nitrogen isotope composition of amino acids in macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies. *Marine Ecology Progress Series* **342**: 85-90.

Choi, B., S.Y. Ha., J.S. Lee., Y. Chikaraishi, N. Ohkouchi and K.H. Shin. 2017. Trophic interaction among organisms in a seagrass meadow ecosystem as revealed by bulk $\delta^{13}C$ and amino acid $\delta^{15}N$ analyses. *Limnology and Oceanography* **62**(4): 1426-1435.

Coulter, G.W. 1991. Pelagic fish. p. 111-138. *In*: Lake Tanganyika and its life (Coulter, G.W., ed.). Oxford University Press.

DeNiro, M.J. and S. Epstein. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42**: 495-506.

DeNiro, M.J. and S. Epstein. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **45**(3): 341-351.

Doi, H., K.H. Chang, T. Ando, I. Ninomiya, H. Imai and S.I. Nakano. 2009. Resource availability and ecosystem size predict food-chain length in pond ecosystems. *Oikos* **118**(1): 138-144.

Dubois, S., B. Jean-Louis, B. Bertrand and S. Lefebvre. 2007. Isotope trophic-step fractionation of suspension-feeding species: implications for food partitioning in coastal ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **351**(1): 121-128.

Gal, J.K., M.S. Kim, Y.J. Lee, J. Seo and K.H. Shin. 2012. Foodweb of aquatic ecosystem within the Tamjin River through the determination of carbon and nitrogen stable isotope ratios. *Korean Journal of Limnology* **45**: 242-251.

Hannides, C.C., B.N. Popp, M.R. Landry and B.S. Graham. 2009. Quantification of zooplankton trophic position in the North Pacific Subtropical Gyre using stable nitrogen isotopes. *Limnology and Oceanography* **54**(1): 50-61.

Hong, Y.J., S.K. Jin and S.G. Hong. 2001. Identification of the sources of nitrate using stable isotope mass ratio in rural watersheds. *Journal of the Korean Society of Agricultural Engineers* **43**: 120-128.

Kang, C.K., E.J. Choy, H.S. Song, H.J. Park, I.S. Soe, Q. Jo and K.S. Lee. 2007. Isotopic determination of food sources of benthic invertebtates in two different macroalgal habitats in the Korean coasts. 「*The Sea*」 *Journal of the Korean Society of Oceanography* **12**: 380-389.

Kellman, L.M. and C. Hillaire-Marcel. 2003. Evaluation of nitrogen isotopes as indicators of nitrate contamination sources in an agricultural watershed. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **95**(1): 87-102.

Kim, E., H. Kim, K.H. Shin, M.S. Kim, S.R. Kundu, B.G. Lee and S. Han. 2012. Biomagnification of mercury through the benthic food webs of a temperate estuary: Masan bay, Korea. *Environmental Toxicology* **31**(6): 1254-1263.

Kim, M.S., J.M. Kim, J.Y. Hwang, B.K. Kim, H.S. Cho, S.J. Youn, S.Y. Hong, O.S. Kwon and W.S. Lee. 2014. Determination of the origin of particulate organic matter at the lake Paldang using stable isotope ratio ($\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$). Korean Journal of Ecology and Environment **47**(2): 127-134.

Kwak, S.N. and S.H. Huh. 2002. Feeding habits of Platycephalusindicus in eelgrass (*Zostera marina*) beds in Kwangyang Bay. *Korean Journal of Ichthyology* **14**(1): 29-35.

Lorrain, A., B.S. Graham, B.N. Popp, V. Allain, R.J. Olson, B.P. Hunt, M. Potier, B. Fry, F. Galván-Magaña, C.E.R. Menkes and S. Kaehler. 2015. Nitrogen isotopic baselines and implications for estimating foraging habitat and trophic position of yellowfin tuna in the Indian and Pacific Oceans. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **113**: 188-198.

Macko, S.A., M.E. Uhle, M.H. Engel and V. Andrusevich. 1997. Stable nitrogen isotope analysis of amino acid enantiomers by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **69**(5): 926-929.

McCarthy, M.D., R. Benner, C. Lee and M.L. Fogel. 2007. Amino acid nitrogen isotopic fractionation patterns as indicators of heterotrophy in plankton, particulate, and dissolved organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **71**(19): 4727-4744.

McClelland, J.W. and I. Valiela. 1998. Liking nitrogen in estuarine producers to land-derived sources. *Limnology and Oceanography* **43**(4): 577-585.

McClelland, J.W., C.M. Holl and J.P. Montoya. 2003. Relating low $\delta^{15}N$ values of zooplankton to N 2-fixation in the tropical North Atlantic: insights provided by stable isotope ratios of amino acids. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **50**(7): 849-861.

Minagawa, M. and E. Wada. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}N$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**(5): 1135-1140.

O'Reilly, C.M. and R.E. Hecky. 2002. Interpreting stable isotopes in food webs: Recognizing the role of time averaging at different trophic levels. *Limnology and Oceanography* **47**(1): 306-309.

Popp, B.N., B.S. Graham, R.J. Olson, C.C. Hannides, M.J. Lott, G.A. LópezIbarra, F. Galvan-Magana and B. Fry. 2007. Insight into the trophic ecology of yellowfin tuna, *Thunnusalbacares*, from compound-specific nitrogen isotope analysis of proteinaceous amino acids. *Terrestrial Ecology* **1**: 173-190.

Post, D.M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* **83**(3): 703-718.

Rolff, C. 2000. Seasonal variation in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ of size-fractionated plankton at a coastal station in the northern Baltic proper. *Marine Ecology Progress Series* **203**: 47-65.

Schell, D.M., B.A. Barnett and K.A. Vinette. 1998. Carbon and nitrogen isotope ratios in zooplankton of the Bering, Chukchi and Beaufort seas. *Marine Ecology Progress Series* **162**: 11-23.

Sherwood, O.A., T.P. Guilderson, F.C. Batista, J.T. Schiff, M.D. McCarthy, 2014. Increasing subtropical North Pacific Ocean nitrogen fixation since the Little Ice Age. *Nature* **505**(7481): 78-81.

Vander Zanden, M. and J.B. Rasmussen. 1999. Primary consumer $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* **80**(4): 1395-1404.

Vander Zanden, M. and J.B. Rasmussen. 2001. Variation in $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ trophic fractionation: implications for aquatic food web studies. *Limnology and Oceanography* **46**(8): 2061-2066.

Vokhshoori, N.L. and M.D. McCarthy. 2014. Compound-specific $\delta^{15}N$ amino acid measurements in littoral mussels in the California upwelling ecosystem: a new approach to generating baseline $\delta^{15}N$ isoscapes for coastal ecosystems. *PloS One* **9**(6): e98087.

Watanabe, S., M. Kodama and M. Fukuda. 2009. Nitrogen stable isotope ratio in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*, reflects eutrophication levels in tidal flats. *Marine Pollution Bulletin* **58**(10): 1447-1453.