JOURNAL OF AQUACULTURE VOL. 1. (NO. 2) : 135~143 ; (1988) 韓國養殖學會誌 1(2) : 135~143 ; (1988)

Rotifer (*Brachionus plicatilis*) 飼育을 위한 *Chlorella* 培養

I. 適種 *Chlorella*의 選擇

許 聖 範 · 金 炫 浚

釜山水産大學 養殖學科

Chlorella cultivation for mass culture of rotifer, *Brachionus plicatilis* I. Selection of suitable *Chlorella* species

Sung Bum HUR and Hyun-Jun KIM

Department of Aquaculture, National Fisheries
University of Pusan, Nam-gu, Pusan 608－737, Korea

ABSTRACT

Rotifers became an important live food for fish larvae, especially for marine fishes, and *Chlorella* has been used as a very useful food for the mass culture of rotifer. However, not many tests for suitable *Chorella* species for the mass culture of rotifer were done and many of *Chlorella* sp. have been used without consideration of species for this purpose. Therefore, two species of marine *Chlorella* and four species of freshwater *Chlorella* were tested to select suitable species for the mass culture of a rotifer, *Brachionus plicatilis*. These *Chlorella* species were cultured in five different culture media ; f/2, Erdschreiber, Complesal for marine species and S · K, Wai and Complesal for freshwater species. Proximate analyses were done to see the protein, lipid and ash contents of a marine species, *C. ellipsoidea* and a freshwater species, *C. vulgaris*. Amino acids content of these species were also tested.

C. ellipsoidea and *C. vulgaris* showed better growth than the other species. For marine *Chlorella* sp., f/2 media was better than Erdschreiber and Complesal. But for the freshwater species, Complesal showed the best result in growth. By the proximate analyses, *C. ellipsoidea* has higher lipid contents whereas *C. vulgaris* has higher protein and ash. In the analysis of amino acid of *Chorella*, it was remarkable that freshwater *Chlorella, C. vulgaris*, has high content of NH_3 comparing with marine *Chlorella, C, ellipsoidea*.

According to the above results, *C. vulgaris* seems have higher possibilities for mass culture of rotifer but further studies are needed.

緖 論

有用 海産魚類및 갑각류 養殖은 우리나라뿐 아니라 세계적으로 계속 증가 趨勢에 있다. 이들 생물을 양식할 경우 孵化後 초기 성장단계에 공급할 먹이 생물의 確保는 가장 중요한 문제중의 하나이다. 부화직후에는 입이 작고 또 豊富한 영양가치가 있는 먹이생물을 필요로 하므로 현재로는 크기가 작고 대량배양이 容易한 rotifer (*Brachionus plicatilis*)를 초기 동물먹이생물로 가장 많이 사용하고 있다.

이 논문은 1987년도 재단법인 동원학술진흥 연구재단의 학술연구비지원에 의해 연구되었음

Rotifer 종류의 사육을 위한 먹이생물로는 微少한 식물성 부유생물, 효모, 박테리아, *Euglena,* 섬모충류등이 있다.

Bogdan et al(1980), Gibert and Starkweather(1977), Gilbert(1978) 등은 *Rhodotorula glutinis*, Seikai et al(1980)은 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 효모종류를 사용하여 *Brachionus plicatilis*를 飼育實驗한 바 있다. Gilbert and Wurdak(1978), Gilbert and Litton(1978), Snell and King(1977)등은 섬모충류인 *Paramecium aurelia*를 먹이로 이용한 예도 있다. 또 Gilbert and Starkweather(1977), Gilbert(1978)등의 연구결과는 *Euglena gracilis*와 bacteria 인 *Aerobacter aerogens*도 rotifer의 먹이생물로 사용 가능한 것으로 보고되어 있다. 그러나 이와같은 rotifer의 먹이생물은 小規模 실험실 사육의 경우에는 가능하나 대규모배양에는 적합하지 않다. 따라서 대규모 배양이 容易한 *Chlorella* 를 rotifer먹이로 가장 많이 사용해오고 있다. *Chlorella* 가 주로 이용되는 이유는 성장이 빠르고 배양이 쉽다는 이유이외에도 廣鹽性이고 단백질및 불포화 지방산이 풍부하기 때문으로 알려져 있다. *Chlorella*를 이용하여 해산어류및 갑각류 종묘생산시 rotifer를 대량 사육한 실험결과는 Fontain and Revera(1980), Yamasaki et al(1984), Yamasaki and Hirata(1986), James and Abu－Rezeq(1988)등이 있다. 그러나 이들의 실험에서는 어떤 종류의 *Chlorella* 인지가 명시되어 있지않다. 이와같이 *Chlorella*는 rotifer먹이생물로 많이 이용되긴하나 어떤 종류의 *Chlorella*가 가장 적합한 먹이생물인가에 대해서는 아직 충분히 비교검토된 바 없다. 따라서 본 실험에서는 rotifer의 대량배양을 위한 適種 *Chlorella*의 選擇을 위하여 담수산 *Chlorella* 4種과 해수산 *Chlorella* 2種을 대상으로 일정한 조건에서 培養液에 따른 成長을 비교조사하였다. 한편 담수산 *Chlorella* 1種과 해수산 *Chlorella* 1種 그리고 성장이 가장 좋았던 배양액을 선택하여 大量培養한후 이들 *Chlorella*종류가 함유하고 있는 영양가를 비교분석하였다.

材料 및 方法

실험에 사용한 *Chlorella*종류는 Texas 대학교 (Austin)에서 분양받은 2種의 해수산 *Chlorella* ; *C. ellipsoidea*(UTEX 247), *C. stigmatophora*(UTEX 993)와 4種의 담수산*Chlorella* ; *C. variegata*(UTEX 255), *C. pyrenoidosa*(UTEX 26), *C. protothecoides*(UTEX 25), *C. vulgaris*(UTEX 259)를 사용하였다. 배양액은 해수산 *Chlorella*에는 f/2 (Guillard and Ryther, 1962) 培地, Erdschreiber (1927) 培地 및 액체비료 Complesal (중앙농자재, 1,000배희석사용)을 사용하였고 培地의 염분은 30‰로 맞추었다. 담수산 *Chlorella*에는 S.K. (Sorokin-Krauss) 培地(田官 · 渡辺, 1965), Wai培地 (田官, 渡辺, 1965) 와 해수산*Chlorella*에서 사용한 Complesal을 사용하였고 培地의 염분은 0‰이었다. 배양액은 250㎖ 삼각flask에 넣어 솜마개후 121℃, 15 lb/in^{2}에서 30분간 滅菌하여 사용하였고 Complesal은 滅菌할 경우 침전물이 많이 생기므로 해수와 증류수를 각각 멸균후 紫外線室에 넣어둔 Complesal을 주입하여 사용하였다. 각 배양액의 조성은 Table 1과 같다. 6種의 *Chlorella*의 3가지의 培地에 따른 성장실험의 배양조건은 온도 20℃, 조도 3,500lux, LD cycle 24 : 0으로 하였으며 접종밀도는 1×10^5cells/㎖로 하였다.

Chlorella 세포의 계수는 배양중 매일 1회 0.1㎜깊이의 hemocytometer를 사용하였고 specific growth rate는 Guillard의 방법(Stein, 1973)을 적용하였다. 한편 20ℓ carboy병에 *Chlorella*를 배양하여 세포를 여과한후 amino acid analyser model 4150－alpha(L.K.B.)를 사용하여 *Chlorella* 가 함유한 營養鹽의 일반조성과 17종류의 amino acid을 분석비교하였다.

Tabel 1. Chemical composition of the media for the cultivation of *Chlorella*

f/2 (Guillard and Ryther, 1962) medium

$NaNO_3$	150 mg	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	60 mg
Na_2HPO_4	8.69 mg	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.012 mg
Ferric EDTA	10 mg	B_{12}	1.0 ug
$MnCl_2$	0.22 mg	Biotin	1.0 ug
$CoCl_2$	0.11 mg	Thiamine·HCl	0.2 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0196 mg	Sea Water	1000 ml
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.044 mg		

Erdschreiber (1927) medium

$NaNO_3$	100 mg	Soil extract	50 ml
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	20 mg	Sea Water	1000 ml

S.K. (Sorokin-Krauss) medium(田宮·渡辺, 1965)

KNO_3	1.25 g	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.0144 g
KH_2PO_4	1.25 g	MoO_3	0.0071 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.00 g	$CuSo_4 \cdot 5H_2O$	0.0157 g
$CaCl_2$	0.0835 g	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.0049 g
H_3BO_3	0.1142 g	EDTA	0.5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0498 g	Distilled Water	1000 ml
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0882 g		

The pH of the medium is 6.8.

Wai medium(田宮·渡辺, 1965)

KNO_3	1.5 g	Wai solution*	1.0 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5 g	Distilled Water	1000 ml
KH_2PO_4	1.2 g	pH = 5.5	

*Wai solution

Ca	30 g	Mo	4 g	B	20 g
Cu	4 g	Zn	20 g	Co	1 g
Fe	10 g	Mn	4 g	D.W.	1000 ml
				36N H_2SO_4	2 drops

Complesal(중앙농자재, 1,000배 희석 사용)

Total Nitrogen	10 %	Soluble Magnesium	0.3 %
Soluble Phosphate	4 %	Soluble Copper	0.02 %
Soluble Potassium	6 %	Soluble Iron	0.05 %
Soluble Boron	0.05 %	Soluble Molybdenum	0.01 %
Soluble Manganese	0.1 %		

結果 및 考察

1. 배양액에 따른 *Chlorella*의 成長

海水産 *Chlorella*에서는 *C. ellipsoidea*가 f/2, Erdschreiber배지에서 접종후 1일째부터 세포의 增加가 시작하여 접종후 10일째 3×10^6cells/㎖까지 성장하였다. Complesal에서의 성장은 f/2및 Erdschreiber배지에 비해 低調하였고 접종후 10일째 5×10^5cells/㎖까지 성장하였다.

한편 *C. stigmatophora*는 f/2, Erdschreiber배지에서 매우 느린 成長을 보여 접종후 4일째 세포의 增加가 시작되었다. 그러나 Complesal에 있어서는 접종후 세포의 減少를 나타내었다. *C. ellipsoidea*의 경우 Erdschreiber배지에서 對數成長期인 접종후 4일부터 8일까지의 specific growth rate는 0.78이었고 *C. stigmatophora*의 Erdschreiber배지에서는 접종후 4일부터 6일까지 0.79였다. 이는 f/2배지에서의 *C. ellipsoidea*의 접종후 3일부터 8일까지의 성장율 0.62보다 높았다. 그러나 f/2배지에서의 *C. ellipsoidea*의 성장은 Erdschreiber배지에서의 *C. ellipsoidea*및 *C. stigmatophora*의 성장에 비해 접종후 3일부터 8일까지 긴 시간동안 對數成長期를 보였고 ㎖당 세포의 數도 가장 높았다. 따라서 해수산 *Chlorella*에 있어서는 f/2배지에서의 *C. ellipsoidea*가 가장 높은 성장을 나타낸 것으로 판단된다.

담수산*Chlorella*에서는 *C. vulgaris*와 *C. variegata*가 *C. pyrenoidosa*와 *C. protothecoides*에 비해 全般的으로 좋은 성장을 보였다. *C. pyrenoidosa*는 Complesal에서 접종후 10일째 1.5×10^6cells/㎖, *C. vulgaris*는 Complesal에서 접종후 10일째 2.3×10^7cells/㎖, *C. variegata*는 S·K 배지에서 접종후 10일째 6.8×10^6 cells/㎖, *C. protothecoides*는 S·K배지에서 접종후 7일째 1.4×10^6cells/㎖로 가장 높은 성장을 나타내었다. 담수산 *Chlorella* 에 있어서는 *C. vulgaris*가 Complesal에서 최고의 성장을 나타내었다. Specific growth rate에 있어서도 *C. vulgaris*가 Complesal에서 접종후 1일부터 6일까지 1.31로 다른 種, 다른 배양액보다 월등한 成長을 보였다(Fig.1, Table 2).

이와같이 2種의 해수산 *Chlorella*와 4種의 담수산 *Chlorella*의 성장조사 결과, rotifer사육을 위한 量的側面에서의 적합한 *Chlorella*의 종류는 해수산인 경우 *C. ellipsoidea,* 담수산인 경우 *C. vulgaris* 였으며 이때의 가장 적합한 培地는 각각 f/2와 액체비료인 Complesal배지로 나타났다. 일반적으로 rotifer를 사육하는데는 해수산 *Chlorella*를 사용하고 있다. 그러나 *C. vulgaris*의 specific growth rate가 *C. ellipsoidea*보다 1.68배나 높고 배지가 시중에서 값싸게 구입할 수 있고 취급이 편리한 액체비료라는 점에서보면 담수산인 *C. vulgaris*도 rotifer사육을 위한 量的側面에서의 적당한 種이 될수 있을 것으로 판단된다.

2. 營養鹽含有量 調査

앞에서 6종류의 *Chlorella*성장을 비교한 결과 담수산은 *C. vulgaris*가 해수산은 *C. ellipsoidea*가 가장 좋은 성장을 보였으므로 이 두종류의 *Chlorella*에 대한 영양염조성을 비교하였다. 영양염의 일반 조성비율을 보면 조단백은 *C. vulgaris*가 48.71%로 *C. ellipsoidea*의 46.08%보다 높으며 회분은 *C. vulgaris*가 27.34%로 *C. ellipsoidea*의 24.61%보다 높았다. 그러나 지방에 있어서는 *C. vulgaris*가 15.18%로 *C. ellipsoidea*의 23.93%보다 낮은 함유량을 나타내었다. 또 水分의 함량에 있어서는 *C. vulgaris*가 10.45%로 *C. ellipsoidea*의 7.47%보다 많은 水分을 함유하였다. *C. vulgaris*는 *C. ellipsoidea*에 비해 水分이 1.4배 더 많았음에도 불구하고 조단백및 회분의 함량이 *C. ellipsoidea*에 비해 각각 1.06, 1.11 배가 더 높았다. 아미노산 분석에서 보면 aspartic acid와 glutamic acid는 일반적인 식물성사료와 거의 비슷한 水準의 함량을 보였고 methionine은 다른 식물성사료에 비해 多少 높은 함량을 보였다. Lysine, aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine은 *C. ellipsoidea*가 *C. vulgaris*에 비해 높은 함유량을 보였고 histidine, NH_3, arginine, alanine, methionine,

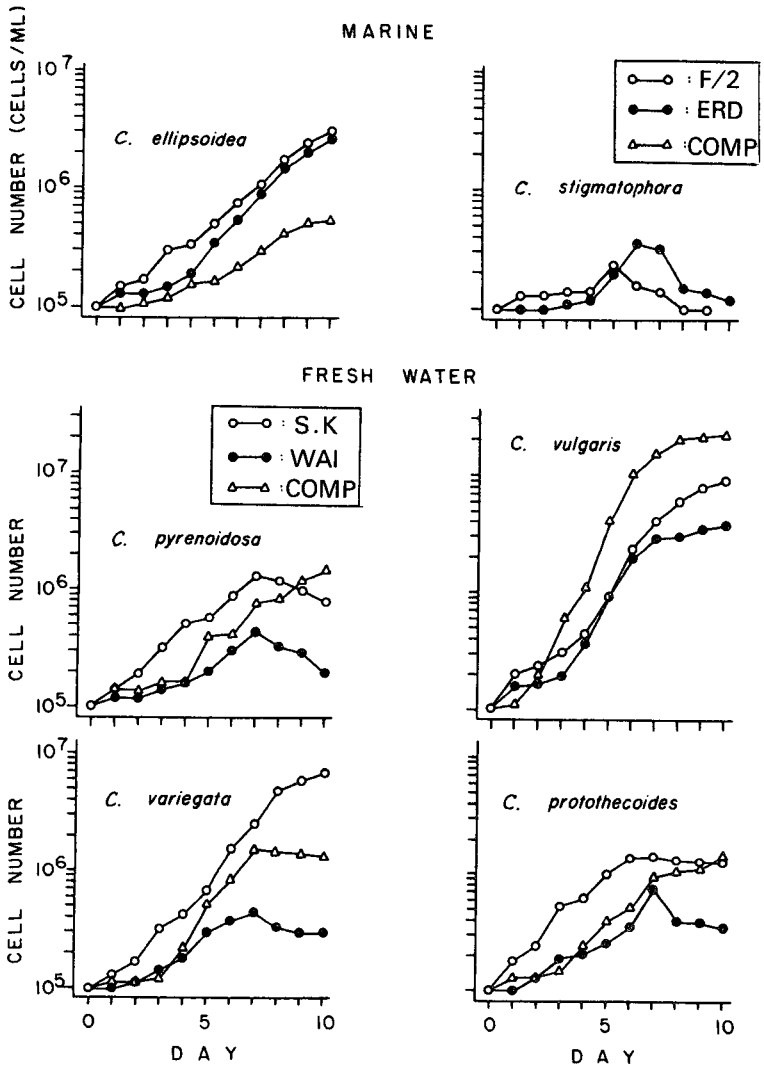

Fig. 1. Growth of six kinds of *Chlorella* at different culture media (salinity ; 30‰ in marine spp. and 0‰ in freshwater spp.), temperature ; 20℃, light intensity ; 3,500lux, LD cycle ; 24 : 0).

Table 2. Specific growth rate of *Chlorella* with different media(20℃,3,500lux, LD ; 24 : 0, 30‰ in marine spp. and 0‰ in freshwater spp.)

Species		Media	Culture days 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean Days	
Marine	*C. ellipsoidea*	f/2	0.59	0.18	0.23	0.72	0.60	0.60	0.53	0.65	0.45	0.37	3-8	0.62
		Erd.	0.49	0.00	0.10	0.34	0.88	0.63	0.77	0.83	0.44	0.43	4-8	0.78
		Comp.	0.00	0.14	0.24	0.30	0.09	0.37	0.45	0.52	0.22	0.11	5-8	0.45
Chlorella	*C. stigmatophora*	f/2	0.38	0.00	0.11	0.00	0.72	-0.52	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-
		Erd.	0.00	0.00	0.14	0.13	0.87	0.71	-0.17	0.00	0.00	0.00	4-6	0.79
		Comp.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-
Freshwater	*C. vulgaris*	S.K.	1.00	0.20	0.43	0.51	1.05	1.36	0.83	0.54	0.38	0.18	4-7	1.08
		Wai	0.68	0.09	0.16	1.00	1.28	1.22	0.42	0.02	0.22	0.13	3-6	1.16
		Comp.	0.14	0.86	1.59	0.95	1.84	1.32	0.55	0.40	0.10	0.11	1-6	1.31
	C. pyrenoidosa	S.K.	0.49	0.44	0.75	0.67	0.13	0.64	0.57	-0.13	0.00	0.00	0-7	0.53
		Wai	0.26	0.00	0.22	0.19	0.32	0.59	0.52	-0.38	0.00	0.00	-	-
		Comp.	0.49	0.00	0.10	0.09	1.29	0.07	0.91	0.09	0.55	0.29	4-7	0.76
Chlorella	*C. variegate*	S.K.	0.26	0.50	0.96	0.38	0.66	1.24	0.66	0.93	0.29	0.20	1-8	0.76
		Wai	0.00	0.14	0.35	0.36	0.74	0.34	0.24	-0.45	0.00	0.00	-	-
		Comp.	0.14	0.00	0.13	0.87	1.24	0.69	0.87	-0.04	0.00	0.00	3-7	0.92
	C. protothecoides	S.K.	0.85	0.42	1.17	0.22	0.68	0.46	0.02	-0.05	0.00	0.00	0-6	0.63
		Wai	0.00	0.38	0.55	0.14	0.31	0.51	1.02	-0.91	0.00	0.00	-	-
		Comp.	0.38	0.00	0.21	0.68	0.74	0.38	0.85	0.23	0.20	0.13	3-7	0.66

tyrosine은 *C. ellipsoidea*보다 *C. vulgaris*가 더높은 함유량을 나타내었다. 100g의 *Chlorella*중 *C. vulgaris*가 함유한 NH_3는 5.97g으로 *C. ellipsoidea*의 0.74g에 비하여 8배 이상 높았다(Fig.2).

이와같이 2종류의 *Chlorella*가 지닌 영양염의 관점에서 볼때 rotifer먹이생물의 質的인 側面에서도 담수산 *Chlorella*인 *C. vulgaris*의 利用이 可能할 것으로 판단된다.

따라서 앞으로의 연구에서는 *C. vulgaris*의 최대성장을 위한 環境要因의 규명과 더불어 해산어류의 종묘생산시 이 담수산 *Chlorella*를 먹이로 공급한 rotifer의 먹이효율을 조사할 필요가 있다.

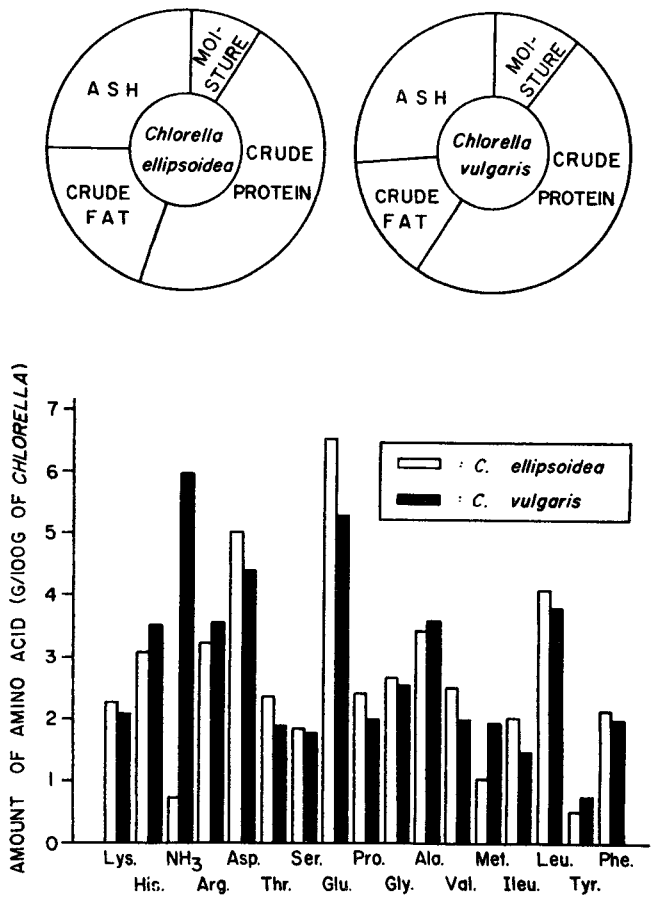

Fig. 2. General nutrient composition(upper) and amino acid analysis(lower) of two *Chlorella* species.

要 約

海産魚類및 갑각류의 유생사육시 먹이로 사용되는 rotifer(*Brachionus plicatilis)*의 먹이생물로 이용되는 *Chlorella*중 어떤種이 대량사육에 가장 적합한가를 파악하기 위하여 해수산*Chlorella* 2種, 담수산 *Chlorella* 4種에 대한 성장및 영양염분석의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 해수산 *Chlorella*중에서는 *C. ellipsoidea*가 f/2배지에서 가장 높은 成長을 나타냈고 담수산 *Chlorella*중에서는 *C. vulgaris*가 Complesal에서 가장 높은 성장을 보였다.
2. 성장의 側面에서 볼때 담수산인 *C. vulgaris*는 해수산인 *C. ellipsoidea*보다 specific growth rate가 1.68배나 높게 나타났다.
3. 영양염의 側面에서 볼때 지방은 해수산인 *C. ellipsoidea*가 조단백과 회분은 담수산인 *C. vulgaris*가 더 높았다. 아미노산측정에서 NH_3의 함량이 담수산인 *C. vulgaris*가 해수산인 *C. ellipsoidea*보다 8배이상 높은 점이 特異하였다.

參 考 文 獻

Bogdan, K.G., J.J. Gilbert and P.L. Starkweather,1980. In site clearance rates of planktonic rotifers. Hydrobiologia, 73 : 73－77.

Erdschreiber, E., 1927. Die reinkultur von marinem phytoplankton und deren bedeutung für die erforschung der produktionsfähigkeit des meerwassers. Wiss. Meeresuntersuch. N.F., 16 : 1－34.

Fontaine, C.T. and D.B. Revera, 1980. The mass culture of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, for use as food－stuff in aquaculture. Proc. World Maricul. Soc., 11 : 211－218.

Gilbert, J.J., 1978. Selective feeding and its effect on polymorphism and sexuality in the rotifer *Asplanchna siebodi.* Freshwater Biology, 8 : 43－50.

Gilbert, J.J. and E.S. Wurdak, 1978. Species－specific morphology of resting eggs in the rotifer *Asplanchna girodi.* Trans. Amer. Micros. Soc., 97(3) : 330－339.

Gilbert, J.J. and J.R. Litton, 1978. Sexual reproduction in the rotifer *Asplanchna girodi.* The Journal of Experimental Zoology, 204(1) : 113－122.

Gilbert, J.J. and P.L. Starkweather, 1977. Feeding in the rotifer *Brachionus calyciflorus.* Verh. Internat. Verein. Limnol., 20 : 2382－2388.

Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther, 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol., 8 : 229－239.

James, C.M. and T.S. Abu－Rezeq, 1988. Effect of different cell densities of *Chlorella* sp. for feeding the rotifer *Brachionus plicatilis.* Aquaculture, 69 : 43－56.

Seikai, T., K. Fukusho, H. Nishinaka, H. Murata and T. Watanabe, 1980. Effects of *Chlorella* water supplement on the rotifer *Brachionus plicatilis* production with a new kind of yeast. The Aquiculture, 28(3) : 115－121.

Snell, T.W. and C.E. King, 1977. Lifespan and fecundity patterns in rotifers ; the cost of reproduction. Evolution, 31 : 882－890.

Stein, J.R., 1973. Handbook of phycological methods－culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, : 303－306.

Yamasaki, S. and H.Hirata, 1986. Food consumption rates of two types of rotifer *Brachionus*

plicatilis. The Aqiculture, 34(2) : 137－140.

Yamasaki, S., T.Nishihara and H.Hirata, 1984. Influence of marine *Chlorella* density on food consumption and growth rate of rotifer, *Brachionus plicatilis*. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ., 33(1) : 57－61.

田官博・渡辺篤, 1965. 藻類實驗法. 1. 藻類取扱法. 南江堂, 東京, : 71－73.