

무균 로티퍼 *Brachionus rotundiformis*의 증식

정민민* · 노 섬 · 김필연

제주대학교 해양과학대학 증식학과
*제주대학교 해양연구소 먹이생물 연구실

Growth of Axenic Rotifer *Brachionus rotundiformis*

Min-Min Jung*, Sum Rho and Pil-Yun Kim

Department of Aquaculture, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

*Food organism culture Lab., Marine Research Institute of Cheju National University, 3288 Hamdok-ri, Chochon-eup, Pukjeju-gun, Cheju-do, 695-810, Korea

This paper introduces to a simple culture method and growth of axenic (bacteria-free) rotifer *Brachionus rotundiformis* for seed stock of rotifer mass culture. This rotifer axenic culture method is based on the washing and transferring with sterilized sea water and modified antibiotic mixture AM9 solution.

Population growth (final density on day 16) of axenic cultured rotifer were maintained with a high density and stable growth compared with the control of non-axenic culture (general culture style) through the 3 times-rerunning experiments (trial 1, 2 and 3). But the egg carrying rates of amictic females were not different between the axenic- and non-axenic culture condition. Although, rotifer density was higher in axenic culture, the food (*Nannochloropsis oculata*) was still remained unutilized than that of the non-axenic culture in third trial culture.

These results suggest the possible existence of harmful bacteria for the rotifer population growth in the trial 1 and 3 of non-axenic culture compared to the trial 2. This axenic rotifer culture method is valuable for seed stock of the stable rotifer mass cultures.

Key words : Axenic rotifer, *Brachionus rotundiformis*, Stable production

서 론

로티퍼(rotifer)는 유행동물문 윤충강에 속하는 동물성 플랑크톤으로 세계 각지의 담수, 기수 그리고 연안역에 널리 분포한다. 그중 *Brachionus* spp.는 해산어의 종묘생산 과정에서 가장 널리 이용되는 중요한 초기 먹이생물이다 (宇城·日野 1990).

그러나, 해산어의 종묘생산 과정에서 자치어의 대량폐사를 일으키는 원인 생물 (특히, 병원성 박테리아)을 자치어 사육조에 옮기는 주요 매개

체중의 하나로 자치어 사육조에 먹이로써 급이한 로티퍼가 지적되고 있다. 부영양화 상태에서 관리 배양된 로티퍼의 체내외 그리고 배양수에는 수많은 종류의 박테리아류가 공존하고 있다. 온도, 영양원등 모든 조건이 갖추어진 로티퍼의 대량 배양조에는 옥내 수조, 옥외 수조를 막론하고 년중 $10^7 - 10^8$ CFU/g의 고밀도의 박테리아가 존재한다 (Miyakawa and Muroga, 1988 ; Yamanoi and Sugiyama, 1987 ; Yamauchi, 1993). 그 중에는 강한 독성의 테트로톡신을 만드는 *Vibrio*와 같은 병원성 세균의 온상이 되는 경우도 있으며

(Yu et al., 1990), 로티퍼의 대량 폐사를 일으키는 색소생성균이 우점하는 경우도 있다 (日野, 1988).

이와같은 복잡한 생태적 배경하에서 경각심없이 무분별하게 이루어지는 배양수조건 또는 종묘배양 시설간의 로티퍼 (물론 알테미아의 경우도 마찬가지, Austin and Allen (1981/1982))의 이동은 병원성 생물의 감염 지역을 넓히는 중요한 원인이 될 수도 있다. 한편, 로티퍼의 배양에 필요한 호적 먹이의 검색 (Sakamoto and Hirayama, 1983; 平山, 1989) 및 로티퍼와 박테리아의 관계 (Hagiwara et al., 1994)등을 규명하기 위하여 많은 연구자들에 의하여 무균 로티퍼의 배양법에 대한 다양한 방법이 검토되었다.

이 연구는 해산어의 종묘 생산과정에서 병원

성 박테리아의 증식 및 확산을 예방하는 한가지 방법으로서, 그리고 해산어의 종묘 생산에 필요한 대량 배양용 로티퍼의 순수 증보존 방법으로서, 무균 로티퍼의 이용을 검토했다.

재료 및 방법

개량형 항생제 혼합액 AM9 (Table 1)을 사용하여 다음과 같은 과정으로 로티퍼를 무균 처리한후, 사전에 배양한 무균의 *Nannochloropsis oculata*를 먹이로 무균 로티퍼 *Brachionus rotundiformis*를 연속 유지배양했다. 무균 *N. oculata*는 岡内 (1989)가 보고한 한천 플레이 트법을 기본으로 Erd-schreiber and agar 배지 (Table 2)를 이용하여 분리, 배양했다.

Table 1. Composition of modified antibiotic mixture AM9 stock solution (per 100ml solution). This solution is modified versions of AM9 solution (Provasoli, 1977) and antibiotic mixture solution (Hirayama, 1989)

Polymixin B sulfate (5 million un 7900 USP units/mg; SIGMA)	22mg
Streptomycin sulfate (1g titer; MEIJI Seika LTD.)	660mg
Tetracycline crystalline (SIGMA)	26mg
Chloramphenicol (C ₁₁ H ₁₂ C ₁₂ N ₂ O ₅ ; WAKO pure chemical LTD.)	56mg
Crystalline Penicillin G potassium (200 thousand unit; MEIJI Seika LTD.)	2.5mg
Neomycin sulfate (660µg base per mg; SIGMA)	0.4mg

Table 2. Erd-Schreiber and agar medium. This medium was mixed establish two mediums, modified Erd-Schreiber medium (reviewed by Hagiwara et al., 1994) for *N. oculata* culture and marine agar 2216E medium (reviewed by Balompapung, 1996) for contaminating bacteria culture

Filtered 2/3 sea water (22ppt)	100ml	→ Erd-Schreiber medium
NaNO ₃	10mg	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2mg	
Vitamin B ₁₂ (0.5µg)	3ml	
Thiamine HCl (200µg)	3ml	
Tris	10mg	
NTA	10mg	
Soil Extract	5ml	
Yeast extract	0.1g	→ marine agar 2216E
Bacto peptone	0.5g	
Iron citrate	0.01g	
Bacto agar	1.5g	
pH control	7.8	

1. 로티퍼의 무균 처리과정

- (1) *N. oculata*를 공급하면서 로티퍼, *Brachionus rotundiformis*를 단일종으로 배양한다.
- (2) 단일종으로 배양된 로티퍼, *B. rotundiformis*를 5ml의 샘플병에 넣고 각반하여 단성란 (amictic eggs)만을 분리한다.
- (3) 분리한 단성란은 여과 멸균해수로 수차례 세정한다.
- (4) 10%의 개량형 AM9용액 (10ml)을 넣은 멸균 petri dish에 세정한 단성란만을 옮긴 후 120분간 방치하면서 가끔 petri dish 전체를 각반한다.
- (5) 여과 멸균해수로 수차례 각반하면서 세라한다.
- (6) 100%의 개량형 AM9용액 (10ml)을 넣은 멸균 petri dish에서 다시 120분 처리한다.
- (7) 여과 멸균해수로 수차례 세정한후 무균 배양중이던 *N. oculata*의 배양 플라스크에 단성란만을 이동시킨다.
- (8) 1주일간 배양중이던 플라스크에서 사육수와 로티퍼를 각각 채집후 STP 무균 검사 배지 (Table 3)에도 말한다.
- (9) 22°C의 항온기에서 1주일간 배양한후 무균여부를 확인한다.

2. 유균 배양(non-axenic culture)과 무균 배양(axenic culture) 로티퍼의 증식 비교

200ml의 평저 플라스크에 염분 22ppt의 여과 멸균해수 40ml를 넣은후 무균 검사를 거친 무균 로티퍼와 항생제 무균 처리를 거치지 않은 (일반 배양 또는 유균 배양) 로티퍼를 각각 7마리씩 넣고, 빛이 없는 상태하에서 실시했다. 실험 결과의 재연성과 신뢰성을 검토하기 위하여 1회 16일간에 걸친 실험을 각각 다른 시기에 3회 반복 (trial 1, 2 and 3)했다. 실험중 로티퍼의 먹이는 무균 배양중이던 *N. oculata*를 ml당 7×10^5 세포씩 2일마다 공급했다. 모든 실험은 평균 22°C의 무균실에서 실시했다. 로티퍼의 계수는 로티퍼의 무균 상태를 유지하기 위해서 실험 종료일인 16

Table 3. Composition of modified STP bacteria-free checking medium (Provasoli and Shiraishi, 1959)

Filterd sea water (22ppt)	95ml																		
KNO ₃	20mg																		
K ₂ HPO ₄	1mg																		
NaH-glutamate	50mg																		
Glycine	10mg																		
Vitamin mix solution	0.1ml																		
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td>Thiamine HCl</td> <td>10mg. %</td> </tr> <tr> <td>Biotin</td> <td>0.5mg. %</td> </tr> <tr> <td>Folic acid</td> <td>7mg. %</td> </tr> <tr> <td>Nicotinic acid</td> <td>50mg. %</td> </tr> <tr> <td>Choline</td> <td>500mg. %</td> </tr> <tr> <td>Ca pantothenate</td> <td>70mg. %</td> </tr> <tr> <td>Pyridoxine HCl</td> <td>8mg. %</td> </tr> <tr> <td>Carnitine</td> <td>20mg. %</td> </tr> <tr> <td>Riboflavin</td> <td>0.1mg. %</td> </tr> </tbody> </table>		Thiamine HCl	10mg. %	Biotin	0.5mg. %	Folic acid	7mg. %	Nicotinic acid	50mg. %	Choline	500mg. %	Ca pantothenate	70mg. %	Pyridoxine HCl	8mg. %	Carnitine	20mg. %	Riboflavin	0.1mg. %
Thiamine HCl	10mg. %																		
Biotin	0.5mg. %																		
Folic acid	7mg. %																		
Nicotinic acid	50mg. %																		
Choline	500mg. %																		
Ca pantothenate	70mg. %																		
Pyridoxine HCl	8mg. %																		
Carnitine	20mg. %																		
Riboflavin	0.1mg. %																		
Trypticase	20mg																		
Yeastolate	20mg																		
Sucrose	0.1g																		
Soil extract	5ml																		
Bacto agar	0.3g																		
pH control	7.8																		

일째에 한하여 전개체를 포란개체와 비포란 개체별로 분리 계수했다. 한편 먹이로써 공급한 *N. oculata*의 잔존량은 실험 종료일인 16일째에 혈구계수판을 이용하여 계수함으로써 공급 이후의 잔존량을 알아보았다.

결 과

무균처리한 로티퍼는 STP 무균 검사용 평판 배지에 접종, 도말한후 22°C의 암흑하의 항온기에서 1주일간 배양한 결과 음성 판정된 것을 무균 로티퍼로 인정했다.

3회 (trial 1, 2 and 3)에 걸친 로티퍼 배양에서 무균 배양 (axenic culture)에서는 로티퍼의 증식이 비교적 안정적인 것에 비교하면 유균 배양 (non-axenic culture)에서 로티퍼의 증식은 불안정적으로 각 시기에 따라서 심한 증식의 차이가 관찰되었다. 특히 세 번의 반복 실험중 trial 1과

trial 3의 유균 배양에서는 급격한 로티퍼의 증식 억제제가 관찰되었다. 반면, trial 2에서는 다른 시기 (trial 1과 trial 3)의 결과에 비교하면 무균 배양과 유균 배양과의 사이에 큰차가 없었다 (Fig. 1). 그러나, 로티퍼 군증식의 지표가 되는 단성 생식란의 포란 개체율의 전체적인 비교에서는 trial 1에서 단성란 포란 개체가 전혀 관찰안된 결과 이외에는 유균 배양과 무균 배양과의 결과 사이에는 유의한 차이를 관찰할수 없었다 (Fig. 2). 각각 3회에 걸친 16일간의 실험기간중 2일마다

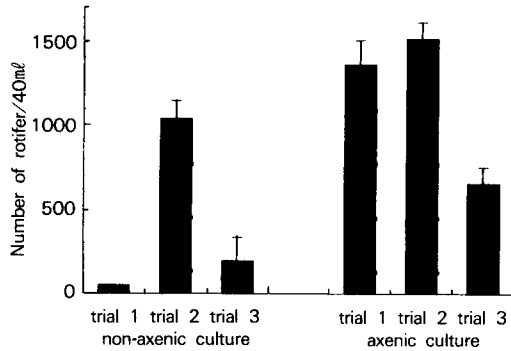


Fig. 1. Number of rotifer in the 3 times-rerunning experiments of non-axenic and axenic cultures. Each bars and vertical bars represent mean±SD of three replicates on the each running.

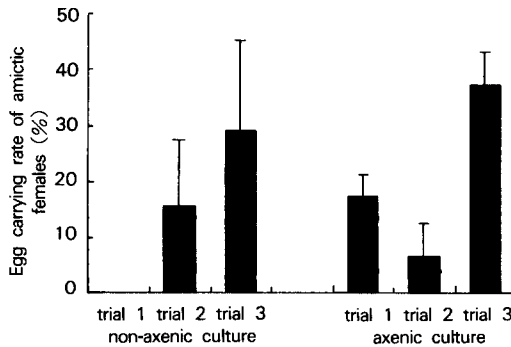


Fig. 2. Egg carrying rate (%) of testing amictic females in the 3 times-rerunning experiments of non-axenic and axenic cultures. Each bars and vertical bars represent mean±SD of three replicates on the each running.

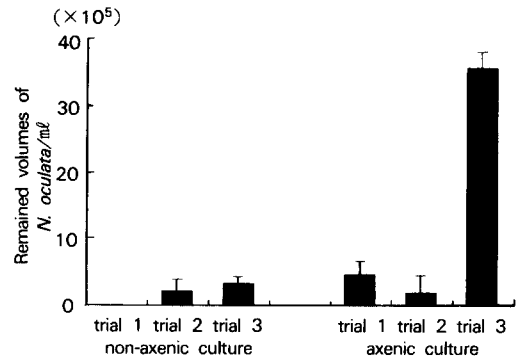


Fig. 3. Remained volumes of *N. oculata* per ml in the 3 times-rerunning experiments of non-axenic and axenic cultures. Each bars and vertical bars represent mean±SD of three replicates on the each running.

급이한 *N. oculata*의 총공급량은 ml당 7×10^5 세포를 8회에 걸쳐 급이하여 각 시기(trial)의 총급이량은 56×10^5 cells/ml이었다. 그러나, trial 3에서 실험 종료일에 계수한 *N. oculata*의 총잔존량은 유균 로티퍼 배양구에서 3.1×10^5 cells/ml이 남았으나, 무균 로티퍼 배양구에서는 유균 로티퍼 배양구의 약 11배에 달하는 35.4×10^5 cells/ml/*N. oculata*의 잔존량이 관찰되었다 (Fig. 3).

고 찰

이 실험의 무균 처리과정은 매번에 걸친 STP 무균 검사 결과에서 음성의 결과가 나왔다. 이것은 이 무균 처리과정이 STP와 같은 부영양 배지에서 음성 판정이 나올 정도로 간단히 무균 로티퍼를 만들 수 있는 방법임을 입증한다. 이 실험에 사용한 로티퍼는 양성 생식의 발현을 쉽게 관찰할수 없는 strain이었기때문에 이 실험에서는 단성란을 이용했으나, 양성 생식이 쉽게 유도 가능한 strain인 경우에는 내구란을 대량으로 만든후 무균 실험에 이용한다면 보다 간단하게 무균 처리가 가능할것이다 (Hagiwara et al., 1994).

사육조에서 먹이가 부족한 경우, 로티퍼는 자신

의 배설물 또는 부산물을 영양원으로 증식한 박테리아를 대량으로 섭취한다 (宇城·日野, 1990). 안정적인 배양 상태를 유지하는 로티퍼의 배양조에서는 *Pseudomonas* (61.7%)와 *Moraxella* (17.4%)가 우점하는 것으로 알려져있다 (Miyakawa and Muroga, 1988).

한편, 비교적 안정적인 배양상태가 유지되는 배양조에 우점하는 박테리아의 종류중에서 *Pseudomonas*속은 로티퍼의 증식에 필수적인 비타민 B₁₂를 생산한다 (Yu et al., 1988, 1989). 그러나, 로티퍼의 배양을 년중 안정적으로 유지하는데는 한계가 있다. 갑작스럽게 발생하는 로티퍼 배양 밀도의 급락 또는 원인 불명의 증식 불량 현상은 결국 어류 종묘생산 및 자원 방류 사업 계획에 큰 차질을 불러 일으킨다. 로티퍼의 배양조에서 분리되는 세균류는 로티퍼의 증식억제는 물론 해산 자치어의 대량 폐사를 불러 일으킬 수도 있다. 로티퍼의 대량 배양조에서 분리된 *Vibrio* 균은 로티퍼의 증식을 억제했으며 (Yu et al., 1990), 더욱이 이 비브리오균 (*Vibrio*)은 해산 자치어의 생산율에도 악영향을 주었다 (Tanasomwang and Muroga, 1992).

이처럼 로티퍼의 대량배양조는 로티퍼와 다양한 혼재 미생물들에 의해 복잡한 생태계를 이루고 있다. 前田 (1988)는 유용 수산 생물의 종묘생산을 성공적으로 수행하기 위해서는 유용 수산 생물을 사육하는 수조에서 박테리아와 같은 미생물을 사용하여 유용 수산 생물의 성장에 호적한 조건으로 작용할수 있는 물 만들기의 중요성을 역설했다. 그러나 수중 생태계의 인위적인 제어를 전제로하는 물만들기는 항상 효과적인 결과를 얻기는 아직 힘든 실정이다. 현재로는 유용성이 인정된 세균주를 첨가하거나 (Yasuda and Taga, 1980), 배양조내에 혼재된 유해 세균을 제거하기 위해, 살균제나 자외선 조사 (Yamanoi and Sugiyama, 1987) 또는 항생제 (Yamauchi, 1993)를 사용하는 방법으로 로티퍼의 증식을 도모하고자 하는 시도가 행하여지고 있다. 그러나, 이러한 약제의 사용은 사용량과 약제의 종류에 대한 규

제가 점점 엄격해지고 있으며, 약제에 대한 내성의 증대와 이에 따른 노동력 (살포빈도의 증가로 인한 노동력)과 비용의 증가가 문제시되고 있다.

이 연구 결과에서는 전시기 (trial 1, 2 and 3)에 걸쳐 비교적 안정적인 증식을 보인 무균 배양의 결과와는 달리 유균 배양 로티퍼의 증식은 불안정적으로 특히, trial 1과 trial 3의 유균 배양에서는 로티퍼의 증식이 크게 억제되었다. 더욱이 유균 배양에서 trial 1의 단성란 포란율은 제로 (zero)였다. 이결과들은 유균 배양조건의 혼재 박테리아는 로티퍼의 증식을 크게 억제시키는 종류이었다고 판단되며, 무균 배양에서는 로티퍼의 증식에 직접적으로 악영향을 미친 혼재 박테리아가 무균 처리과정을 통해 제거되었음을 뒷받침한다.

반면, trial 2에서는 다른 시기 (trial 1과 trial 3)의 결과에 비교하면 무균 배양과 유균 배양과의 증식에 있어서는 큰차가 없었다. 이 결과는 실험 기간중 trial 2에 혼재되어 있던 박테리아는 로티퍼의 증식에 무해한 박테리아이었거나, 아니면 16일간의 실험 기간중 로티퍼의 증식력을 방해할 만큼의 억제력을 갖출수 없었다고 추측된다.

실험 종료일에 계수한 *N. oculata*의 총잔존량에서, 무균 로티퍼 배양구에서 유균의 약 11배에 해당되는 잔존 *N. oculata*가 trial 3에서 관찰된 것은 유균 배양구에 혼재되어있는 박테리아가 로티퍼의 증식뿐만 아니라 로티퍼의 먹이가 되는 *N. oculata*의 증식에도 저해 요인으로 작용하여, 결국 로티퍼의 증식에 간접적으로 악영향을 미쳤을 가능성을 시사한다.

최근, 로티퍼의 상호 분양에 의해 일어나는 배양시설간의 병원성 세균의 확산은 커다란 문제로 부각되고 있다. 이러한 배경하에서 무균 로티퍼 배양방법의 일반화 또는 대량 배양용 로티퍼의 씨앗으로써의 무균 로티퍼의 이용은 로티퍼의 안정 배양은 물론 유용 수산 생물의 대량 폐사를 사전에 방지할 수 있는 효과적인방법이 될 수 있다고 판단된다. 또한 플랑크톤의 무균 배양법은 미소 동식물 플랑크톤과 수중 박테리

아의 관계를 규명할 수 있는 방법으로서도 응용 가능할 것이다.

요 약

이 연구에서는 해산어의 종묘 생산에 필요한 대량 배양용 로티퍼, *Brachionus rotundiformis*의 종 보존 방법으로서 무균 로티퍼의 이용을 검토했다. 로티퍼는 개량형 항생제 혼합액 AM9을 사용하여 무균 처리한후, 무균 *Nannochloropsis oculata*를 먹이로 공급하여 연속 유지배양했다.

각각 다른 시기의 3회 (trial 1, 2 and 3)에 걸친 로티퍼 배양결과, 무균 배양 (axenic culture)에서는 비교적 안정적인 증식을 보인 반면, 유균 배양 (non-axenic culture)에서 로티퍼의 증식은 불안정적으로 각 시기에 따라서 심한 증식의 차이가 관찰되었다. 이 결과는 유균 배양에서 로티퍼의 증식에 직접적으로 악영향을 미치는 박테리아가 무균 처리과정을 통해서 제거되었음을 증명한다.

로티퍼 무균 배양방법의 일반화 또는 대량 배양용 로티퍼의 씨앗으로서의 무균 로티퍼의 이용은 로티퍼의 안정 배양은 물론 유용 수산 생물의 대량 폐사를 일으키는 원인 생물을 사전에 제거할 수 있는 유효한 방법이 될 수 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Austin, B. and D. A. Allen, 1981/1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*) Aquaculture 26 : 369-383.
- Balompapueng, M. D, 1996. Studies on technological development of mass production and preservation of marine rotifer *Brachionus plicatilis* resting eggs. Doctoral thesis, Univ. of Nagasaki, Japan, 127pp.
- Hagiwara, A., K. Hamada, S. Hori and K. Hirayama, 1994. Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (rotifera) with the addition of bacteria and rotifer extracts. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 181 : 1-8.
- Miyakawa, M. and K. Muroga, 1988. Bacterial flora of cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. SUISANZOSHOKU 35(4) : 237-243.
- Provasoli, L. and K. Shiraishi, 1959. Axenic cultivation of the brine shrimp *Artemia salina*. Biol. Bull. 117 : 347-355.
- Provasoli, L., 1977. 5. Cultivation of animals. 5.1 Research cultivation. 5.11 Axenic cultivation. In C. Kinne (ed.), Marine Ecology III. Cultivation, part 3) Wiley, London : 1295-1319.
- Sakamoto, H. and K. Hirayama, 1983. Dietary effect of *Thiocapsa roseopersicina* (photosynthetic bacteria) on the rotifer *Brachionus plicatilis*. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ. 54 : 13-20.
- Tanasomwang, V. and K. Muroga, 1992. Effect of sodium nifurstyrenate on the reduction of bacterial contamination of rotifer (*Brachionus plicatilis*). Aquaculture 103 : 221-228.
- Yamanoi, H. and T. Sugiyama, 1987. Effects of sodium nifurstyrenate bath and ultraviolet irradiation on the elimination of bacteria associated with rotifer. SUISANZOSHOKU 35(3) : 191-195.
- Yamauchi, S., 1993. Effect of antibacterial substances on the growth of rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi 59(6) : 1001-1006.
- Yasuda, K. and N. Taga, 1980. Culture of *Brachionus plicatilis* Muller using bacteria as food. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46(8) : 933-939.
- Yu, J-P., A. Hino, R. Hirano and K. Hirayama, 1988. Vitamin B₁₂-producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi 54(11) : 1873-1880.
- Yu, J-P., A. Hino, M. Ushiro and M. Maeda, 1989. Function of bacteria as a vitamin B₁₂ producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi 55(10) : 1799-1806.
- Yu, J-P., A. Hino, T. Noguchi and H. Wakabayashi, 1990. Toxicity of *Vibrio alginolyticus* on the survival of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi 56(9) : 1455-1460.
- 前田昌調, 1988. 微生物食物連鎖と水産増養殖, 海

무균 로티퍼 *Brachionus rotundiformis*의 증식

- 洋科學 20(1) : 24-28.
- 岡内正典, 1989. 餌料用微細藻類の無菌分離法と保存. 西海區ブロック藻類 介類研究會報 6 : 49-54.
- 字城正和・日野明德, 1990. シオミズツボワムシの微生物捕食とその意義. 海洋科學 22(1) : 20-27.
- 日野明德, 1988. ワムシの生物學と培養上の問題点. さいばい. 社團法人日本栽培漁業協會 51 : 16-36.
- 平山和次, 1989. シオミズツボワムシ培養に関する最近の知見. さいばい. 社團法人日本栽培漁業協會 52 : 1-16.