Journal of Aquaculture 11 (1) : 113~118 (1998)

*Tigriopus japonicus*의 세균 섭이

정민민* · 노 섬 · 김필연

제주대학교 해양과학대학 증식학과, *제주대학교 해양연구소 먹이생물연구실

Feeding of Bacteria by Copepod *Tigriopus japonicus*

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. Cheju-do, 695-810, Korea*

This study was carried out to investigate feeding of bacteria by *Tigriopus japonicus* (Copepoda : Harpacticoida) under axenic culture.

The ovigerous females and nauplii were grown with feed of aquatic bacteria. Growth of RT bacteria strain was suppressed by feeding of co-existing *T. japonicus*. *T. japonicus* of non-axenic culture was observed with oil bead in the egg sac. On the other hand, early nauplius stage did not develop to the next stage without bacteria food of axenic cultures.

These results suggests the early nauplius stage took bacteria as food. And the adult of *T. japonicus* may utilize the bacteria as nutrient source for egg development.

Key words : Axenic culture, Copepoda, *Tigriopus japonicus*, Bacterivorous

서 론

*Tigriopus japonicus*는 Mori (1938)에 의해 신종 보고된 이후, 수많은 연구자들에 의하여 다양한 연구가 진행된 copepoda의 한 종류이다. 이 종은 해산어의 종묘생산 과정에서도 널리 이용되는 중요한 초기 먹이생물이기도하다 (Kitajima, 1973).

Ikeda (1973)는 대량 배양용 copepoda의 종선택에 있어서 종선정 기준으로 다양한 종류의 copepoda의 열량 (칼로리량)을 비교했다. Yasuda and Taga (1980)는 copepoda와 함께 해산어의 종묘 생산과정에서 대표적인 먹이 생물로서 이용하고 있는 로티퍼 *Brachionus plicatilis*를 해수로부터 분리한 세균류를 먹이로 공급하여 배양에 성공하였다. 해산 copepoda는 섬모충, copepoda의 nauplius 유생등 미소 동물 플랑크톤을 먹이로서 이용하며 (大塚, 1990), 이들 미소생물 (copepoda, 섬모충과 편모충 등을 포함하고 있는 원생동물 그리고 식물성 플랑크톤등)들의 사체는 해양에 존재하는 대량의 박테리아에 의해 분해되어 새로운 무기, 유기 영양원으로 전환된다 (三好, 1988).

해산어의 종묘생산 과정에서 가장 큰 문제점은 각종 종묘 생산 대상 어종들이 요구하는 먹이생물 입자의 적정 크기이다. 특히 최근에 활발하게 연구가 이루어지고 있는 능성어류와 같은 입이 작은 어종의 경우는 초기 종묘 생산 과정에서 섭식 가능한 소형의 먹이 생물을 검색, 대량 배양하는 것이 가장 큰 관건으로 대두되고 있다. 이와 같은 현실에 입각하여, 현재 대량 배양 등 많은 측면에서 연구된 *T. japonicus*의 nauplius 유생은 입이

작은 어종이 요구하는 적당한 크기의 먹이 생물의 한 종류라고 할 수 있다 (平野 大島, 1963 ; Hirano, 1966).

이 연구에서는 *T. japonicus*의 nauplius 유생을 대량 생산하기 위한 목적으로 무균 배양을 통하여 nauplius 유생 단계와 성체의 식성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. *T. japonicus*의 예비 배양

실험실에서 연속 유지 배양중이던 *T. japonicus*의 포란 암컷으로부터 충분히 성숙된 난낭만을 분리한후 *Nannochloropsis oculata* 현탁 해수중에서 부화, 증식시킨 단일종 배양주 (mono culture strain)를 실험 생물로 사용하였다.

2. *T. japonicus*의 무균 처리과정

*N. oculata*를 공급하면서 *T. japonicus*를 단일종 배양하였다. 단일종 배양중이던 *T. japonicus*의 포란 암컷으로부터 해부침을 이용하여 난낭만을 분리한후, 난낭은 여과 멸균해수로 수차례 세정하였다. 10% 의 개량형 AM9 용액 (10㎖) (Provasoli et al., 1959)을 넣은 멸균 petri dish에 세정한 난낭만을 옮긴후 120분간 방치하면서 가끔 petri dish 전체를 각반하여 주었다. 이어서 여과 멸균해수로 수차례 각반하면서 세란한뒤 100% 의 개량형 AM9 용액 (10㎖)을 넣은 멸균 petri dish에서 120분간 방치하였다. 다시 여과 멸균해수로 수차례 세정한후 무균 배양중이던 *N. oculata*의 배양 플라스크에 난낭만을 옮겨주었다. 난낭으로부터 nauplius가 부화되면 플라스크의 배양수와 *T. japonicus*를 각각 채집하여 STP 무균 검사 배지 (Provasoli et al., 1959)에 도말하여 22℃의 항온기에서 1주일간 배양한후 무균여부를 확인하였다.

3. 실험 조건

*T. japonicus*의 성체와 nauplius 유생의 무균 배양은 용량 200㎖의 둥근 평저 플라스크에 40㎖의 배양수를 채우고 수온 25℃, 염분 22ppt로 조절하여 실시하였다. *T. japonicus* 성체의 식성을 알아보기 위하여 무균 배양중인 포란한 암컷을 각각 1마리씩 수용하였다. 먹이로 무균 배양한 *N. oculata*를 단독 공급한 시험구와 *T. japonicus*의 일반 배양 용기에서 분리한 한 종류의 박테리아 균주 (이하 RT 균주라 한다.)를 각각 7×10^5cells/㎖씩 공급한 시험구로 나누었다. 또한 *T. japonicus*가 RT 균주에 미치는 영향을 비교하기 위하여 RT 균주만을 동일한 밀도로 단독 배양하면서 성체의 난낭안의 영양상태와 경과일수에 따른 RT 균주 수의 변화를 조사하였다. *T. japonicus*의 nauplius 유생은 무균 배양중이던 암컷으로부터 난낭만을 분리한후 무균실에서 부화시킨후, nauplius 유생의 상태를 가능한한 동일 조건으로 맞추기 위하여 같은 어미로부터 같은 시기에 부화한 유생을 각 플라스크에 5마리씩 수용했다. 먹이로 공급한 RT 균주는 성체의 경우와 동일하게 해주었다. 모든 실험은 동일 시기에 3회 반복했다.

결 과

*T. japonicus*의 성체 배양에있어서 RT 박테리아의 먹이효과를 알기 위하여 *T. japonicus*의 성체를 투입한 것과 RT 박테리아만을 배양한 경우의 증식을 비교하면 Fig. 1과 같다. RT 박테리아 균주의 배양용기에 *T. japonicus*의 성체를 첨가한 실험구에서는 배양후 2일째에 RT 박테리아의 균주 수가 $19.1\pm2.0\times10^6$ cells/㎖로 peak에 달하였으나, 3일째부터 감소하기 시작하여 배양 9일째에는 $8.85\pm2.1\times10^6$ cells/㎖로 그 번식이 억제되었다. 그러나 RT 박테리아 균주만을 배양한 실험구에서는 배양 1일째에 $24.4\pm6.4\times10^6$ cells/㎖으로 증가하여 4일째에 $43.2\pm1.9\times10^6$ cells/㎖로 peak에 달하였고, 이후 점차 감소하여 9일째에는 $30.1\pm0.7\times10^6$ cells/㎖로 순조로운 증식이 관찰되었다. 그리고 RT 균주만을 먹이로한 *T. japonicus*의 성체의 현미경 관찰에서는 Fig. 2-A

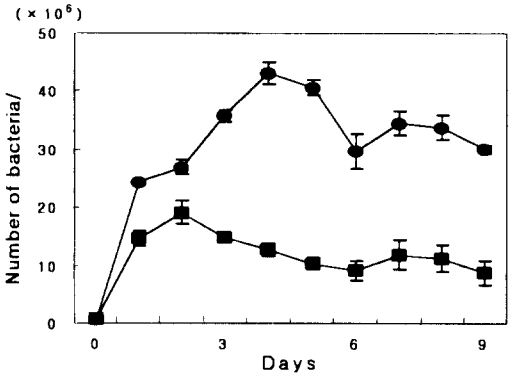

Fig. 1. Growth of RT bacteria strain. The RT bacteria strain single culture (circles), and mixed culture with mono-species of *Tigriopus japonicus* adult (squares).

에서와 같이 난낭안의 영양상태를 판단할 수 있는 oil bead (유구)가 확인되었다. 그러나, 무균 상태의 *N. oculata*만을 공급한 실험구에서는 9일간의 배양실험 동안 계속하여 생존하고 있었지만, 실험 종료시까지 배양 용기 바닥에 유영활동이 거의 정지된 상태로 멈추어 있었고, Fig. 2-B에서와 같이 oil bead는 전혀 관찰되지 않았다.

RT 박테리아 균주 배양용기에 무균 배양한 *T. japonicus*의 nauplius 유생을 첨가한 실험구와 첨가하지 않았던 실험구에서의 RT 박테리아 균주의 증식 결과는 Fig. 3과 같다. 첨가한 실험구에서의 RT 박테리아 균주의 세포 증식은 nauplius 유생을 첨가하여 4일째에 $11.3\pm1.2\times10^6$ cells/mℓ로 peak에 달한 이후 다소 감소되어 8일째에는 $9.4\pm2.2\times10^6$ cells/mℓ로 평행하게 유지되었다. 그러나 첨가하지 않은 실험구에서는 배양 3일째에 $26.0\pm1.4\times10^6$ cells/mℓ로 peak에 달하였고, 이후 다소 감소되어 배양 8일째에는 $20.4\pm1.7\times10^6$ cells/mℓ로 평행 상태가 유지되었다. 따라서 *T. japonicus*의 성체나 nauplius 유생을 첨가한 실험구에서는 RT 박테리아를 먹이로 이용하기 때문에 증식이 크게 억제된 것으로 추정되며, 또한 성체의 난낭내에 영양상태를 판단할 수 있는 oil bead 형성이 RT 박테리아 균주 배양액에서

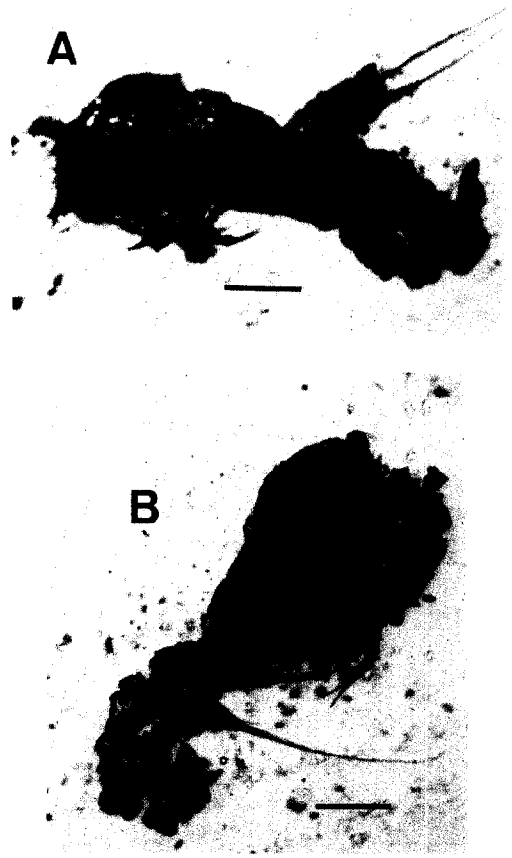

Fig. 2. Development of egg sac in the adult female of *Tigriopus japonicus*. A, The female reared under the condition with RT bacteria strain ; B, The female reared without the bacteria. Oil beads were not found in the tissue. Scale bar = 100μm.

만 관찰된 것은 이를 실증할 수 있는 결과라고 생각된다.

고 찰

copepoda의 칼로리치의 의미는 먹이 생물로서 copepoda가 어느 정도의 가치를 가지고 있느가를 판단하는데 없어서는 안될 판단 방법으로서 copepoda의 칼로리치는 종에 따라서 차이가 있을뿐만 아니라, 그 copepoda의 생식온도 (넓은 의미로

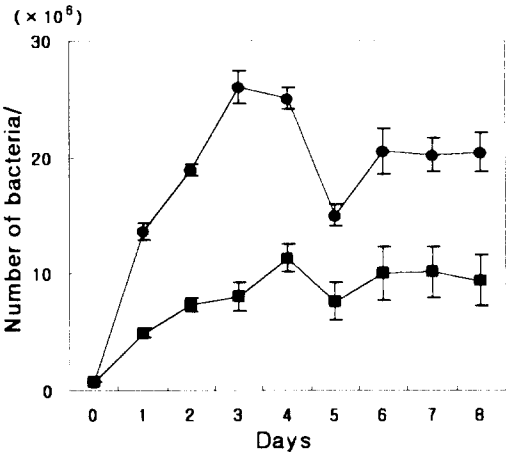

Fig. 3. Growth of RT bacteria strain. The RT bacteria strain single culture (circles), and mixed culture with mono-species of *T. japonicus* nauplii (squares).

열대, 온대, 한대역의 의미도 있고, 좁은 의미로는 다양한 조건의 배양 온도를 지적할 수도 있다.)와도 밀접한 관계가 있다. copepoda는 받아들인 영양원을 오일의 형태로 체내에 축적한다. 그런데 일반적으로 생식 온도가 낮은 (또는 배양 온도가 낮은 조건) 종류일수록 체성분에는 탄소원이 풍부하여 예를 들면 탄소원 (열량을 내는 근원)의 함량이 60%가 넘는 북방종인 경우에는 동물체의 대부분이 유구 (oil bead : Paffenhofer and Strickland, 1970)로 가득차 있다 (Ikeda, 1973). 이 실험에서 무균배양 *T. japonicus*에게 인위적으로 박테리아주 (RT 균주)를 먹이로 공급한 경우에는 사육 용기중에 있던 RT 균주를 적극적으로 이용하여 *T. japonicus*의 난낭은 유구로 가득차 있었다 (Fig. 2A). 그러나, 무균 *N. oculata*만을 먹이로 급이한 경우에는 9일 동안의 실험 기간중 사망하는 개체는 관찰할 수 없었으나, RT 균주 공급구와 같은 oil bead는 관찰할 수 없었고 *T. japonicus*의 체내가 거의 비어있어, 단지 껍데기만을 덮어쓰고 있는 것과 같이 체내에는 아무것도 없이 건조한 상태였다 (Fig. 2B).

Omori (1973)에 의하면 copepoda는 종류에 따라서 먹이에 대한 선택적 섭식 행동이 두드러지게 나타나며, 특히 동일종의 copepoda 일지라도 발생단계 (성장)에 따라 섭식하는 먹이의 크기와 섭식량은 크게 달라진다고 하였다. 이 실험에서 사용한 *T. japonicus*는 지금까지의 연구 결과에 의하면 무엇이든지 먹이로 이용하는 잡식성 (omnivorous)으로 분류되어져 왔다 (Takano, 1971). 그러나, 이 실험 결과에 의하면 일반적으로 먹이로서 직접 이용하는 것으로 알려져 있는 식물성 플랑크톤 *N. oculata*를 무균 배양하여 급이한 경우에는 그 증식이 원만하게 이루어지지 않았다. 반면 *T. japonicus*의 배양조에서 분리한 한 종류의 특정 세균주 (RT 균주)만을 먹이로 급이한 경우에는 일반 배양과 거의 비슷한 증식이 관찰되었다. 즉 수용한 nauplius 유생은 실험 개시시에 수용한 5개체 전부가 배양후 5일째에 copepodid I 단계로 성장하였다. 이 결과는 지금까지 *T. japonicus*가 잡식성인 것으로 알려진 것과는 달리, 최소한 모든 구조가 미발달된 초기의 nauplius 유생의 경우에는 사육수중에 세균이 존재하지 않는 경우에는 정상적인 발생이 불가능해진다는 것을 의미한다. 즉, 잡식성이라는 분류 방법은 *T. japonicus*의 성체 또는 어느 정도 발생이 진행된 단계 (예를 들면 copepodid 이후의 발생 단계)에 있어서는 타당한 분류 방법일지 모르지만, 이 실험의 결과와 같이 부화 직후 또는 발생 초기의 nauplius 유생단계 (예를 들면 nauplius I 내지 II 단계)에서는 잡식성이라고 하기보다는 박테리아식성 (bacterivorous)이라고 분류하는 것이 적당한 표현 방법이 될것이라고 생각된다. 이와 관련된 연구로 먹이중에 박테리아 또는 미량 영양소가 존재함으로서 대상 사육 생물에 대한 먹이 효과가 높아진다는 보고가 있다 (Provasoli et al., 1959). 무균 상태의 *Platymonas*만을 급이한 *Tigriopus californicus*의 배양에서는 약 20-30일간 배양이 유지되었지만, *Platymonas*와 임의의 일정 박테리아를 혼합 급이한 경우에는 약 3년에 걸친 장기간의 배양이 성공적으로 이루어졌다. 그리고, *T. japonicus*의 경우에는 *Rhodomonas*를 먹이로 공급했을때 6세대에서 그 증식이 정지되

었고, *Isochrysis*를 먹이로 공급한 경우에는 8세대째에서 그들의 증식이 정지되었다. 그러나, 두 먹이 (*Rhodomonas*와 *Isochrysis*)를 혼합 공급한 경우에는 11세대에 걸친 증식을 보였다 (Provasoli et al., 1959). 이와 같은 박테리아 혼합 공급 또는 다종의 식물 플랑크톤의 혼합 공급은 *Tigriopus*의 발생 단계에 있어서 섭식 가능한 먹이의 종류, 크기 등에 차이가 있음을 의미한다 (Kitajima, 1973). 그 메카니즘은 이 실험 결과의 nauplius 유생이 박테리아가 없는 상태에서는 정상적으로 성장이 불가능했다는 것과 관계가 있을것으로 추측된다.

*T. japonicus*는 로티퍼의 배설물과 같은 유기물 그리고 이 유기물을 분해하는 박테리아가 섞여있는 즉 배양 용기내의 부산물만의 공급으로서도 정상적인 증식을 보였다 (Jung and Hagiwara, 투고중). 그러나, 무균 배양용기내에는 *T. japonicus* 성체의 배설물 (유기물 : organic aggregates ; Paffenhofer and Strickland, 1970)이 존재했음에도 불구하고 정상적인 증식은 관찰할 수 없었다. Hanaoka (1973)에 의하면 해양 유래의 박테리아는 일반적으로 높은 조단백 함량(crude protein percent)을 나타내었다 (50.76-75.17 %).

또한, Heinle et al. (1977)는 copepoda의 하르팍티코이다류의 배양수조내에 혼재된 섬모충은 배양조내에서 copepoda와 배양조내 유기 영양염 (detritus)의 중간에서 영양염의 전환자 (디트라이터스를 섭이하여 자신의 영양원으로 전환함) 그리고 전달자 (섬모충 자신을 먹이로서 이용하고 있는 copepoda와 같은 상위 영양단계의 생물에게 그들의 먹이로서 피식 당함으로서 copepoda의 증식에 필요한 영양염을 디트라이터스로부터 copepod에게 전달하는 중간 매개체)로서의 역할을 한다고 보고하였다. 이 연구에서도 부화 직후의 초기 단계의 nauplius 유생은 배양 용기중에 분포하는 배설물 형태의 유기물을 nauplius 유생이 직접 영양원으로 이용하는 것이 불가능함을 의미하기도 한다. 이 과정에서 배양 용기내에 이러한 유기 영양원을 분해할 수 있는 박테리아가 존재한다면, 혼재된 박테리아는 자신의 영양원으로서 배양조내의 유기물 (배설물)을 분해하여 증식하고, 증식된 박테리아는 nauplius 유생의 먹이로서 이용되었다고 추측된다.

즉, *T. japonicus*의 배양조내에 혼재된 박테리아는 *T. japonicus*의 배설물을 자신들의 영양원인 셀룰로오스 단계의 먹이로 이용하여 증식하고, 증식된 박테리아는 *T. japonicus*의 nauplius 유생 또는 성체에게 단백질원으로서 이용되었다고 추측된다. 즉, 배양조내의 혼재 박테리아는 배양조내의 에너지의 흐름을 원만하게 하는 중간 매개체로서의 역할을 수행했다고 생각된다.

요 약

*Tigriopus. japonicus*를 대량 생산하는데 필요한 기초적인 자료를 얻기 위해 무균 배양을 통한 nauplius 유생 단계와 성체의 식성에 대하여 조사하였다.

무균 상태의 성체는 먹이로 공급한 RT 박테리아주를 적극적으로 이용하여, 순조로운 증식을 보였다. 먹이로 공급한 RT 균주의 증식은 포식자 *T. japonicus*의 섭식에 의해서 그 증식이 크게 억제되었다. RT 균주만을 먹이로 배양한 *T. japonicus*의 성체가 가지고 있는 난낭안에는 oil bead로 충만해 있었다. 그러나, 무균 상태의 *N. oculata*만을 먹이로 공급한 경우에는 oil bead를 전혀 관찰할 수 없었다. 무균 조건의 nauplius 유생의 경우에도 먹이로서 공급한 RT 박테리아주를 적극적으로 이용하여 RT 박테리아주의 증식을 크게 억제하였다.

이 결과는 지금까지 *T. japonicus*가 잡식성인 것만으로 알려진 것과는 달리, 최소한 섭식기구가 미발달된 nauplius의 초기 유생은 사육수중에 세균이 존재하지 않는 경우에는 정상적인 발생이 불가능하였다. 즉, 부화 직후 또는 발생 초기의 *T. japonicus*의 nauplius 유생은 박테리아식성 (bacterivorous)이었다.

참 고 문 헌

Hanaoka, H., 1973. Cultivation of three species of pelagic micro-crustacean plankton. Bull. Plankton Soc. Japan, 20(1) : 19－29.

Heinle, D. R., R. P. Harris, J. F. Ustach and D. A. Flemer, 1977. Detritus as food for estuarine copepods. Mar. Biol., 40 : 341－353.

Hirano, R., 1966. Plankton culture and aquatic animals seedling production. Inform. Bull. Planktol. Japan, 13 : 72－75.

Ikeda, T., 1973. On the criteria to select copepod species for mass culture. Bull. Plankton Soc. Japan, 20(1) : 41－48.

Jung M. M. and A. Hagiwara, Interspecific relation between rotifer *Brachionus rotundiformis* and copepod *Tigriopus japonicus* under the bacteria free culture condition. (submitted)

Kitajima, C., 1973. Experimental trials on mass culture of copepods. Bull. Plankton Soc. Japan, 20(1) : 54－60.

Mori, T., 1938. *Tigriopus japonicus*, a new species of neritic copepoda. Zool. Mag. Japan, 50(5) : 294－296.

Omori, M., 1973. Cultivation of marine copepods. Bull. Plankton Soc. Japan, 20(1) : 3－11.

Paffenhofer, G. A. and J. D. H. Strickland, 1970. A note on the feeding of *Calanus helgolandicus* on detritus. Mar. Biol., 5 : 97－99.

Provasoli, L., K. Shiraishi and J. R. Lance, 1959. Nutritional idiosyncrasies of *Artemia* and *Tigriopus* in monoxenic culture. Ann. New York Acad. Sci., 77(2) : 250－261.

Takano, H., 1971. Breeding experiments of a marine littoral copepod *Tigriopus japonicus* Mori. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 64 : 71－77.

Yasuda, K. and N. Taga, 1980. Culture of *Brachionus plicatilis* Muller using bacteria as food. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 46(8) : 933－939.

三好 英夫, 1988. 海洋における有機物の微生物分解. 海洋科學, 20(2) : 95－100.

大塚 攻, 1990. カイアシ類による微小動物プランクトンの捕食. 海洋科學, 22(1) : 45－52.

平野 次郎 大島 泰雄, 1963. 海産動物幼生の飼育とその餌料について. 日水誌, 29(3) : 282－297.