

## MCCF 배지를 이용한 해산 섬모충 *Vorticella* sp.의 cyst 형성

정민민 · 노섬\*

제주대학교 해양연구소 먹이생물연구실, \*제주대학교 해양과학대학 증식학과

### Cyst formation of the marine ciliate, *Vorticella* sp. using MCCF medium

Min-Min JUNG and Sum RHO\*

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

\*Department of Aquaculture, Cheju National University, 1 Ara-dong, Cheju-si, Cheju-do 690-756, Korea

The ciliate *Vorticella* was often observed in the rotifer mass culture tanks as common co-existing organism. This *Vorticella* performed as a predator for aquatic bacteria population in the rotifer mass culture tanks. This study was carried out to investigate a cyst formation medium of *Vorticella* in the laboratory for keeping *Vorticella* seed. The test organism *Vorticella* sp. was isolated from culture water of rotifer mass culture tanks. The cyst of *Vorticella* was formed by dried-method for the formation and maintainance of cyst. MCCF (Marine Ciliate Cyst Formation) medium was used for cyst formation (incystment), preservation and return to moving cell (excystment) of the marine ciliate, *Vorticella* sp. The cyst shape and size were elliptical type and  $30.51 \pm 1.98 \mu\text{m}$  (Avg.  $\pm$  SD) of major axis and  $28.89 \pm 2.12 \mu\text{m}$  (Avg.  $\pm$  SD) of minor axis ( $n=10$ ). The *Vorticella* cyst was kept in the room temperature ( $10\sim 35^\circ\text{C}$ ) and total dark condition (24D:0L) during 1 year. The preserved cyst was transferred to moving cell state (excystment) only by the addition of fresh sea water in the MCCF medium. The five *Vorticella* sp. moving cells of excysted from cysts showed the growth up to  $912 \pm 64$  cells/10 ml in MCCF medium during the culture period of 16 days. This MCCF medium was very useful tool for cyst formation and species preservation of marine ciliate *Vorticella*.

Key words: cyst formation, marine ciliate, MCCF (marine ciliate cyst formation) medium, *Vorticella* sp.

#### 서 론

원생생물계 (Protista), 섬모충문 (Ciliophora), 소막강 (Oligohymenophorea), 녹모아강 (Peritrichia), 녹모목 (Peritrichida), 정착아목 (Sessilina), 볼티셀라과 (Vorticellidae)에 속하며 (内田, 1962), 흔히 종벌레라고 불리우는 *Vorticella*는 해양, 호수, 하천 그리고 논밭등 전수계 환경하에서 흔히 관찰된다. *Vorticella*는 비균체성으로 돌, 낙엽, 수초, 수생동물의 몸 표면 등에 부착해서 수중의 세균을 먹이로 한다 (重中, 1988; Hausmann et al., 1985).

생식은 출아법의 무성 생식과 접합법의 유성 생식의 양성 생식을 하며, 부착 생활을 하는 무성 생식의 어떤 시기에는 줄기모양의 부착용 수축기구인 스파스모넴 (spasmoneme)을 가지지 않는 테로트로크 (telotroch)라 불리우는 유영 개체를 만든다 (重中, 1988; Hausmann et al., 1985). 그리고 줄기를 뺀어 섬모를 활발히 움직이면서 수중에 존재하는 세균을 포식하던 운동형의 *Vorticella*는 환경수의 건조, 증발에 의한 자극을 받으면, 몸체가 점점 구형으로 바뀌면서 결국 갖고 있던 수축기구 (spasmoneme)를 떨어뜨리고 세포 내부 과립의 운동이 정지되면서 직경 약  $20\sim 30 \mu\text{m}$  정도의 휴지형 세포가 된다. 이 휴지형 세포의 표면은 얇은 포낭으로 덮혀, 건조와 같은 악조건에서도 종족을 유지한다 (小川, 1978).

해산어 종묘배양시설의 로티퍼 대량 배양조에서 흔재 생물로서 흔히 관찰되는 (Jung et al., 1997a) *Vorticella*는 로티퍼의 배양조 내에서 로티퍼의 증식을 억제시키는 섬모충 *Euplotes*와 흔재 세균을 둘러싸고 먹이 경쟁을 하여, 간접적으로는 로티퍼의 증식을 촉진시키는 역할을 했다 (Jung, 1997b). 즉, 세균 식성을 갖고 있는 *Vorticella*는 로티퍼 배양조의 미소생물 (원생동물이나 세균과

같은 Microbiota) 환경 제어 (Jung, 1997b) 등의 다양한 용도로써 이용 가능하게 되었다. 이 연구에서는 *Vorticella*를 장기 보존하기 위한 방법으로서, *Vorticella*의 cyst 형성 및 *Vorticella*의 먹이가 되는 세균이 증식할 수 있는 배지를 검색하는 과정에서 자체적으로 제작한 MCCF (Marine Ciliate Cyst Formation) 배지의 이용 결과에 대하여 보고한다.

#### 재료 및 방법

##### 1. *Vorticella*의 분리 및 단일종 배양

실험에 사용한 *Vorticella* sp.는 해산 자치어의 먹이 생물로서 가장 널리 이용되고 있는 동물성 플랑크톤인 로티퍼의 대량 배양조에서 분리했다. 분리한 *Vorticella* sp.는 단일종 순수배양에 의해 개체수를 증식시킨 후 속명 수준에서의 분류학적 검토를 한 결과, *Vorticella* sp.임을 확인했다 (内田, 1962).

##### 2. *Vorticella* cyst의 형성법

먼저, 단일종 배양 (mono-culture)된 *Vorticella*의 개체수가 일정 수준 ( $10$ 개체/ml) 이상에 도달하면, 배양 용기 전체를 잘 각반한 후, 배양액의 일부 ( $10$  ml)를 해양 섬모충 cyst 형성용 배지 (이하 MCCF-Marine Ciliate Cyst Formation-medium이라고 한다; Table 1)에 넣었다. 배지의 조성은 *Vorticella*의 먹이가 될 수 있는 세균의 증식을 도모하기 위하여 일반적으로 세균의 증식 배지용으로 널리 이용되고 있는 Bacto pepton, Bacto agar 그리고 Yeast extract를 첨가하였다. 첨가량은 해양 세균의 증식 배지용으로

**Table 1. MCCF (Marine Ciliate Cyst Formation) medium**

Bacto pepton	0.5 g
Bacto agar	1.5 g
Yeast extract	0.1 g
Centrifuged top-water of rotifer culture water	20 ml
Filtered sea water (22ppt)	80 ml
pH	7.8

널리 이용되는 Zobell 2216E 배지 (reviewed by Balompapueng, 1996)를 참고하였다. 그리고 배지에의 세균 접종원으로서 로티퍼 배양조의 배양수를 원심 분리 (3,000 rpm에서 10분간)한 후 그 상등액을 첨가하였으며, 온도 25°C에서 배양하면서 MCCF 배지의 표면 전체에 *Vorticella*가 부착하기를 기다렸다.

*Vorticella*가 끌고루 부착한 MCCF 배지만을 선택, 멸균 여과 해수로 표면을 2~3회 가볍게 씻어준 후, 다시 여과 멸균해수를 5 ml 보충하여, 멸균 상자에 넣었다. 그리고 MCCF배지가 들어있는 용기의 뚜껑을 열어 배양수를 서서히 건조 증발시켰다 (약 24시간 정도 소요). 이 과정에서 부착형의 *Vorticella* (Fig. 1a)는 여과 섭식 활동을 정지하고, 배지의 표면에 잠복하기 시작하였다 (Fig. 1b). 건조는 배지 표면이 갈라지지 않는 범위하에서 현미경으로 계속 관찰하면서 cyst (Fig. 1c)가 형성될때까지 건조시켰다.

**3. *Vorticella* cyst의 보존과 활동형 세포에의 복귀**

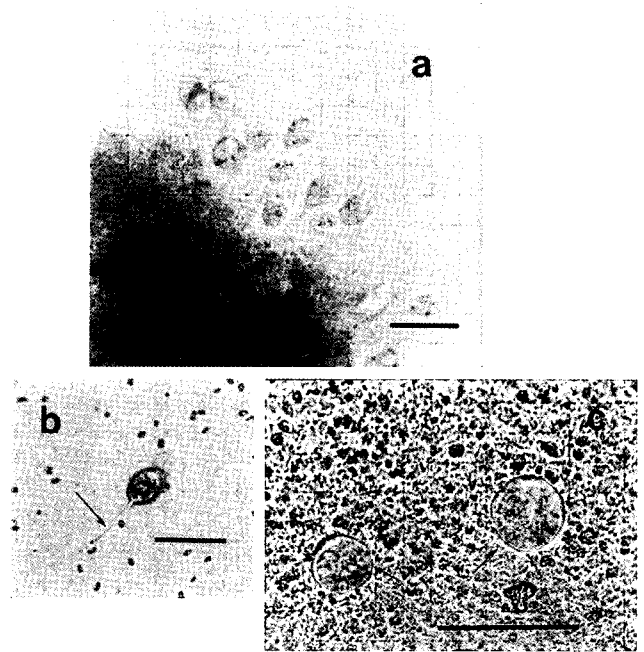
cyst가 형성된 용기는 parafilm (American Can Co., USA)으로 밀봉하고, 은박지로 감싼후 암조건하에서 실온 보존하였으며 (온도 범위 10~35°C), cyst 형성후 1년 동안 보존하였다. 한편, 보존중인 cyst를 이용하여 활동형 세포로 복귀시킬때는 보존중인 용기에 여과 멸균 해수를 10 ml 넣어주었다. 이 실험에 사용한 여과 멸균 해수는 증류수를 섞어가면서 염분 농도를 22‰가 되도록 희석한 후 GF/C 여과지로 여과 후, 120°C에서 20분간 건조 멸균 처리하였다.

**결과 및 고찰**

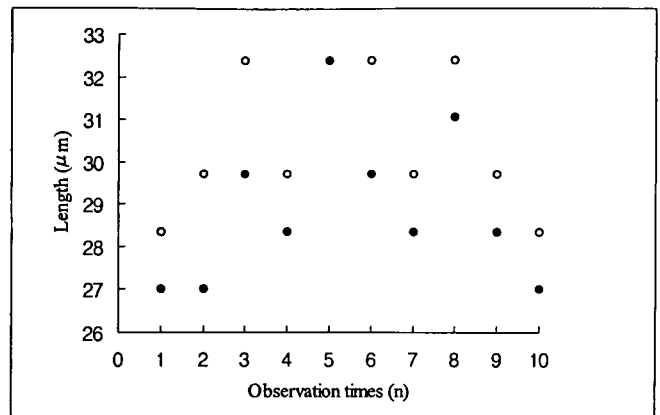
*Vorticella* (Fig. 1a)의 cyst 형성 과정은 MCCF 배지내의 사육수가 증발함에 따라 여과 섭식 활동의 정지, 배지 표면의 잠복 (Fig. 1b), 스파스모넨의 탈락 그리고 cyst의 형성 (Fig. 1c)의 순으로 진행되었다.

형성된 *Vorticella* cyst의 모양은 한쪽 길이가 다른 한쪽의 길이보다 평균 1.62 μm가 긴 타원형을 하고 있었다. 형성된 cyst의 크기는 장경이 30.51 ± 1.98 μm (Avg. ± SD로 28.35~32.4 μm의 범위)이었고, 단경은 28.89 ± 2.12 μm (범위는 27~32.4 μm 범위)이었다 (n=10) (Fig. 2).

1년간에 걸쳐서 장기보존중이던 cyst는 보존중인 MCCF 배지에 신선한 여과 멸균 해수를 첨가하는 간단한 방법만으로 활동형 세포에의 복귀가 가능했다. cyst로부터 활동형 세포로 복귀한 *Vorticella* sp.는 배지내에 로티퍼 사육수의 원심 분리 (3,000 rpm에서 10분간) 상등액을 넣어줌으로서 16일간의 배양 기간중에 최고



**Fig. 1. Marine ciliate species, *Vorticella* sp. a: moving cells, b: formed cyst on the route (arrow indicated spasmoneme), c: *Vorticella* cyst. All of scale bar-100 μm.**



**Fig. 2. Formed *Vorticella* cyst sizes by MCCF medium. ○: major axis of cyst, ●: minor axis of cyst (μm)**

밀도가 912 ± 64개체/10 ml (Avg. ± SD)까지 증식하였다 (Fig. 3).

小川 (1978)는 담수산 *Vorticella*의 먹이가 되는 세균을 증식시키기 위해서 배양 용기안에 쌀알을 넣어 주었으나, 이 연구에서는 해양 세균의 영양원으로서 bacto pepton, bacto agar, yeast extract 그리고 로티퍼 배양조의 원심 분리상등액 (3000rpm에서 10분간 원심 분리 후 상등액을 세균의 접종원으로 했다)을 포함하고 있는 MCCF 배지를 첨가 후 사육수중에 *Vorticella*의 먹이가 되는 세균이 증식할 수 있도록 하였다.

로티퍼는 개체군의 밀도가 높아지면서 양성생식이 유도된 후, cyst 형성 과정이 진행되어, 로티퍼 밀도의 증가에 따라 먹이가 부족해지면 로티퍼 cyst의 형성은 다시 억제되기 시작한다 (Hagiwara, 1996). 그리고, 해산 물벼룩류는 단위 생식에 의해 활발히

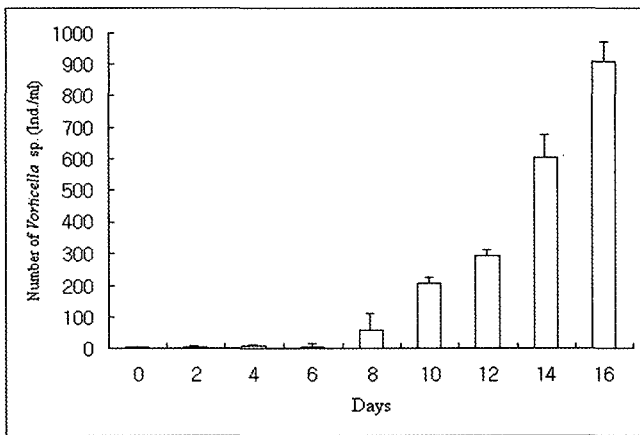


Fig. 3. Growth of excysted *Vorticella* sp. in the MCCF medium mixed with centrifuged top-water of rotifer culture waters.

증식한 개체군이 최고밀도에 도달하기 직전부터 유성 생식의 발현이 시작되면서 개체군의 밀도가 갑작스럽게 감소되고 cyst 형성이 높아진다. 그리고 단위 생식란의 포란율이 가장 작을 때 유성 생식의 빈도가 가장 높아진다 (Onbe, 1973). 이 실험에서는 cyst 형성을 유도하기 위하여 *Vorticella*에게 악조건으로서 건조라는 조건을 부여하였다. 환경 변화에 민감하게 반응한 섬모충 *Vorticella*는 로티퍼 또는 해산 물벼룩류의 경우와는 달리 양성 생식에의 인위적인 유도과정은 거칠 필요없이 건조라는 간단한 방법만으로 cyst 형성이 가능하였다.

이 실험에서는 cyst를 형성한 후 약 1년의 보존 기간을 거친 후 다시 cyst에서 활동형 세포의 배양이 가능한지 검토한 결과, 보존 중인 MCCF 배지에 해수를 첨가하는 간단한 방법만으로 활동형 세포를 얻을 수 있었으며, cyst로부터 부화된 활동형 세포는 로티퍼 배양수조의 부영양화된 배양수를 첨가하는 방법으로 쉽게 배양이 가능하였다. 보고에 의하면 어떤 종의 원생동물의 cyst는 10~15년 이상의 보존이 가능하다고 한다 (Hausmann et al., 1985). 그러나 로티퍼의 경우는 보존 기간이 경과함에 따라 cyst의 부화율이 떨어지므로 부화율을 향상시키기 위해서는 cyst의 호흡공을 막고 있는 세균을 살균제를 사용하여 제거하여야 한다 (Balompapung, 1996).

이 연구에서는 해산 섬모충 *Vorticella*의 cyst를 손쉽게 형성시키기 위하여 MCCF 배지를 이용하였다. MCCF 배지는 *Vorticella*가 건조라고 하는 악조건하에서 cyst를 형성할 경우 배지중에 잠복할 수 있도록하여, 안정적인 cyst 형성이 가능하였다. 그 결과, 1년이라는 보존 기간을 거친 후에도 활동형 세포로의 복귀가 간단히 이루어졌다.

## 요 약

해산어 종묘 생산과정에서 초기 먹이생물로서 이용되는 로티퍼

의 대량 배양조에서 *Vorticella*는 로티퍼의 증식을 향상시킬뿐만 아니라, 배양조내에서 로티퍼의 증식을 억제시키는 유해한 섬모충과 세균의 증식을 억제한다. 이 연구에서는 *Vorticella* cyst의 형성과 보존에 MCCF (Marine Ciliate Cyst Formation) 배지가 이용 가능함을 알 수 있었다.

*Vorticella*의 cyst 형성 과정은 MCCF 배지내의 사육수가 증발함에 따라 여과 섭식 활동의 정지, 배지 표면의 잠복, 스파스모넬의 탈락 그리고 cyst의 형성의 순으로 진행되었다. 그리고 1년에 걸친 장기 보존후에도 배지중에 해수를 첨가하는 간단한 방법만으로 활동형 세포로의 복귀가 가능했다.

형성된 *Vorticella* cyst의 모양은 한쪽 길이가 다른 한쪽의 길이보다 긴 타원형을 하고 있었으며, cyst의 크기는 장경이  $30.51 \pm 1.98 \mu\text{m}$  (Avg.  $\pm$  SD로  $28.35 \sim 32.40 \mu\text{m}$ 의 범위)이었고, 단경은  $28.89 \pm 2.12 \mu\text{m}$  (범위는  $27 \sim 32.40 \mu\text{m}$ )이었다. cyst로부터 활동형 세포로 복귀한 *Vorticella* sp.는 배양중인 배지내에 로티퍼 사육수의 원심 분리 상등액을 넣어줌으로 16일간의 배양 기간중 최고 밀도가  $912 \pm 64$ 개체/10 ml (Avg.  $\pm$  SD)까지 증식하였다.

이 실험에서 *Vorticella*의 cyst 형성과 종 보존을 위하여 사용한 MCCF 배지는 cyst를 형성시키고 보존하는데 이용 가능한 배지임을 알 수 있다. 더욱이 *Vorticella*와 같은 해산 섬모충의 cyst를 손쉽게 만들 수 있는 유용한 방법을 이 연구를 통하여 제시 가능하였다.

## 참 고 문 헌

- Balompapung, M.D., 1996. Studies on technological development of mass production and preservation of marine rotifer *Brachionus plicatilis* resting eggs. Doctoral thesis of Nagasaki University in Japan, 127 pp.
- Hagiwara, A., 1996. Use of resting eggs for mass preservation of marine rotifers. Saibai Giken, 24, 109~120.
- Hausmann, K., M. Mulisch and D.J. Patterson, 1985. Protozoologie. Copyright by Georg Thieme Verlag. Japanese translation by Ogi moto keiji 1989. Protozoologie. Kou-Gaku Printed Co., 252 pp.
- Jung, M.M., A. Hagiwara and K. Hirayama, 1997a. Interspecific interactions in the marine rotifer microcosm. Hydrobiologia, 358, 121~126.
- Jung, M.M., 1997b. Interspecific interactions in the rotifer *Brachionus rotundiformis* culture tank. Doctoral thesis of Nagasaki University in Japan, 99 pp.
- Onbe, T., 1973. Preliminary notes on the biology of the resting eggs of marine cladocerans. Bull. Plankton Soc. Japan, 20, 74~77.
- 重中 義信, 1988. 原生動物の觀察と實驗法. 共立出版株式會社, 東京, 251 pp.
- 内田 亨, 1962. 動物系統分類學, 第1卷 總論 原生動物. 中山書店, 東京, 342 pp.
- 小川 雅康, 1978. ツリガネムシの保存法. 採集と飼育, 40, 387~389.

1999년 1월 4일 접수

1999년 5월 8일 수리