

■ 양식기술특집 ① ■

## 일반 독자를 위한 양식 정보 시리즈

V. 해산어의 종묘 생산 과정에서 먹이 생물로 이용되는 식물·동물 먹이생물의 단일종 배양 (mono-species culture), 스트레인 배양(strain culture) 그리고 무균 배양(axenic culture)

이번 호에서는 먹이생물 관련 양식 정보 시리즈 여섯 번째로 수산 증양식 분야에서 어린 유생의 먹이로서 이용되는 식물·동물 먹이생물의 배양 방법으로서 대량 배양으로 들어가기 전에 선결되어야 할 단일종 배양, 스트레인 배양 그리고 무균 배양에 대하여 기술한다.

제주대학교 해양연구소 정민민  
 제주대학교 해양과학대학 증식학과 노섬

### 1. 단일종 배양, 스트레인 배양 그리고 무균 배양의 정의

**수**산 증양식 분야의 먹이생물학에서 정의하는 단일종 배양 (mono-species culture)이란 목적으로 하는 식물이나 동물 먹이생물 한 종만이 존재하는 배양 상태를 단일종 배양이라고 할 수 있다. 예를 들면, 로티퍼의 배양 과정에서 로티퍼의 먹이로서 널리 이용되는 *Nannochloropsis oculata*라는 식물 먹이생물의 배양에서는 다른 종의 식물 먹이생물이나 동물 먹이생물이 혼재되어 있지 않은 *Nannochloropsis oculata*만이 먹이생물로서 존재하는 상태를 단일종 배양된 상태라고 할 수 있다. 단, 먹이생물학에서 단일종 배양의 상태는 배양수중에 혼재되어 있는 박테리아는 무시한 상태이다. 그리고 로티퍼를 예로 들면 배양을 목적으로 하고 있는 로티퍼만이 배양되고 있는 상태로 로티퍼의 배양 과정에서 혼재생물로서 흔히 관찰되는 원생동물의 섬모충과 같은 혼재생물이 완전히 배제된 상태를 로티퍼의 단일종 배양이라고 정의할

수 있다. 물론, 로티퍼의 단일종 배양수중에 혼재되어 있는 박테리아는 무시한 상태이다.

한편, 스트레인 배양 (strain culture)이란 단일종 배양된 한 종의 식물·동물 먹이생물 중에서도 배양 환경이나 배양 목적에 따라서 장기간에 걸쳐서 동일종의 다른 먹이생물과 격리 배양되는 과정에서 그 종의 생물학적 특성이 변화되어 동일종의 다른 배양 생물과는 다른 배양 특징이 관찰되는 것을 스트레인화 되었다고 한다. 스트레인 배양은 계통 배양이라고도 하는데, 계통이라는 단어가 의미하듯이 같은 종내에서도 생물학적으로 다른 계통과 특징상 차이가 관찰됨을 의미한다. 먹이생물학에서 말하는 스트레인 배양은 지역, 시간, 배양 환경 등에 의하여 생물학적 특징이 격리된 상태에서 진화하면서 새로운 생물학적 특징을 가짐으로서 이루어진다.

무균 배양 (axenic culture)이란 단일종 배양 또는 스트레인 배양한 후, 그 배양 환경에서 박테리아의 영향을 완전히 배제한 상태를 말한다. 즉, 그 배양수중에 살아있는 생물은 배양을 목적으로 하는 먹이생물 한 종만이 존재하는 것을

의미한다.

## 2. 단일종 배양의 필요성

해산어의 종묘 생산 과정에서 먹이생물로서 가장 널리 이용되는 로티퍼의 대량 배양 과정에서는 로티퍼 이외의 수많은 다른 생물, 즉 배양을 목적으로 하는 동물 먹이생물로서 로티퍼 이외의 원생동물이나 코페포다와 같은 혼재생물이 관찰된다. 이들 혼재생물은 로티퍼의 배양 과정에서 다양한 생태적 천이를 거치는 것으로 알려져 있는데, 그 과정에서 로티퍼의 배양조에서 관찰되는 혼재생물은 로티퍼의 증식에 다양한 영향을 미쳐 로티퍼의 밀도를 감소시키거나, 로티퍼의 안정 배양을 저해하는 요소로서 작용한다(Jung, 1997). 그러므로 먹이생물로서 로티퍼를 배양하고자 하는 경우에는 로티퍼 이외의 다른 생물(혼재생물)을 배양수조로부터 제거하여 주어야 할 필요성이 있다. 이 과정에서 배양을 목적으로 하는 생물이 포함되어 있지 않은 로티퍼 단일종만의 배양이 필요하게 된다. 특히, 최근 그 배양 효율이 매우 높은 것으로 알려져 있는 로티퍼의 초고밀도배양(high density culture)과 같은 집약적인 관리가 필요한 배양 방법에서 배양을 목적으로 하지 않은 다른 혼재생물이 배양 시스템에 혼재되었을때는 그 배양이 틀림없이 실패하는 것으로 알려지고 있다.

이와 같이 로티퍼의 단일종 배양은 어떠한 배양법으로 로티퍼를 배양하든 항상 선결되어야 하는 절대 필요 사항이다.

## 3. 스트레인 배양의 필요성

먹이생물로서 이용되는 로티퍼는 수많은 이 름이 있다. 예를 들면, 타이산 로티퍼, 동경대학 산 로티퍼, 나가사키대학 산 로티퍼등.... 이와 같

이 부가되는 로티퍼의 산지명이 결국 로티퍼의 스트레인명이 되는 경우가 많다. 한편, 지금은 두 종간에 분류학적 재고찰이 이루어져 완전히 다른 종명으로서 확립되어 있지만, 과거 동경대학 산 로티퍼에 비하면 타이산 로티퍼는 그 크기가 매우 작기 때문에 대형의 로티퍼로서는 해산어의 어린 시기에 먹이생물로서 효율이 낮았던 경우, 동경대학 산 로티퍼 보다 작은 크기의 타이산 로티퍼를 사용함으로써 먹이생물의 크기면에서 해산어의 자어가 먹이로서 이용할 수 있는 효율을 높일 수 있었다. 이와 같이 로티퍼는 스트레인에 따라서 그 크기나 배양 환경이 다를 수 있다. 그러므로 목적에 가장 적합한 로티퍼의 스트레인을 먹이생물로서 이용하게 되면 사육하고 있는 자어의 생존율을 향상시킬 수 있다. (지금은 동경대학 산 로티퍼와 타이산 로티퍼는 여러 가지 생물학적 특징이 다른 것이 규명되어 동경대학 산 로티퍼는 *Brachionus plicatilis*로 타이산 로티퍼는 *Brachionus rotundiformis*로 학명이 재정립되었다. 물론, 수산 증양식학에서 이용되는 식물 먹이생물도 여러 가지 생물학적 특징에 의하여 동일종 내에서도 다양한 스트레인명으로 그 먹이생물의 특징이 구분될 수 있다.

그러므로 식물 또는 동물 먹이생물의 생물학적 특징에 따라서 부가되는 스트레인명은 그 생물의 생물학적 특징을 계통으로서 계속 유지하고, 산업적으로 그리고 학문적으로 유용하게 이용하기 위해서는 그 생물 고유의 생물학적 특징에 의하여 부가된 스트레인명은 계속 유지되어야 한다.

## 4. 무균 배양의 필요성

해산어의 종묘생산 과정에서 자치어의 대량 폐사를 일으키는 병원성 생물(병원성 원생동물 또는 병원성 박테리아)을 자치어 사육조에 전달

하는 주요 매개체로는 먹이로 급이되는 로티퍼와 로티퍼의 먹이가 되는 식물 먹이생물이 지적되고 있다 (Miyakawa and Muroga, 1988; Yamanoi and Sugiyama, 1987; Yu et al., 1990; Yamauchi, 1993; 日野, 1988).

이와 같은 배경하에서 무분별하게 이루어지는 배양수조간 또는 종묘배양 시설간의 로티퍼의 이동은 병원성 생물의 감염 지역을 넓히는 중요한 원인이 될 수도 있다. 그러므로 해산어의 종묘 생산과정에서 병원성 박테리아나 원생동물의 증식 및 확산을 예방하기 위해서라도 수산 증양식 과정에서 먹이로서 이용되는 모든 먹이생물의 종 보존 배양 과정은 근본적으로 무균 배양이 이루어져야 할 필요성이 높다.

표 1. 식물 먹이생물 무균 처리용 Erd-schreiber and agar 한천 플레이트 매디움

염분 22‰로 희석한 여과 멸균 해수	1000ml
NaNO <sub>3</sub>	100mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	20mg
Vitamine B <sub>12</sub> (0.5µg)	3ml
Thiamine HCl (200µg)	3ml
Tris (Tris hydroxymethyl aminomethane)	100mg
NTA (Nitrilotriacetic acid)	100mg
Soil Extract	50ml
Agar	3g
pH 조정	7.8

(1) 식물 먹이생물의 무균 배양

*Nannochloropsis oculata*는 로티퍼를 배양하는데 있어서 가장 보편화되어 있는 로티퍼의 먹이다 (Maruyama et al., 1986). 그리고 해산어의 종묘 생산과정에서 사육중인 자어가 외부로부터 받는 물리적인 자극에 대하여 비교적 자극

을 줄이기 위한 목적으로 즉, 스트레스 방지용으로서 자어 사육수조에 첨가하는데도 이용되고 있다. 이와 같이 수산 증양식 분야에서 널리 이용되는 *Nannochloropsis oculata*와 같은 식물 먹이생물의 종 보존 배양 과정에서는 무균 배양 상태에서 관리되어야 한다. *Nannochloropsis oculata*와 같은 식물 먹이생물의 무균 배양 과정에서는 배양수중의 박테리아를 배제시키기 위해 항생제를 사용하여서는 안 된다. 식물 먹이생물의 배양 과정에서 사용되는 항생제는 배양을 목적으로 하는 식물 먹이생물의 생물학적 특성을 변형시키거나, 대량 배양되는 과정에서 항생제 노출에 의한 증식 장애 현상이 보고되고 있기 때문이다.

그러므로 수산 증양식 분야에서 먹이생물로 이용되는 식물 먹이생물은 항생제나 살균제를 사용하지 않는 방법으로서 무균 처리되어야 한다. 식물 먹이생물의 무균 처리는 수차례의 도말과 재접종이 반복되는 한천 플레이트매디움을 이용한 희석법으로 이루어져야 한다. 식물 먹이생물의 무균 처리 과정에서 이용되는 한천 플레이트매디움은 Erd-schreiber and agar 배지가 이용 가능한데, 이 배지의 조성은 다음과 같다 (Jung, 1997).

(2) 동물 먹이생물의 무균 배양

인위적으로 모든 배양 조건이 철저하게 관리되는 호적 조건의 상태에서 관리 배양된 로티퍼의 체내의 그리고 배양수에는 수많은 종류의 박테리아가 공존하고 있다. 온도, 영양원등 모든 조건이 갖추어진 로티퍼의 대량배양조에는 육내 수조, 육외 수조를 막론하고 연중 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU/g의 고밀도의 박테리아가 존재한다(Miyakawa and Muroga, 1988; Yamanoi and Sugiyama, 1987; Yamauchi, 1993). 그중에는 강

한 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). 그리고, 로티퍼의 배양을 연중 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 박테리아는 로티퍼의 증식 억제에는 물론 해산 자치어의 대량 폐사를 불러일으킬 수도 있다. 로티퍼의 대량 배양조에서 분리된 비브리오균(*Vibrio*)은 로티퍼의 증식을 억제했으며(Yu et al., 1990), 더욱이 분리된 *Vibrio*균은 해산 자치어의 생존율에도 악영향을 주었다(Tanasomwang and Muroga, 1992).

그러므로 수산 증양식 분야에서 먹이생물로 이용되는 모든 동물 먹이생물의 대량 배양 과정에서는 무균을 통해 배양 관리, 보존중인 종을 이용하는 것이 바람직하다고 할 수 있다. 수산 증양식 현장에서 동물 먹이생물로 널리 이용되는 로티퍼나 코페포다와 같은 동물 먹이생물도 무균 배양이 가능한데, 이와 같은 동물 먹이생물

의 무균 처리에는 개량형 항생제 혼합액 AM9을 사용하여 무균 처리한다(Jung, 1997). 무균 처리가 완료된 동물 먹이생물은 미리 배양 준비된 무균 배양 상태의 식물 먹이생물을 먹이로 급이 하면서 무균 상태의 동물 먹이생물을 연속 유지 배양할 수 있다.

### 5. 먹이생물의 무균 배양에서 기대되는 효과

무균 배양에서는 로티퍼의 증식이 비교적 안정적인 것에 비교하면 무균 처리하지 않은 일반 배양에서 로티퍼 *Brachionus rotundiformis*의 증식은 불안정적으로 각 시기에 따라서 심한 증식의 차이가 관찰되었다 (Jung, 1997). 이와 같은 결과는 무균 처리하지 않은 일반 배양 상태에서는 혼재되어 있는 박테리아에 의해 배양을 목적으로 하는 로티퍼의 증식이 억제되었기 때문이다. 뿐만 아니라, 배양수중에서 관찰된 박테리아는 로티퍼 *Brachionus rotundiformis*와 같은 동물 먹이생물의 증식뿐만 아니라, *Nannochloropsis oculata*와 같은 식물 먹이생물의 증식에도 악영향을 미치는 것을 알 수 있었다 (Jung, 1997).

그러므로 먹이 생물의 무균 배양은 로티퍼와 같은 동물 먹이생물 뿐만 아니라 식물 먹이생물의 상호 분양 과정에서 발생하는 병원성 세균의 확산을 미연에 방지할 수 있으며, 대량 배양용 식물 또는 동물 먹이생물의 종 보존 방법으로서 유효한 방법이라고 판단된다.

### 6. 참고문헌

I., T. Nakamura, T. Matsubayashi, Y. Ando and T. Maeda, 1986. Identification of the alga known as marine *Chlorella* as a member of the eustigmatophyceae. Japan J. Phycol., 34:

표 2. 동물 먹이생물 무균 처리용 개량형 항생제 혼합액 AM9

Polymixin B sulfate (5million un 7900 USP units/mg)	22mg
Streptomycin sulfate (1g titer)	660mg
Tetracycline crystalline	26mg
Chloramphenicol (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> C <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	56mg
Crystalline Penicillin G potassium (200 thousand unit)	2.5mg
Neomycin sulfate (660µg base/mg)	0.4mg
염분 22%의 여과 멸균 해수	100ml

- 319-325.
- Miyakawa, M. and K. Muroga, 1988. Bacterial flora of cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. SUISANZOSHOKU 35: 237-243.
- Jung, Min-Min, 1997. Interspecific interactions in the rotifer *Brachionus rotundiformis* culture tank. Doctoral thesis of Nagasaki University of Japan. 99pp.
- 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: 191-195.
- Yamauchi, S., 1993. Effect of antibacterial substances on the growth of rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi 59: 1001-1006.
- 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: 1455-1460.
- 日野明德, 1988. ワムシの生物学と培養上の問題点. さいばい. 社団法人日本栽培漁業協會 51: 16-36.