

## *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae)의 증식 상태 판단기준으로서 생산력 활성 지수의 보정과 이용

정민민 · 김형신<sup>1</sup> · 위종환<sup>2</sup>

국립수산과학원 제주수산연구소 종보존연구센터, <sup>1</sup>제주대학교 기초과학연구소,  
<sup>2</sup>경상북도 수산자원개발연구소

### Calibration and Utilization of Reproduction Activity Index (RAI) for the Judgement of Microalga *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae) Growth Situation

Min-Min Jung, Hyeung-Sin Kim<sup>1</sup> and Chong-Hwan Wi<sup>2</sup>

Marine Species Conservation Center, Jeju Fisheries Research Institute, National Fisheries  
Research and Development Institute, Jeju-do 699-804, KOREA

<sup>1</sup>Research Institute for Basic Science, Jeju National University,

Ara-1 Dong, Jeju-Si, Jeju-Do 690-756, Korea

<sup>2</sup>Gyeongsangbukdo Fishery Resources Development Institute, Gyeongsangbuk-do 766-850, Korea

The microalgae are important and useful as live food organisms for the bivalves, shrimps and rotifer culture. But, the culture of microalgae sometimes suddenly decreased. These events are not aspect. In this study, we analyzed the relation between growth of population and frequency of reproduction for stable production of a common microalgae, *Tetraselmis suecica*. Culture was set at 34 ppt of salinity and temperature at 20°C. Photo-period was kept the all light condition (24L:0D) for culture condition except all dark culture experiment for calibration of reproduction activity index (RAI, %). Light intensity was maintained from 1000 to 1700 lux. The calculation of reproduction activity index (RAI, %) was the percent of cell division numbers/total cell number × 100 in the samples. The percent of RAI were the lowest at the sudden drop and stagnant growth phase of *T. suecica* cultures. *T. suecica* were not grown at the lowest RAI percent in spite of high inoculation densities of *T.*

*suecica* in the culture starting time. Moreover, we observed sudden drop of RAI percent and stagnant growth phase of *T. suecica* in the culture without nutrient source and all dark culture conditions. On the other hand, we observed improvement in the growth situation of *T. suecica* culture density after sudden increase of RAI percent. These results suggested to the useful tools of RAI for the judgment and forecast of microalgal growth situation of *Tetraselmis*.

**Key words:** microalgae, prasinophyceae, reproduction activity index (RAI, %), *Tetraselmis suecica*

## 서 론

미세조류의 안정적인 배양을 유지하는 것은 패류, 갑각류의 종묘 생산과정이나 해산 자어의 초기 먹이로 이용되고 있는 로티퍼(rotifer)와 같은 동물 먹이생물의 대량 배양에 있어서 가장 먼저 갖추어져야 할 기본 요소이다. 그 중 대량 배양에 관한 연구가 비교적 많이 진행되어 있는 *Tetraselmis*는 현재 대량 배양되어 널리 이용되고 있는 *Nannochloropsis*와 함께 증식 적정 환경 범위가 광범위하다는 장점이 있어 수산생물의 어린 시기에 초기 먹이생물로서 널리 이용되고 있다(Okauchi and Fukusho 1984a). *Tetraselmis*는 굴, 대합과 같은 이매패류(Davis and Guillard 1958; Romberger and Epifanio 1981), 보리새우(Okauchi and Hirano 1986)와 같은 갑각류 유생의 먹이로 이용될 뿐만 아니라 넙치, 농어 등과 같은 해산 자어의 초기 먹이생물로 이용되는 로티퍼 배양용 미세조류로서도(Gatesoupe and Luquet 1981; Yufera 1982; Hirano and Hirayama 1984; Okauchi and Fukusho 1984b; Fukusho et al. 1985) 그 가치가 인정되어 있다.

그러나 *Tetraselmis*와 같은 미세조류의 대량 배양과정에서는 아직도 증식 밀도가 갑자기 급감하는 경우가 종종 관찰되는데, 이와 같이 갑작스럽게 일어나는 증식 불량 상태의 사전 예측은 현재로서는 사실상 불가능한 실정이었다. 이 연구에서는 위와 같은 증식 불량 현상을 사전에 가능한 한 빨리 예측 가능하도록 하기 위한 한 가지 방안으로서 배양중인 *Tetraselmis*의 총 개체 수 중에서 분열 진행중인 *Tetraselmis*가 차지하는 비율 즉, 생산력 활성 지수(Reproduction Activity Index; RAI)를 계산, 보정함으로써 *Tetraselmis*의 배양 상태가 악화되기 이전에 *Tetraselmis*의 증식 상태를 파악하고, 아울러 앞으로의 *Tetraselmis* 증식 상태의 진행 방향을 예측할 수 있게 함으로써 미세조류의 대량 배양에 있어서 안정적인 배양 밀도 유지와 계획 생산이 가능하도록 하고자 하였다.

## 재료 및 방법

실험에 사용한 미세조류 *Tetraselmis suecica*는 실내 배양조건하에서 종 보존 배양중이던 것을 사용하였다. 배양용 배지는

Guillard and Ryther(일명 F/2 medium) 배지를 사용하였다(Guillard and Ryther 1962). 배양액은 카트리지 필터 또는 GF/C 필터로 여과 후, 120°C, 0.11 Mpa의 압력하에서 20분간 고온 고압 멸균기(Sanyo, Japan)로 멸균하였다. 배양 수량은 100 ml에서 1,800 ml의 범위이며, 배양 용기는 삼각 플라스크나 등근 평저 플라스크를 사용하였다. *T. suecica*의 배양 밀도와 RAI의 측정은 혈구계수판(Superior, Germany)을 이용하였으며, 각 실험 조건에서 1 ml씩 임의 채취하여 계수하였다.

배양은 수온 20°C, 염분 34 ppt의 조건하에서 실시하였으며 암배양 조건을 제외한 모든 배양은 24시간 실내 형광등을 이용하여 광을 조사하는 24L : 0D의 조건하에서 실시하였다. 이때의 조도는 1000~1700 lux의 범위였다. 생산력 활성 지수(RAI)의 계산은 혈구계수판 위에 1 ml중의 세포수를 계수하기 위하여 관찰하는 *T. suecica*의 총 개체 수 중에서 현미경을 통하여 이분법에 의하여 분열이 확인되는 개체수가 차지하는 비율을 %로 나타낸 값으로

$RAI(\%) = \frac{\text{분열중인 개체 수}}{\text{총 개체 수}} \times 100$ 으로 표시하였다.

## 결 과

미세조류 *T. suecica*의 배양 과정에서 배양 개시시 접종한 배양 밀도(접종시  $91 \times 10^4$  cells ml<sup>-1</sup>)는 배양 기간이 30일 이상 경과되어도 뚜렷한 증식이 관찰되지 않고 장기간 증식이 정체되는 경우가 관찰되었다(Fig. 1). 이와 같은 경우 배양 용기내의 미세조류

*Tetraselmis*는 거의 분열을 하지 않고 있는 것을 알 수 있었는데 이때의 RAI값은 배양 개시일이 5.5%로 아주 낮은 수치였으며, 배양 개시 후 2일째에 8.5%로 배양 개시일에 비교하여 RAI값은 겨우 3.0% 증가하였을 뿐이었고, 그 후 크게 감소하여 매우 낮은 수치의 RAI값이 지속되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

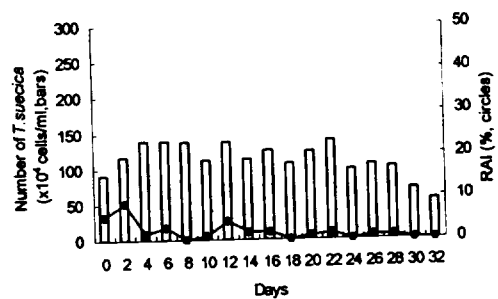


Fig. 1. The relation between poor growth of *T. suecica* and low reproduction activity index (RAI, %).

뿐만 아니라 배양 개시시의 접종 밀도가 비교적 높았던 접종 밀도  $279 \times 10^4$  cells ml<sup>-1</sup>의 배양 조건하에서도 *T. suecica*의 농도가 비교적 고농도였음에도 불구하고, 접종 개시시의 RAI값이 10.4%로 비교적 낮은 상태였고, 배양 개시 후 5일째에는 배양 밀도가  $63 \times 10^4$  cells ml<sup>-1</sup>로 접종 개시시의 약 1/4.4로 크게 감소되는 매우 불안정적인 배양이 관찰되었다(Fig. 2).

한편, 배양 개시시의 접종 밀도가  $100 \times 10^4$  cells ml<sup>-1</sup>로 비교적 높고, RAI값도 90.7%로 상당히 높은 수치의 배양에서도 배양 개시 후 2일째의 RAI값이 22.0%로 급감하고, 6일째에는 다시 5.7%로 크게 감소된 경우, 이 배양에서 *T. suecica*는 배양 기간 중 실험

개시시에 접종 밀도인  $100 \times 10^4$  cells  $ml^{-1}$ 보다 약간 높은  $160 \times 10^4$  cells  $ml^{-1}$  전후의 밀도를 유지하였을 뿐, 기하급수적인 높은 증식은 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

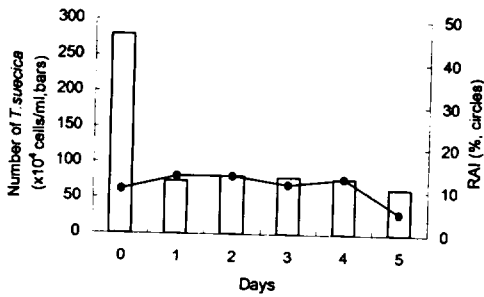


Fig. 2. The low value of RAI (%) as the cause of culture failure in the *T. suecica* culture.

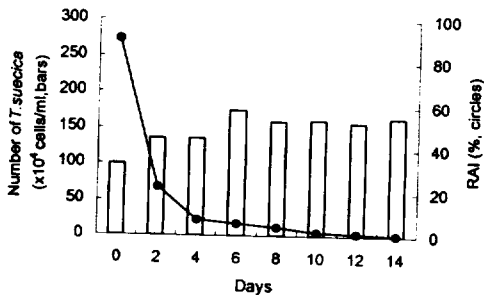


Fig. 3. The relation between stagnant growth phenomenon of *T. suecica* density and sudden drop of reproduction activity index (RAI, %) in the *T. suecica* culture.

그리고 *T. suecica*의 증식 상태를 예측하고 배양조건에 따른 재연성을 검토하기 위하여 *T. suecica*의 배양에 미치는 악조건의 배양 환경 설정 조건으로서 *T. suecica*를 무배지 상태(해수만 첨가한 배양; Fig. 4)와 암흑 상태(24시간 전일 암흑 배양 조건; Fig. 5)에

서 배양밀도와 RAI값의 변화를 관찰한 결과, 배양 개시시 각각 91.0%의 높은 RAI값을 나타낸 *T. suecica*는 배양 개시 후 첫 관찰일인 2일째에 RAI값이 각각 12.7% (Fig. 4)와 2.2% (Fig. 5)로 크게 감소되었으며, 해수만의 무배지 상태에서보다 암흑 배양의 상태에서 더욱 빠른 속도로 RAI값이 감소되는 것이 관찰되었다. 이때 배양을 목적으로 하는 미세조류 *T. suecica*의 밀도는 거의 정체된 배양 상태를 나타내었다(Figs. 4, 5).

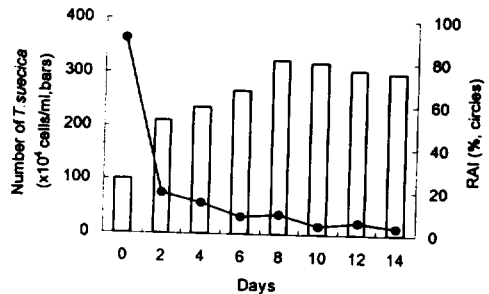


Fig. 4. The growth and RAI (%) of *T. suecica* without nutrient culture media (only sterilized seawater).

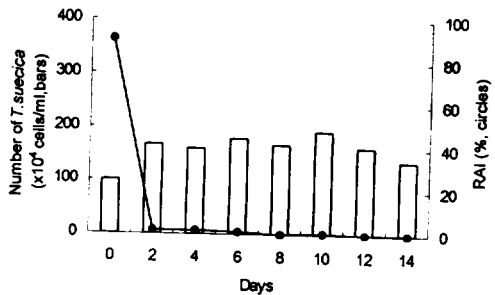


Fig. 5. The growth and RAI (%) of *T. suecica* on the all dark culture condition (OL:24D).

그러나 배양 개시시의 접종 밀도가  $24 \times 10^4$  cells  $ml^{-1}$ 이고, RAI값이 16.7%로 *T.*

*suecica*의 배양 밀도만을 보았을 때, 그 밀도가 계속 정체되는 경향이 관찰되어 배양 상태의 호전 가능성은 거의 희박한 것처럼 보일 뿐만 아니라, 배양 개시 후 4일째의 *T. suecica*의 배양 밀도는  $21 \times 10^4$  cells  $ml^{-1}$ 로 매우 낮았지만, 그 당시의 RAI값은 전 관찰일 5.7%에서 33.3%로 RAI값이 5.8배 이상 급상승하는 것이 관찰되었다(Fig. 6). 결국 이 배양은 다음 관찰일인 배양 개시 후, 6일째에 *T. suecica*의 배양 밀도가 전 관찰일의  $21 \times 10^4$  cells  $ml^{-1}$ 에서  $170 \times 10^4$  cells  $ml^{-1}$ 로 약 8.1배 급증하는 것이 관찰되었다(Fig. 6).

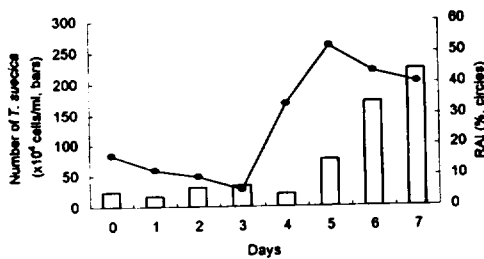


Fig. 6. Comparison with RAI (%) and growth of *T. suecica* for forecast of *T. suecica* growth.

## 고 찰

해산어의 종묘 생산 과정에서 먹이생물로서 이용되는 동물플랑크톤이나 식물플랑크톤(미세조류)의 대량 배양 과정에서는 관리자가 예상하지 못하는 상황에서 배양 중인 먹이생물의 증식이 갑작스럽게 감소되는 경우가 자주 관찰되는데, 이와 같이 예고 없이 발생하는 먹이생물 배양 밀도의 급감 현상은 사육 중인 수산 생물의 생산에 커다란 장애 요소

로서 작용하고 계획적인 생물 생산을 불가능하게 한다.

그 중에서 패류나 갑각류의 어린 초기 유생의 먹이로서 널리 이용되는 미세조류의 배양은 배양 중인 미세조류의 세포 상태가 어떠한 상태인지를 판단하기 어려운 점, 즉 미세조류의 세포가 죽었는지 살아있는지, 아니면 살아있더라도 활력은 어느 정도인지 쉽게 관찰할 수 없다는 이유 때문에 배양 중인 미세조류가 앞으로 어떠한 증식 양상을 보일지는 예측하기가 매우 어렵다. 이 연구에서는 이와 같은 어려움을 해소하기 위한 방법으로서 배양 중인 미세조류의 현재의 증식 상태를 파악하고 앞으로의 증식 상태를 예측하기 위한 방법을 강구하고자 하였다.

실험에 사용한 미세조류 *Tetraselmis*속은 현재 널리 배양이 이루어지고 있는 대표적인 미세조류인 *Nannochloropsis oculata*나 규조류와 함께 비교적 배양이 용이하여 여러 수산생물의 초기 먹이생물로서 널리 이용되고 있는데(Okauchi 1988), 이 연구에서 실험 생물로 이용한 *T. suecica*는 널리 알려진 같은 속의 *Tetraselmis tetrathele*와 함께 식물 먹이생물로서 세계적으로 널리 배양되고 있는 미세조류의 대표종이다.

한편, *Tetraselmis*속의 미세조류는 분열법을 통하여 세포 증식이 이루어지는데, 결국 미세조류를 배양하는 과정에서 증식이 원활하게 이루어지려면 배양중인 세포가 지속적으로 분열을 계속하여야 한다. 그러므로 배양 중인 세포 중 분열 중인 세포의 개체수가 증가할수록 배양 중인 미세조류의 밀도는 증가하게 된다고 말할 수 있다.

이 연구의 결과에 의하면 정상적인 *T.*

*suecica*의 배양 밀도 증가를 관찰할 수 없는 배양에서 RAI값은 배양 기간 중 계속해서 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 1). 뿐만 아니라, 배양 개시할 때 접종 밀도가 높았다고 하여도 접종한 미세조류 *T. suecica*의 RAI값이 낮은 경우, 그 증식은 가까운 시일 내에 크게 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

이러한 결과는 기존의 다른 배양수조에서 배양 중인 *T. suecica*를 사용하여 새로운 배양수조에 접종하고자 하는 경우에는 세포 수만을 많이 접종할 것이 아니라, 높은 RAI값을 가지고 있는 세포를 이용하여 새로운 배양을 시작하는 것이 유리함을 의미한다. 그러나 배양 개시할 때 접종 밀도와 함께 RAI값이 너무 높은 경우에도 그 배양은 가까운 시일 내에 증식이 정체되는 현상이 관찰되고, RAI값도 크게 감소되는 것이 관찰되었는데(Fig. 3), 이와 같은 결과는 배양 용기내의 영양원과 그 영양원을 이용하는 *T. suecica*와의 사이에서 영양적인 불균형이 초래되었기 때문이라고 추측된다.

그리고 RAI값의 활용 가능성을 확인, 보정하고 재연성을 확인하기 위하여 RAI값이 91.0%로 매우 높은 *T. suecica*를 배양 용기에 접종하여 악조건으로서 무배지 상태와 전일 암흑 상태에서 배양한 경우 RAI값이 급속도로 감소하고 세포수도 16일간의 배양 기간 중 계속 정체되는 경향이 관찰되어 RAI값의 이용은 *T. suecica*의 증식을 미리 예측할 수 있는 방법임을 확인하였다(Figs. 4, 5).

한편 RAI값을 활용하여 배양밀도를 예측한 Fig. 6의 경우에는 배양 개시 후 4일이 경과되어도 기존의 방법으로서 배양 밀도만

을 계수한 방법에서는 *T. suecica*의 특이한 증식 양상을 기대할 수 없었다. 그러나 배양 밀도의 세포 수 변화와는 달리 배양 개시 후, 3일째까지 계속 감소하던 RAI값이 배양 개시 후 4일째에 갑자기 급상승하는 현상이 관찰되었는데, 이러한 현상은 앞으로 *T. suecica*의 배양이 호전될 가능성이 존재함을 시사하였고 배양을 철수하지 않고 지속 배양을 유지하여 결국 배양 밀도의 급상승을 관찰하였다. 이 결과는 배양 중인 *T. suecica*의 배양 밀도가 계속 감소하거나 정체되는 경우가 관찰되어, 결국 이번 배양은 실패하였다고 생각되는 경우에도 RAI값의 상승이 관찰될 경우에는 배양 중인 *T. suecica*의 증식이 호전될 수 있음을 의미한다.

수산생물의 인공 종묘생산 과정에서 먹이 생물로 이용되는 동물 플랑크톤인 로티퍼(rotifer)의 대량 배양 과정에서도 앞에서 언급한 갑작스런 증식 억제 현상이 종종 관찰되는데, 그 현상을 사전에 예측하기 위하여 배양 중인 로티퍼의 섭이 상태를 파악하는 등의 방법으로 갑작스럽게 발생하는 배양 밀도의 감소 현상을 예측하고자 하는 연구가 이루어졌다(Koiso and Hino 1999). 그러나 로티퍼의 배양용 먹이로 이용되거나 패류나 갑각류의 먹이로서 널리 이용되는 미세조류의 갑작스런 배양 밀도 감소 현상에 있어서 사전 예측에 관한 연구는 전무한 실정이다.

이상의 연구 결과 미세조류 중에서도 다양한 용도로 이용되고 있는 *T. suecica*을 배양하는 과정에서 배양밀도의 갑작스러운 감소 현상이 발생하기 이전에 그 현상을 미리 예측할 수 있는 방법으로서 RAI값의 이용할 경우 성공적인 배양을 지속할 수 있을 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Davis, H. C. and Guillard R. R. 1958. Relative value of ten genera of micro-organisms as food for oyster and clam larvae. Fish. Bull. 58, 293-304.
- Fukusho, K., Okauchi M., Tanaka H., Wahyuni S. I., Kraisingdecha P. and Watanabe T. 1985. Food value of a rotifer *Brachionus plicatilis*, cultured with *Tetraselmis tetrathele* for larvae of a flounder *Paralichthys olivaceus*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 7, 29-36.
- Gatesoupe, F. J. and Luquet P. 1981. Practical diet for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*: Application to larval rearing of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture 22, 149-163.
- Guillard, R. R. L. and Ryther J. K. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula convervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8, 229-239.
- Hirano, K. and Hirayama K. 1984. The effect of *Tetraselmis tetrathele* as a food on population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Bull. Fish. Nagasaki Univ. 56, 21-23.
- Koiso, M. and Hino A. 1999. Studies on the assesment of the growth potential of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, by evaluating physiological activities. Suisanzoshoku 47, 249-256.
- Okauchi, M. and Fukusho K. 1984a. Environmental conditions and medium required for mass culture of a minute alga, *Tetraselmis tetrathele* (Prasinophyceae). Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 5, 1-11.
- Okauchi, M. and Fukusho K. 1984b. Food value of a minute alga, *Tetraselmis tetrathele*, for the rotifer *Brachionus plicatilis* culture- I. Population growth with batch culture. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 5, 13-18.
- Okauchi, M. and Hirano Y. 1986. Nutritional value of *Tetraselmis tetrathele* for larvae of *Penaeus japonicus*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 9, 29-33.
- Okauchi, M. 1988. Studies on the mass culture of *Tetraselmis tetrathele* (west, G. S.) Butcher as a food organism. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 14, 1-123.
- Romberger, H. P. and Epifanio C. E. 1981. Comparative effects of diets consisting of one or two algal species upon assimilation efficiencies and growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (GMELIN). Aquaculture 25, 77-87.
- Yufera, M. 1982. Morphometric characterization of a small-sized strain of *Brachionus plicatilis* in culture. Aquaculture 27, 55-61.