

# 바지락 인공종묘 대량생산 시스템 개발

The development of mass production systems  
for Manila clam  
(*Ruditapes philippinarum*) seed

제주대학교

농림수산식품자료실



0004600

농림수산식품부

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 수산특정사업(*바지락 인공종묘 대량생산 시스템 개발*)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 수산특정사업(*바지락 인공종묘 대량생산 시스템 개발*)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.



## 연구개발보고서초록

과 제 명	(국문) 바지락 인공종묘 대량생산 시스템 개발 (영문) The development of mass production system for Manila clam ( <i>Ruditapes philippinarum</i> ) seed				
주관연구기관	제주대학교		주 관 연 구	(소속)제주대학교 해양과학대학	
참 여 기 업	해양비전 21		책 임 자	(성명)최 광 식	
총연구개발비	계	587,380 천원	총 연구 기간	2008.11.01. ~ 2011.10.31. (3년)	
(400,000 천원)	정부출연 연구개발비	400,000 천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	67
	기업부담금	187,380 천원		내부인원	12
	연구기관부담금			외부인원	55

○ 연구개발 목표 및 내용

- 바지락 양식 산업의 지속적인 발전을 위해 건강한 종묘의 안정적 공급 방법 확보

○ 연구결과

- 건강한 바지락 모패 발굴을 위한 연구
  - 우리나라 전 연안에 서식하는 바지락의 번식량, 번식주기 및 기생충감염도 조사
  - 바지락 질병감염 및 병원체에 대한 면역력 측정 기술 개발
  - 바지락 집단 구별을 EST-linked microsatellite marker 개발 및 이를 이용한 바지락 집단간 유전적 특성 비교
  - 바지락과 아기바지락의 유전학적 특성 비교 (48개의 유전정보 GenBank 등록)
- 바지락 종묘의 안정적인 공급에 관한 연구
  - 순환여과 시스템을 이용한 바지락의 성 성숙 유도
  - 바지락 인공산란을 통한 바지락 유생 발달 관찰 및 유생 사육
  - 바지락 인공종묘 생산
  - 유생발달 단계에 따른 채묘법 개발
  - 바지락 먹이생물 확보 및 대량배양법 개발
- 바지락 중간 육성에 관한 연구
  - 바닥식 양성법 과 수하식 양성법을 이용한 바지락 성장 비교

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 건강한 바지락 모패 발굴을 위한 연구
  - 우리나라 바지락의 번식량, 번식주기 및 기생충 감염 정보 확보  
: 인공 종묘 생산시 모패 선정을 위한 기초 자료로 활용, 국제논문 1편 발표
  - EST-linked microsatellite marker  
: 바지락 집단 유전학 연구 및 불법 양식 규제를 위한 기술로 활용, 국제학회 2회 발표
  - 바지락과 아기바지락의 유전학적 특성 비교  
: 해산 이매패류 분류의 기초 자료로 활용, 국제학회 3회 발표, 48개의 유전정보 등록
  - 바지락의 질병감염 및 병원체에 대한 건강도 측정 기술  
: 질병 내성을 보이는 모패 집단 선별에 기초자료로 이용  
국내학회 1회 발표, 국내논문 1편 발표
- 바지락 종묘의 안정적인 공급
  - 실내사육수조를 이용한 바지락 성 성숙 유도 기술  
: 해산 이매패류 종묘 생산을 위한 기술 이용 및 국제 저명 학술지 발표예정
  - 바지락 인공종묘 생산, 먹이생물 대량배양법  
: 해산이매패류 종묘 생산을 위한 기초자료로 활용
- 바지락 중간 육성에 관한 연구
  - 수하식 양식 기술 확립  
: “부착생물 저감용 바지락 수하식 양성기”에 관한 지적재산권 출원  
국제 저명 학술지 발표 예정





## 연구개발보고서초록

과 제 명	(국문) 바지락 인공종묘 대량생산 시스템 개발 (영문) The development of mass production system for Manila clam ( <i>Ruditapes philippinarum</i> ) seed				
주관연구기관	제주대학교		주 관 연 구	(소속)제주대학교 해양과학대학	
참 여 기 업	해양비전 21		책 임 자	(성명)최 광 식	
총연구개발비	계	587,380 천원	총 연 구 기 간	2008.11.01. ~ 2011.10.31. (3년)	
(400,000 천원)	정부출연 연구개발비	400,000 천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	67
	기업부담금	187,380 천원		내부인원	12
	연구기관부담금			외부인원	55

○ **Objective**

- Sustainable development of Manila clam farming industry by stable supply of healthy clam seed

○ **Result**

**Evaluation of healthy Manila clam broodstock**

- Investigation on reproductive effort, reproductive cycle and parasite infection of clams sampled in costal areas of Korea
- Development of health measuring technology of Manila clam against disease outbreak and various pathogen
- Development of EST-linked microsatellite marker to identify Manila clam population and it's application on different clam groups.
- Genetic characterization of Manila clam (*R. philippinarum*) and Variegated carpet shell (*R. variegatus*)

**Study on Manila clam seed production in hatchery**

- Artificial conditioning of broodstock clams in a closed-circulation system
- Investigation on larva development and larva culture of clams produced by artificial spawning
- Clam seed production from hatchery condition
- Development of collecting method for clam spat
- Mass culture techniques for the food organism of Manila clam

**Mass production of *R. philippinarum* seed in hatchery**

- Comparison of the intertidal on-bottom culture and the hanging culture of spats of Manila clam

○ **Application of the research results and future plan**

**Conditioning, genetic characterization of clam populations and locating clam broodstocks**

- The artificial conditioning technique developed in this study to mature sexually inactive clams using an indoor condition will be widely used in future clam hatchery since it secures supply of broodstock to be used as spawners.
- Flow cytometry technique used in assessment of clam health is expected to be applied in selecting healthy broodstock and to evaluate overall condition of clam culture ground.
- The seed production techniques developed and described in this study will be used as a guideline for the future clam hatchery operation.
- The microsatellite genetic markers developed in this study will be usefully used in identification of introduced clam seed or population from native Korean clams.
- Output: 2 papers (1: international journal, 1: domestic journal)  
conference presentation (1: domestic conference, 5: international conference)  
GenBank deposit (48 gene sequences: JN807338-JN807385)

**Development of clam seed production guideline**

- The present study developed mass production of clam seed in hatchery condition and subsequent spat collection using a mesh screen and the techniques are summarized as a guideline. This spat production guideline will be usefully used in future clam hatchery operation as a manual.
- The technique of mass production of feed organism for clam spats can be applied in other hatchery operation such as oyster and sea cucumber, which feed on phytoplakton as food source.

**Development of suspended culture technique for juvenile clam**

- The present study developed suspended culture method for juvenile clam and growth of the clam in suspended culture was 2.5 times faster than bottom culture.
- Output: The net-bag suspended culture system developed in this study has been asked for a patent titled as "Fouling-reducing apparatus for bivalve suspended culture"



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수산특정과제” 지정과제 (세부과제 “바지락 인공종묘 대량생산 시스템 개발에 관한 연구”) 과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 10 월 31일

주 관 연구기관명 : 제 주 대 학 교

주관연구책임자 : 최 광 식

주관 기관 연구원 : 강현실, 양현성, 김봉규, 홍현기, 정희도, 이희중, 이지연, MD.

Mostafizur Rahman Mondol, Le Thanh Cuong, Vieira Christophe

협동 기관 연구원 : 정희원, 김주희, 조뢰, 여엽빈, 팜티리언, 황창용, 송우시, 손직녀, 양

지수, 양희창, 김성욱, 정희철

위탁 기관 연구원 : 김현중, 고대웅, 김창완, 남기웅, 김지현

참여기업 연구원: 리현숙, 이광희, 전운천, 이기선, 위진희, 김아름, 강희정, 양지수, 지종

선, 최은경

협동연구기관명 : 광 주 대 학 교

협동연구책임자 : 양 성 렬

협동연구기관명 : 군 산 대 학 교

협동연구책임자 : 박 경 일



# 요 약 문

## I 바지락 인공종묘 대량생산 시스템 개발

### II 연구개발의 목적 및 필요성

바지락은 우리나라 전 연안의 모래 또는 갯벌에 서식하며, 굴과 더불어 산업적 가치가 높은 이매패류이다. 우리나라에서는 1990년 7만 톤을 생산한 이후 지속적으로 감소하여 최근에는 3~4만 톤 정도를 유지하고 있다. 또한 대규모 연안개발 및 환경변화, 질병 감염증가와 남획으로 인해 자연채묘를 통한 바지락 종패 생산의 감소를 초래하고 있다. 바지락 생산량의 감소는 수입량 증가로 연결 되었으며, 바지락양식에 있어 치패 부족으로 인하여 외국으로부터 매년 60억원 상당의 바지락 종패가 수입되는 것으로 알려지고 있다. 이러한 수입 바지락 종패는 질병 감염과 운송시간 지연에 따른 활성도의 감소와 같은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 바지락 치패를 인공적으로 대량 생산하는 기술을 확보하는 것은 불가결 할 것으로 사료되며, 바지락 치패생산은 어업인에게 실질적인 소득 증대원으로 이루어질 수 있고 국가적으로도 경제적 이익을 창출 할 것으로 판단된다.

### III 연구개발 내용 및 범위

우량 바지락 모패 집단 발굴을 위한 기초 연구로, 1) 우리나라 전 연안에 서식하는 바지락의 지역별 번식량, 비만도, 산란주기, 기생충 감염 및 병원체에 대한 면역력에 대한 연구를 실시하였으며, 2) 우리나라 바지락의 유전학적 특성을 규명하기 위한 EST-linked microsatellite marker를 개발하여 우리나라 바지락 집단 내 다형성을 확인하고, 이를 이용하여 우리나라 바지락 집단과 외국 바지락 집단 구별에 응용하였다. 3) 제주도 연안에 서식하는 바지락과 아기바지락을 구별하기 위한 형태와 유전학적 특성 규명에 관한 연구를 실시하였다.

바지락 종묘의 안정적인 생산과 공급을 확립하기 위한 연구로, 1) 순환여과시스템을 이용하여 인위적인 먹이공급 및 온도조절을 통해 바지락의 성 성숙 유도 연구를 수행하였다. 또한, 인공 산란유도를 통한 유생발생 단계 관찰과 유생 성장률을 측정 하였다. 2) 인공종묘 대량생산 채묘기술 개발을 위해 유생발달 단계에 따른 채묘법과 종묘 생산 시 유해생물 제어에 관한 연구를 실시하였다. 3) 효과적인 바지락 종묘 생산을 위해 바지락 크기별 사육관리 방법을 개발하고, 이에 따른 먹이생물의 대량 배양 및 공급방법에 관한 연구를 실시하였다. 4) 바지락의 중간육성 방법을 개발하기 위해 바닥식 양성과 수하식 양성 방법에 따른 바지락의 성장률, 사망률과 기생충 감염율을 비교 분석 하였다.

## IV 연구개발결과

### 1절 바지락 우량 모패 집단 발굴을 위한 연구

#### 1. 2009, 2010 및 2011년 우리나라 동·서·남해안 및 제주도 바지락 개체군의 번식생태학적 연구

바지락 인공종묘에 이용될 우량 바지락 모패의 선발을 위하여 각 지역에 서식하는 바지락의 비만도, 성 성숙, 산란 시기, 번식량 및 질병감염 정도 등을 비교하였다. 이 연구는 바지락 모패 선정을 위한 기초연구로 바지락의 번식정보를 수집하기 위해 2009, 2010 및 2011년 6-7월 제주도를 포함한 우리나라 동·서·남해안의 연안에 서식하는 바지락의 번식량, 비만도 및 바지락 포자충 (*Perkinsus* sp.)의 감염도를 조사하였다. 그 결과, 바지락의 비만도 (CI)는 서해안 지역이 가장 좋은 것으로 나타났으며, 특히 충남 드르니, 황도, 보령지역의 바지락이 서해안 바지락의 평균 비만도 보다 높게 측정되었다. 바지락 생식소 발달 단계는 2009년과 2011년 6월에 채집된 바지락이 대부분 완숙기 또는 부분 산란기인 반면에, 2010년 7월 채집된 바지락은 경기지역 일부 (선재, 선감), 충남 고남, 강원 임원을 제외하고는 대부분 바지락은 부분 산란기였다. 따라서, 바지락 인공종묘를 위한 모패의 채집 시기는 바지락이 완전히 성숙한 6월이 적절할 것으로 사료되었다. 생식소 지수 및 포란도는 6월보다는 7월이 높았다. 바지락 포자충 (*Perkinsus olseni*)의 감염도는 남해안>서해안>제주도>동해안 순으로 나타났다. 위의 결과들을 종합하여 볼 때 높은 비만도와 낮은 질병 감염도를 보이는 충남 방포와 파도리, 경남 거제 바지락이 바지락 인공종묘 생산을 위한 적정 모패로 판단되었다.

#### 2. 전국 바지락의 질병 감염 및 면역력에 관한 연구

##### 2-1 우량 모패 확보를 위한 건강도 측정기술 개발 및 바닥식 양성 바지락의 성장과 질병감염 연구

###### 2-1-1 우량 모패 확보를 위한 건강도 측정 기술 개발

바지락 (*Manila clam*)을 양식용 모패로 사용하기 위해서는 우수한 형질을 갖춘 개체군을 선발하여야 하며, 우수한 형질 판별의 기초는 바지락의 건강도를 측정할 수 있는 기술이 확립되어야 한다. 본 연구에서는 바지락의 건강도를 측정하기 위한 방법으로 면역 반응을 정량화 할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 바지락 면역력의 기저값을 측정함으로써 바지락의 세포성 면역 기작에 대한 이해를 높이고, 보다 정확한 면역력 측정 기술을 측정하기 위하여 서식지에서 채집 즉시 측정된 시료의 면역 반응과 실험실로 옮긴 시료 사이의 면역력의 차이를 조사하였다. 조사결과 현장에서 측정된 시료의 면역력 보다 실험실로 옮긴 바지락에서 조사된 모든 면역기작이 급격히 저하됨이 확인 되었다. 또한 개체간 면역력의 변이가 실험실로 옮겨 측정된 개체들에게서 증가됨이 확인되었다. 따라서 유세포 분석기를 이용한 바지락의 면역력 측정은 시료의 건강도를 측정하는데 유용한 것으로 판단된다.

## 2-1-2 바닥식 양성 바지락의 성장 및 질병 감염연구

이 연구는 바닥식 양성 양식 바지락의 연령에 따른 성장 및 질병 감염 및 폐사율을 조사하고자 치패단계부터 1년, 2년생의 바지락을 조간대 양식장에 살포하고 이들의 성장 및 질병 감염 추세를 확인하고자 하였다. 특히 이러한 조사를 위하여 실험용 바지락의 외부 간섭을 배제하기 위하여 cage를 제작하여 실험에 이용하였으며, 조사 대상 질병은 바지락에 대량 폐사 원인생물로 잘 알려진 *Perkinsus olseni*의 감염율과 감염도를 조사하였다. 바닥식 양성 방식에 의해 생산되는 바지락은 연령에 따라 성장율, 질병 감염, 폐사율이 다른 경향을 나타내었다. 즉, 치패에서 가장 성장률이 높았고, 연령이 높아질수록 성장률이 낮았다. 또한 기생충 감염은 치패에서 감염도가 가장 낮았으며 연령이 높아질수록 높아지는 경향이 나타났다. 폐사율 또한 치패에서 낮았으며 연령이 높은 개체군에서 높게 나타났다.

## 2-2 바지락 모패 및 치패의 건강관리 기술 개발

본 연구는 우리나라 해역 중 물리학적/생태학적 특성이 다르게 나타나는 전남 강진(남해), 충남 홍성(서해), 제주(제주) 산 바지락 개체군을 대상으로 이들이 원충성 질병에 감염되었을 때 나타나는 면역학적 반응과 폐사율을 비교함으로써 지역에 따른 바지락의 질병 감염에 대한 저항성의 유무를 조사하고 향후 생존력이 우수한 바지락 모패 집단을 개발하는데 목적이 있다. 조사결과 강진 바지락의 면역력이 타 집단에 비해 높았고 폐사율은 낮게 나타났다. 이러한 결과는 강진 바지락이 타 지역 바지락에 비해 생리적으로 우수한 형질을 갖추고 있음을 시사하였다.

## 3. 건강한 바지락 모패 확보를 위한 바지락의 유전학적 특성 분석

### 3-1. 바지락 집단 구별을 위한 microsatellite marker 개발

우리나라 바지락 집단의 유전학적 특성을 효율적으로 규명하기 위해 이번 연구에서는 바지락 혈구 EST data에서 유래된 microsatellite marker를 개발하고, 이를 이용한 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 개체군에서의 이형성을 확인하였다. 2006년 *Perkinsus olseni* (바지락 포자충)를 감염시킨 우리나라 바지락의 혈구 (hemocyte) cDNA library에서 유래된 1128개의 unique gene (Expressed sequence tag)로부터 di, tri, tetra, penta 와 hexa nucleotide motif를 5개 이상을 갖고 있는 19개의 microsatellite 후보 EST clone을 발굴하고 PCR 증폭을 수행하여 확인하였다. PCR로 확인된 11개의 marker를 이용하여 15개체의 바지락에 대한 유전자 다형성 (polymorphism)을 확인한 결과, 11개의 marker에서 확인된 allele의 수는 3-11개이며, locus당 평균 6.5개의 allele를 갖고 있었다. Observed heterozygosity와 expected heterozygosity는 각각 0.0667-0.7692와 0.3571-0.8843로 나타났다. 또한, KR1, KR6, KR11, KR12, KR14, KR17, KR 19 marker의 경우 PCR 산물이 증폭되지 않는 null allele이 관찰되었다. 따라서 발현유전체 유래



microsatellite marker는 바지락 개체 내 다형성이 높게 관찰되어 바지락 개체군의 유전학적 특성 규명을 위한 유용한 분자 marker로 이용될 것이다.

### 3-2. Microsatellite marker를 이용한 우리나라 바지락과 외국 바지락 집단과의 유전학적 특성 규명

우리나라 바지락과 외국 바지락 집단 간의 유전학적 특성을 비교하기 위하여 2009년 우리나라 8지역 (황도, 보령, 곰소, 거제, 임원, 성산, 서귀, 외도), 중국 2지역 (Xiamen, Yantai), 일본 (Kanazawa-ku)과 홍콩에서 채집을 실시하였다. Microsatellite marker는 11개의 marker중 다형성 (polymorphism)이 높게 관찰된 5개의 marker (KR2, 6, 14, 17, 19)를 사용하여 genotyping을 실시하고 이들 집단의 유전학적 거리와 유연관계를 분석하였다. 실험 결과, 우리나라 보령지역 (BR)의 바지락 집단과 중국의 서먼지역 (XR) 바지락 집단이 유전적으로 가까운 유연관계를 나타냈다. 또한, 제주도 외도지역 바지락과 홍콩 바지락은 아기바지락으로 다른 지역의 바지락 집단들과 *Ruditapes*속의 다른 종의 그룹으로 구별되었다. 따라서, EST 유래 microsatellite marker는 우리나라 바지락 집단과 외국 바지락 집단 뿐만 아니라 *Ruditapes*속의 다른 종을 구별하는데 유용한 marker임을 시사한다.

### 3-3. 바지락과 아기바지락의 형태 및 유전학적 특성 비교

우리나라 바지락의 번식량, 산란 주기 및 질병 감염에 대한 연구를 실시한 결과, 제주도 연안에 서식하는 바지락 집단이 두 종의 바지락인 바지락 (*R. philippinarum*)과 아기바지락 (*R. variegatus*)이 서식하는 것으로 확인되었다. 2009년 6월 2일부터 6월 29일 사이에 성산과 서귀 (바지락), 외도와 금능 (아기바지락)에서 채집된 바지락 개체군을 이용하여 서식지, 형태학적 비교와 4종의 유전자에 대한 유전학적 특성 분석을 실시하였다. 그 결과, 성산과 서귀포의 사질 해변에서 채집된 개체군은 바지락, 외도와 금능의 자갈 조간대에서 채집된 바지락은 아기바지락으로 확인되었다. 또한, 외투막 만입 거리와 전장에 대한 외투막 만입의 거리비가 바지락이 아기바지락보다 유의하게 더 깊게 만입되었음을 형태학적으로 확인하였다 ( $p < 0.05$ ). 이와 더불어 두 종의 바지락에서 결정된 유전자들 간의 유전적 거리와 계통관계도 두 종의 각각 독립된 계통의 군집을 형성하는 것으로 확인하였다. 따라서, 제주도에 서식하는 아기바지락과 바지락은 *Ruditapes* 속의 서로 다른 종임을 최초로 확인하였다.

## 2절 바지락 종묘의 안정적 공급에 관한 연구

### 1. 바지락 순치를 통한 조기 성 성숙에 관한 연구

이 연구는 바지락 인공 종묘를 위한 기초적인 실험으로, 순환양식 시스템에서 8주간

인위적인 온도 조절과 먹이공급을 통해 바지락의 성 성숙을 유도하는데 있다. 실험에 쓰인 바지락은 2010년 4월 충남 홍성 지역에서 채집하였고, 수온 11–22°C, 염분 26.7–32.2 psu, DO 5.9–9.8 mg/L, pH 7.3–8.6, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0.1–5.0 mg/L, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 0.3–1.0 mg/L의 조건하에서 8주간 순환시스템에서 양성하였다. 매주 20 개체를 선별하여 비만도 (Condition Index), 생식소 발달 단계, 생식소 중량지수 (Gonad Somatic Index)를 추정하였다. 연구결과, 실험 기간 동안 바지락의 생존율은 60.3%였다. 조직학적 관찰을 통한 생식소 발달단계는 실험 시작 (0일) 대부분의 바지락은 초기 발달 단계였으나, 42일 후 완숙한 개체가 관찰되기 시작하여 실험 종료 (57일)에는 40%의 바지락이 완숙단계였다. GSI는 22일 3.7%였으나 서서히 증가하여 57일 8.2%로 최대값을 나타냈다. 위의 결과를 바탕으로 추정한 바지락의 포란도는 2,876,687±1,473,906개였다. 바지락 포자충 감염도는 실험 시작 272,836±99,884 perkinsus cells/total wet weight의 범위를 보였으며, 이후 실험종료 705,064±313,231 perkinsus cells/total wet weight로 약 3배가량 증가하였다. 이러한 결과를 바탕으로 인공종묘 시 사용되어질 모패는 바지락포자충과 같은 기생충 감염이 없는 지역의 모패를 사용해야 할 것이다.

## 2. 바지락 인공산란 유도 및 유생 발생 관찰

바지락 종묘생산 시 인공 산란과 유생발달에 관한 방법을 수립하기 위해 실내 사육시스템을 이용하여 바지락의 인공산란 유도과 유생 발생을 관찰하였다. 실험에 사용한 바지락은 2011년 8월 14일 제주도 김녕항에서 채집하여 배양된 먹이생물을 먹이로 공급하면서 순치하였다. 순치 다음날 새벽, 바지락은 자연 산란되었으며, 산란된 바지락 알은 약 5백만개로 추정되었다. 수정된 난의 배 발생과 유생 발달을 광학현미경과 장방출주사 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 수정된 난의 크기는 50–60 μm였으며, 수정 1시간 후 극체가 형성되었다. 이후 2 cell, 4 cell, 8 cell을 거쳐, 수정 4시간 후 gastrula stage가 관찰되었다. 이시기의 embryo는 prototroch가 형성되어 자유 유형을 시작하였다. 수정 19시간 후, embryo는 D상 (D shaped)의 형태를 보였으며, 먹이섭이를 시작하였다. 소화맹낭에서는 섭이한 플랑크톤 (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis*)이 광학현미경상에서 관찰되었다. 수정 2일 후 바지락 유생은 velum이 형성되면서 Early D-shaped 단계가 되었다. 이후 유생은 straight hinge veliger (124.7 μm), early umboned veliger (153.4 μm), late umboned veliger와 pediveliger (217.8 μm) 단계를 거쳐, 36일 후 siphon이 발생되면서 post-larvae stage가 관찰되었다. 바지락의 일일 성장률은 4.6 μm였으며, 최종 early post set 단계의 바지락은 281.2 μm였다. 위 연구는 바지락 인공종묘에 가장 기본적인 유생발달의 정보를 제공하였다.

## 3절 바지락 치패 인공종묘 생산

### 1. 바지락 치패 종묘생산 시스템에 관한 연구

인공적인 바지락 종패를 만들기 위해 크기가 큰 3~5년생을 분류하고 크기가 작거나 커도 연령이 있는 바지락은 모패에서 제외시켰다. 선별한 모패는 3 ppm의  $\text{KMnO}_4$ 로 세척하여 외부에 다양한 형태의 기생충 또는 병원균 등을 제거하였다. 세척이 끝난 모패는 사육조로 옮겨주며, 4회/1일 먹이생물을 공급하고, 1회/1일 사육수를 전량 환수하였다. 바지락 모패의 생식소를 확인하여 (난자의 경우는 난 주변의 투명한 테두리가 없어지고 난자만 까맣게 나타났을 때, 정자 활동력이 높을 때) 모패의 상태에 따라 1단계로 산란판에 올려놓고 4~5시간 동안 건조자극, 2단계 담수자극 (30분 정도 담금), 3단계 냉자극 (냉장고에 약 30분가량 넣어줌) 순으로 선택하여 인공적으로 산란을 유도 한다. 산란이 임박하면 산란조에 EDTA를 3 ppm으로 만들어 넣고, 비타민 1정 (0.1 g)을 넣어 준비해준다. 바지락 산란은 12시~새벽 2시경 어둡고 조용한 상태에서 이루어진다. 부화조의 수온은 23°C로 맞추고, 난자의 밀도가 15~20 개체/mL로 만들고 산란판은 다른 수조에 옮겨 재차 산란 시킨다. 수정이 되고 약 24시간 후에 패각이 형성된 D상 유생을 관찰할 수 있다. 먹이생물은 6시간 간격으로 5~6일 동안 공급하고, 물갈이는 하루 2회 교환한다. 그 후 2주일 정도 후에는 각정기를 거쳐 바지락 유생은 200~300  $\mu\text{m}$  정도의 크기가 되고, 바닥에 착저하게 된다. 바지락 유생이 착저를 하게 되면 빨이 깔려있는 유생관리수조로 옮기고, 해수순환 및 먹이생물공급 횟수를 동일하게 하고 5일 간격으로 망 크기를 달리하여, 바지락 유생을 크기별로 분리하여 수조 이동을 해 준다.

**부화장 배치에 따른 공급방법:** 평면배치의 부화장의 경우 먹이생물을 6톤 수조에서 대량 배양한 뒤, 수중 펌프를 이용해 파이프를 통하여 부화조로 공급한다. 부화장의 구조가 다층으로 먹이배양시설을 배양장의 맨 꼭대기 층에 배치하였을 경우 동력펌프를 사용하지 않고 siphon에 의하여 먹이생물에 스트레스를 주지 않고 효율적으로 공급 할 수 있다.

**바지락 유생 크기별 공급방법:** 초기 바지락 유생에서 각정기까지 성장하는데 필요한 주요 먹이원은 *Isochrysis*와 *Chaetoceros*였으며, 이중 특히 *Isochrysis*는 직경이 5~7  $\mu\text{m}$  정도로 작고 세포벽이 없어 바지락 유생에게는 최적의 먹이원이다. 각정기에서 500  $\mu\text{m}$ 이하의 치패의 먹이 공급방법은 *Isochrysis*와 *Chaetoceros*에 *Platymonas* 또는 *Tetraselmis*를 2 : 2 : 1로 혼합하여 공급한다. 500  $\mu\text{m}$  이상으로 성장한 바지락 치패는 상기 먹이생물 공급 비율을 1 : 1 : 2로 전환하여 공급하거나 *Isochrysis* 또는 *Chaetoceros* 중 하나만을 선택하고 *Platymonas*를 포함하여 두 가지 종류의 먹이생물을 공급한다.

## 2. 인공종묘 대량 생산 채묘기술

바지락 인공종묘 생산 과정에서 유생의 효율적인 채묘방법이 있다. D형 유생은 해수와 함께 이동시켜야 하므로 60  $\mu\text{m}$  물러 가제를 대야에 받쳐놓고 사이펀 원리로 물을 빼내고 유생이 모이면 다른 수조로 옮겨준다. 유생이 각정기 과정을 거쳐 착저를 하게 되면 유생관리조로 이동시켜 주는데 유생관리조에는 수조 바닥에는 펄을 깔아 바지락 치패의 착저를 도와주고 서식공간을 확보하는 효과를 보이도록 했다. 따라서 빨과 노폐물을 제거하고 비어있는 패

각이나 성장속도가 느린 바지락 치패를 분리해야 한다. 이를 위해 60  $\mu\text{m}$  망에 거른 세립한 빨을 유생관리조에 투입하며, 치패의 크기에 따라 100, 200, 250, 320, 420  $\mu\text{m}$  물러 가제로 치패를 걸러낸다. 착저한 치패의 수조에는 유생관리조에 비해 수위가 낮으므로 배수구에 물러가재를 설치하고 수조의 벽이 건조되지 않도록 여과해수를 뿌려준다. 수조의 물을 천천히 빼내면서 바닥에 남아있는 빨과 치패를 모두 배수시켜 여과한다. 중간육성을 위한 유생은 같은 방법으로 500  $\mu\text{m}$  가량으로 여과하여 치패만을 모으고 무게를 측정하여, 아이스박스에 여과된 해수에 적신 수건을 깔고 유생을 운반한다.

## 4절 바지락 먹이생물의 대량배양 기술

### 1. 바지락 먹이생물의 대량배양

패류 (바지락 등 이매패류) 종묘 생산에 가장 필요한 항목 중의 하나가 먹이 생물인 식물성 플랑크톤의 대량배양과, 패류의 성장 과정에 따른 식물성플랑크톤의 크기별 순수종의 배양이다. 식물성플랑크톤을 대량 배양하기 위해서 배양 용기 크기에 따라 단계별 배양 방법을 시행하였고, 배지의 경제성을 확보하기 위하여 저렴한 원료를 사용하여 영양분을 조성하여 배지의 제조방법을 제시했다. 먹이 생물로는 *Chaetoceros mulleri*, *Dicrateria inornata*, *Isochrysis galbana*, *Nitzschia sp.*, *Platymonas subcordiformis*, *Tetraselmis suecica*를 사용하였다.

1단계: 원종배양 (250 mL, 500 mL) → 2단계: 소량배양 (2 L, 3 L) → 3단계: 확대배양 (중간배양(20 L)) → 4단계: 확대배양 (60 L) → 5단계: 대량배양 (6 m<sup>3</sup>)

먹이 생물의 배양 단계는 4~5단계로 하여 증식을 시켰으며, 원종관리는 광주대의 clean room에서 항온으로 연중 관리하였다. 각 단계별 접종 시 농도는 식물성플랑크톤의 개체수로 *Tetraselmis suecica*와 *Platymonas subcordiformis*는 각 20만 cells/mL, *Nitzschia sp.*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros mulleri*는 각 500만 cells/mL 단계에서 접종을 하였다. 접종 시 최종적으로 현미경과 Fluorometer를 이용하여 FRI가 0.6 이상을 나타내 식물성 플랑크톤 상태가 양호한지를 확인하였다.

### 2. 먹이생물 배지 개량 및 먹이생물 대량 배양연구

식물플랑크톤 대량배양의 어려움을 극복하고 경제적인 효과를 극대화하기 위해 저비용 배지 개발에 일차적인 목표를 가지고 식물플랑크톤 증식 연구를 하였다. 저렴한 농업용 비료를 사용하여 먹이생물인 식물플랑크톤을 배양하고 있는 방법이 사용되고 있기는 하지만, 단기간 (5일) 내에 최고점에 이르기 어려울 뿐만 아니라 영양분의 불균형으로 인하여 장기간 지속되기 어렵다. 이에 본 연구에서는 저가의 비료를 활용하여 최단 기간 내에 대량 배양하는 영양액 제조 방법을 서술하였다.

식물성플랑크톤 수조 대량 배양액 제조 방법

종	시약	일반적 중량	성장속도가 느려진 경우
<i>Platymonas subcordiformis</i>	요소비료	20 g	10 g
	복합비료	10 g	-
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	1.6 g
	MnSO <sub>4</sub>	0.1 g	-
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	5 g
	EDTA-2Na	10 g	8 g
<i>Isochrysis galbana</i>	요소비료	10 g	3.6 g
	복합비료	8 g	-
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	2 g
	KNO <sub>3</sub>	10 g	10 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	5 g
	EDTA-2Na	10 g	8 g
<i>Nitzchia sp.</i> (& <i>Chaetoceros mulleri</i> )	요소비료	20 g	10 g
	복합비료	10 g	-
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	1.6 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	5 g
	EDTA-2Na	10 g	8 g
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	10 g	10 g

- 상기 중량은 1톤 (1m<sup>3</sup>)당 필요량
- 배양액조제 시 *Chaetoceros mulleri*는 담수를 이용하고, 나머지는 해수를 이용.

일반적 중량 사용의 경우,

- *Platymonas subcordiformis*는 플랑크톤 활성이 좋을 때 요소와 복합으로 만으로 증식이 잘됨. 다른 종류도 마찬가지로 증식속도가 느림.
- *Platymonas sp.*는 피크 일 때 20만 cells/mL, *Dicrateria inornata*와 *Chaetoceros mulleri*는 각 400만 cells/mL가 됨.

성장속도가 느려진 경우,

- *Platymonas subcordiformis*는 피크 일 때 8만 cells/mL, *Isochrysis galbana*, *Nitzchia sp.*은 70~100만 cells/mL로 나타남.
- 5일간 배양 이후 피크가 나타나지 않을 때, 시약량을 50% 감소시켰음 (유생이나 치패 부화조 수질 악화 방지).

### 3. 먹이생물 농축 시스템 기술에 관한 연구

자연 상태에 가까운 축제식 양식장에서 먹이생물을 배양하고, 이를 농축하여 거의 무제한적으로 생산이 가능하도록 시도하였다. 먹이생물을 자연 상태에서 배양하므로 실내배양보다 건강도가 더 좋을 것으로 예상하였다. 자연 상태에서 배양된 먹이생물은 여러 종이 혼합되어 있는데 이는 장점도 될 수 있지만 단점도 될 수 있다. 노지에서 먹이생물을 배양하게 되면 부유물질이나, 코페포다와 같은 동물 플랑크톤도 섞여 있기 때문에 농축하기 이전에 불순물을 제거하는 것이 반드시 필요하다. 배양한 해수를 1차적으로 장모여과기를 통과시키고, 2차로 백필터를 이용해 50~80  $\mu\text{m}$  크기의 이물질을 제거하고, 카트리지 필터를 이용하여 3차적으로 20~30  $\mu\text{m}$  크기의 이물질을 제거한다. 또한 수온의 상승 등으로 인한 먹이생물의 영향을 최소화 하고자 냉각기를 설치한다. 농축기는 모듈구조로 다단 평막 스크린을 채택하여 여과면적을 증대 시키고 강도보강을 위해 공극을 가진 합성수지 spacer 양면에 평막을 부착하고 15개를 병렬로 연결한다. 먹이용량에 따라 용이하게 증설이 가능하도록 구성되었다. 자연상태 농축먹이생물은 바지락 초기유생의 먹이로는 적당하지 않은 것으로 판명되었지만, 600  $\mu\text{m}$  이상 되는 치패의 먹이로는 큰 문제가 없었으며, 1 cm 이상 성장한 패류의 먹이원으로는 최적으로 판명되었다.

## 5절 바지락 중간육성 방법에 관한 연구

### 1. 바지락 치패의 바닥식과 수하식 육성 방법 비교

현재 바지락 양식에서 널리 이용되고 바닥식 양식은 간조 시 해양환경의 급격한 변화에 노출되며 먹이 섭식 기회의 감소라는 문제점을 갖고 있다. 이러한 단점을 해결하기 위한 방법으로써 수하식 양성법이 대안으로 제시되고 있다. 따라서 본 연구에서는 수하식 양성의 장점이 실제 바지락의 성장과 질병 감염, 번식주기 및 폐사에 적용될 수 있는지를 확인하기 위하여 기존 방법인 바닥식과 비교하여 수행되었다. 조사결과 수하식으로 양성된 바지락 치패의 성장과 비만도가 바닥식에 비해 월등히 우수하였고, 질병 감염도 및 폐사율에서도 현저히 낮은 것으로 나타나 성장이 빠르고 생존력이 우수한 바지락을 양성하는데 매우 적합한 기술로 판단된다.

## 6절 인공종묘생산의 산업화 적용 및 경제성 분석

### 1. 먹이생물 생산비 저감을 위한 방안

바지락 인공종묘 대량생산을 위해 반드시 충분한 먹이 생물이 공급되어야 한다. 먹이생물을 전문화된 설비 없이 현장에서 바로 적용될 수 있는 단계별 먹이생물 배양 방법과, 먹이생물 배지에 사용되는 값비싼 시약 대신에 저렴한 비료를 사용하여 원가절감을 할 수 있는 개량형 배지를 개발하여 생산비를 절감하였다. f/2배지의 경우  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , vitamin B12 (cyanocobalamin), Biotin, Thiamine·HCl의 여러 가지 시약이 들어

가며, 주요 영양분인  $\text{NaNO}_3$ 는 75 mg/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 는 5 mg/L로 소요되, f/2 배지를 1 ton 만들 때 총 80 g이 사용된다. 그러나 본 개량 배지는 시약종류를 단순화하고 주요 영양분인 N, P 영양분도 비료를 사용하여 10 g/ton 이내를 사용하며, 가격도 요소비료 (1,500 원/kg), 복합비료 (2,800 원/kg)로 다른 시약보다 5~10 배가량 저렴하여 주요 영양분만 비교해도 40~80배의 비용 절감을 할 수 있다.

## 2. 기질에 따른 효율적인 채묘방법 개발

바지락 인공종묘 생산 과정에서 D형 유생기, 각정기 과정을 거쳐 착저를 하게 되는 유생, 중간육성장으로 옮기기 위한 효율적인 채묘방법을 개발하였다. 이 방법은 성장 변이과정이 유사한 다른 이매패류의 육성과정에 적용할 수 있으며, 종묘 생산과정 중 패각이 부서지거나 유실되는 비율을 감소시키고 수조를 양호한 수질로 유지시켜 줄 수 있다. 또한 크기별 치패의 관리를 하여 먹이생물의 비율을 달리하여 생산량을 증가시킬 수 있다.

## V 연구성과 및 성과활용 계획

### 1절 바지락 우량 모패 집단 발굴을 위한 연구

#### 1. 바지락 성 성숙 유도 및 우량 모패 확보 기술

이번 연구에서 우리나라 전 연안의 조간대에 서식하는 바지락의 번식량, 바지락포자충 감염도 및 비만도를 조사하여 우량 모패 집단 서식지에 관한 기초자료를 수집하였다. 이 결과는 인공종묘 생산에 이용될 바지락을 선정하는데 있어 중요한 기초 자료로 활용될 것으로 사료된다. 또한, 우량 바지락 모패의 성 성숙 시기를 실내사육수조를 이용한 conditioning을 실시하여 바지락의 산란 시기를 조절할 수 있는 기술을 확립하였고, 확보된 기술은 추후 바지락 양식 어민들에게 바지락을 포함한 해산 이매패류 인공종묘 생산기술로 보급될 수 있을 것이다. 상기의 연구로 확보된 결과물은 추후 국제학술지에 투고할 예정이다.

#### 2. 우량 모패 확보를 위한 건강도 측정 기술 개발

바지락 (Manila clam) 양식용 모패로 사용하기 위해서는 우수한 형질을 갖춘 개체군을 선발하여야 하며, 우수한 형질을 판별의 기초는 바지락의 건강도를 측정할 수 있는 기술이 확립되어야 한다. 본 연구에서는 바지락의 건강도를 측정하기 위한 방법으로 면역 반응을 정량화할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 바지락 혈구세포의 DNA 손상도, 세포자살율, 세포 괴사율, 활성산소 발생을 등을 유세포 분석기를 이용하여 정량화 하였다. 이를 바탕으로 우리나라 3개 해역에 서식하는 바지락을 채취하여 면역력을 비교한 결과 강진 바지락의 면역력이 가장 우수한 사실을 확인하였으며, 병원체를 이용한 공격실험에서도 가장 우수한 생존율을 보여 면역력이 건강도 판정을 위한 지표로서 우수성이 증명되었다. 이상의 결과는

패류학회에 게재된 바 있으며, 추가 논문이 작성되고 있다.

### 3. 건강한 바지락 모패 선정을 위한 분자 marker 기술

우리나라 바지락 혈구의 발현 유전체 유래 microsatellite marker를 성공적으로 제작하여 우리나라 바지락 개체군내 이들 유전자의 다양성을 처음으로 확인하였다. 또한, 우리나라 바지락과 외국바지락 (일본, 중국, 홍콩)과의 집단 비교에도 집단별로 구별할 수 있는 유용한 marker임을 확인하였다. 개발된 분자 marker를 이용한 외국산 바지락 유입 및 불법 양식 규제를 위한 유용한 기초 자료로 제공될 것이다. 해산이매패류의 유전학적 분석에 일반적으로 단일 유전자 (18S rDNA, ITS, 또는 COI)를 이용하여 분석하는 경우가 많으나, 3종의 핵내와 1종의 미토콘드리아에 존재하는 유전자를 동시에 비교함으로써 바지락종의 형태학적 분류의 난점을 분자생물학적 기법의 응용을 응용함으로써 해산 이매패류의 분류에 기초적인 자료로 활용될 것으로 생각된다.

## 2절 바지락 치패 인공종묘생산

### 1. 바지락 인공종묘 대량생산 및 채묘기술

바지락 인공종묘 대량생산기술은 향후 수산업 적으로 가치가 높은 다른 이매패류의 종묘 대량생산에 응용 할 수 있으며, 생산 기술에 대한 지침서 작성과 기술 전수에 활용할 수 있다. 본 연구에서는 바지락 인공종묘 생산은 했지만 생산량은 목표치에 미치지 못하였다.

## 3절 먹이생물 대량배양에 관한 연구

### 1. 먹이생물 대량 배양

먹이생물의 대량 생산은 식물플랑크톤을 먹이원으로 하는 이매패류 뿐 아니라 전복, 굴 등 다른 패류와 해삼양식에도 활용될 수 있다. 본 연구에서는 저렴한 비료 등을 이용하여 생산 원가를 절감하고, 양식현장에 기존에 가용한 시설과 물품을 이용하여 먹이생물을 생산을 대규모화 했으며, 바지락 유생의 성장단계별로 필요한 먹이의 선호도를 제시하였다. 먹이생물의 대량 생산은 최근 양식업계의 구조개선에 따라 먹이생물 수요가 증가함에 따라 향후 이매패류 및 해산 무척추동물양식에 있어 중요한 사업으로 사료된다.

## 4절 바지락 중간 육성 방법에 관한 연구

### 1. 바지락 치패의 바닥식과 수하식 육성 방법 비교

이번 연구를 통해 바지락의 중간육성용 수하식 양성 기술 개발하였으며 현장적용 결과 수하식 양성기에서 성장한 바지락의 성장 및 비만도가 바닥식에 비해 우수하며 질병에 대



한 감염율과 감염도가 낮고 폐사율 역시 현저히 낮은 것으로 나타났다. 특히 수하식 양성 중 흔히 발생하여 문제가 되는 부착생물을 효과적으로 제어하기 위한 기술을 개발함으로써 수하식양성 기법의 효과를 증대시킬 수 있는 기술을 확보하였다. 이러한 기술개발 성과를 기반으로 “부착생물 저감용 바지락 수하식 양성기”에 관한 지적재산권을 출원하였다. 또한 향후 이러한 성과는 국제학술지에 투고하여 국제적 검증을 받을 예정이다.

# SUMMARY

## Chapter 1. The development of mass production systems for Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) seed

The Manila clam or short-neck clam (*Ruditapes philippinarum*) is an important aquaculture species including oyster that inhabits on sandy or muddy tidal flats along the coastal areas in Korea. In 1990 Korea produced 70,000 tones of clams and the clam landing declined gradually. Currently 30,000-40,000 tons of clams are produced along the west and south coast of Korea. The natural clam seed supply for clam industry has experienced the decline in the seed harvest, due to decline in clam culture area by massive development and reclamation, deterioration of habitat quality, increase in infectious diseases and over-fishing. To compromise shortage of the seed supply, Korean clam industry has imported clam spats from oversea, mainly from China, and the Korean clam industry has paid over 6 billion won for the imported seeds. The imported clam seeds are often exhausted during long-distant transportation resulting in depressed viability and subsequent mortality after sowing in the clam beds. Accordingly, developing a mass production of clam seed is greatly demanded by the clam industry of Korea and the technique would improve the seed supply condition.

## Chapter 2. Aim and scope of the study

To obtain a high quality broodstock for the seed production, 1) we investigated the reproductive effort, condition index, gametogenic condition, parasite infection and immune capacity of Manila clams collected from the west, south and east coast and from Jeju Island over 3 year periods. 2) We examined the growth and overall pathogenic condition of different age of Manila clam raised in intertidal clam culture grounds. 3) To identify genetic characteristics of clam populations in Korea, we developed genetic markers based on EST-linked microsatellite and confirmed the marker polymorphism among different clam populations. Additionally, the polymorphic markers were utilized in discrimination of natural native Korean clam populations and the clams originated from overseas. 4) We studied genetic characteristics of two species of *Ruditapes* (*R. philippinarum* and *R. variegatus*) clams inhabiting in Jeju Island and morphological characteristics.

In an attempt to achieve stable clam seed production, 1) Manila clams collected in early spring were conditioned using indoor recirculation system through controlling of water temperature and food supply. In addition, reproductively mature adults clams were induced to spawn and

subsequent larval development was observed using scanning electron microscopy and compound microscope. 2) To develop massive seed harvest technique in hatchery condition, larval settlement and subsequent collection method was developed by eliminating harmful organisms in the tank during the larva development. 3) To optimize the larval growth in the tank, we examined the supply of algal food to different size of clam larvae and spats. 4) A suspended culture technique using net-bag was developed and growth rate and parasite load in clams in suspended culture and bottom culture were compared. Growth rate of clam in suspended culture was 2.5 times faster with much lower level of the parasite infection.

### **Chapter 3. Research method and result**

#### **1. Evaluation of healthy Manila clam broodstock**

a. Evaluation of reproductive effort, condition index and *P. olsenii* infection intensity of Manila clam on the East, West and South coasts and Jeju Island, Korea in 2009, 2010 and 2011.

The reproductive condition and reproductive effort have been considered to be an important element to select quality broodstock for artificial seed production. To obtain optimal and quality broodstock clam, reproductive effort, condition index and parasite infection intensity, clams were collected from 25 sites on the East, West, South coasts and Jeju Island in June or July in 2009, 2010 and 2011. The condition index (CI) was found to be highest in clams from the west coast. In particular, clams from Duruini, Hwangdo, and Boryoung showed fairly higher CI. In June and July, reproductive condition of clams on the south coast was partially spawned while clams from the west coast such as Sunjae, Sungam, Gonam and Imwon were in ripe. This finding suggested that when clams are fully matured in June, it is suitable period to reserve large adult clams used as broodstock in hatchery operation. GSI and fecundity of clam was higher in June in 2009 and 2011, while it was somewhat lower in July in 2010. Infection intensity of *P. olsenii* in clams was found to be higher on the south coast followed by west coast. The parasite burden was much lower among clams from Jeju Island and from the east coast. In conclusion, clams from Bangpo and Padori in Chungnam, Geojae in Kyongnam province were considered to be a useful broodstock for artificial seed production, which showed higher CI and low parasite infection level.

b. Immuno-capacity and resistance to infection of clams from different coastal regions

b-1 Health assessment and monitoring growth and parasite infection of clams in different age group

b-1-1. Evaluation of health level of clams to secure healthy brood stock

To obtain quality clams to be used as broodstock in the seed production, clam must have superior physiological characteristics and a technique to identify such superior characteristics must be developed. Immune function of Manila clam was assessed in this study using flow cytometry and we compare immune function of clams in field and at laboratory after transportation to the laboratory. The immune parameters including hemocyte viability phagocytosis rate and the cell DNA damage level were found to be much better in clams before transported to the laboratory, suggesting that assessment of the immune parameters is a good technique to locate healthy broodstock.

#### b-1-2. Age-dependent growth *P. olsenii* infection intensity in bottom cultured clam

Growth, *P. olsenii* infection intensity and mortality of various age groups including spat, 1-year old and 2-year old manila clams were examined in this study. Clams used in the experiment were installed in cages and raised in intertidal mud flat. The clams cultured on tidal flat showed age-dependent shell growth, *P. olsenii* infection intensity, and mortality rate. The shell growth rate was found to be highest among 1 year old clams and the shell growth rate decreased as the age increase. Infection intensity of *P. olsenii* was the lowest in spats and the infection rate increased as the clam age become higher. The mortality rate was also found to be lower in juvenile clams.

#### b-2 Physiological response of clam populations challenged by *P. olsenii*

Clam populations from Gangjin (Jeonnam Province), Hongseong (Chungnam Province) and Jeju were challenged with the protozoan parasite, *P. olsenii* and the immune reaction were compared using flow cytometry. The challenged 3 populations by parasitic and bacterial pathogens were examined in terms of presence or absence of resistance to the infection to compare different immune responses and viabilities. As a result, the immune parameters of clam from Gangjin was significantly higher than that of other groups and its mortality rate induced by the pathogen challenge was comparatively lower. It was believed that Gangjin clam has physiologically superior characteristics compared to other clams in other areas, and it suggested presence of pathogen-resistant clam strains in nature.

### C. Genetic characterization of Manila clam in Korean waters

#### c-1 Development of microsatellite marker to differentiate Manila clam populations

In the present study, we developed EST-derived microsatellite markers to investigate genetic characteristics of Manila clam populations in Korean waters, and to identify the marker

polymorphisms in Manila clam populations. From the 1,128 unique genes (Expressed sequence tags, EST) originated from Manila clam hemocyte cDNA library constructed in 2006, we discovered 11 microsatellite candidate clones including over 5 repeats of di, tri, tetra, hexa, penta nucleotides after microsatellite screening, and examined the PCR amplification for marker optimization. Eleven verified markers were determined the polymorphism in 15 clams. Characteristics of 11 microsatellite loci are as followed; the numbers of alleles per locus ranged from 3 to 11 with an average 6.5. The observed heterozygosity was 0.0667 to 0.7692, while expected heterozygosity was 0.3571 to 0.8843. Also, 6 markers (KR1,6,11,12,14,17,19) were not amplified in some individuals, indicating that the null alleles are present in the Manila clam. The EST-linked microsatellites used in this study were found to be a useful resource for population genetic of *R. philippinarum*.

#### c-2 Genetic characterization of Manila clam populations between Korea and foreign country using microsatellite marker

To compare genetic variation of Manila clam populations in Korea and clams in other countries, we sampled clams from 8 sites on the west coast of Korea (Hwangdo, Boryoung, Gomso, Geojae, Imwon, Sungsan, Seogwi and Oeido), 2 sites in China (Xiamen and Yentai), Japan (Kanazawa-ku) and Hong Kong. The genotyping of collected clams was carried out using 5 markers (KR2,6,14,17,19) and then analyzed the genetic distance and phylogeny. As a result, the genetic distance and phylogeny of 5 markers (KR2,6,14,17,19) showed that Boryoung (Korea) and Yentai (Xiamen) formed a single clade with closet relationship than any other populations. Oeido (OD) and Hongkong (HK) also distinguished as a group (*R. variegatus*) of the genus *Ruditapes* from Manila clam populations. This finding suggested that the EST-linked microsatellites used in this study were found to be a useful resource for population genetic of *R. philippinarum* as well as cross-species amplification of the genus *Ruditapes*.

#### c-3 Comparison of genetic characteristics of Manila clam (*R. philippinarum*) and variegated carpet shell (*R. variegatus*)

In the national survey of Manila clam, we found the two species of clam, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes variegatus* inhabiting in Jeju Island. Consequently, we isolated three nuclear (18S rDNA, H3 and ITS) and one mitochondrial DNA (COI) from *R. philippinarum* and *R. variegatus* collected from coastal Jeju to examine taxonomic affiliation of the two species. The sequence comparison indicated that the two populations of clams sampled from sand flats in Sungsan and Seogwipo were identified as *R. philippinarum*, while the other two populations sampled in pebbles beach in Oeido and Geumneung were identified as *R. variegatus*. The ratio of depression of a pallial sinus to shell length in *R. philippinarum* was a significantly high

compared to that of *R. variegatus* ( $p < 0.05$ ). In addition, the pair-wise genetic distance and phylogenetic analysis of the 2 clam populations formed a monophyletic clade with published sequences of other population of *R. philippinarum* as well as *R. variegatus*. The morphology as well as the genetic analysis carried out in this study indicates that *R. philippinarum* and *R. variegatus* are genetically distinct and different in the genus *Ruditapes*.

## **2. Study on Manila clam seed production in hatchery**

### **a. Conditioning of clam broodstock in an indoor recirculation system**

In an attempt to produce clam seed in an hatchery condition, we have conditioned the clam broodstock in an indoor recirculation system. Manila clams to be used as broodstocks were collected from Hongsung on the west coast of Korea in April 2010, when the water temperature remained 13°C. To condition the broodstock, water temperature in the indoor tank was raised from 13 to 20°C by elevating the water temperature daily by 1°C for 7 days. The clams were fed with concentrated algal paste, Shellfish Diet (Reed Mariculture, USA) by 3% of the clam dry tissue weight twice a day. To monitor the reproductive condition, 20 clams were sampled weekly for 57 days. Level of gonad development was determined using histology and quantity of eggs produced was assessed by the clam egg-specific antibody in ELISA. During the course of experiment, mortality remained as 1.1%. Histology revealed that reproductive condition of clams at the beginning of the experiment was early development. Reproductively ripe and ready for spawning clam was first appeared on day 42. At the end of study on day 57, 40% of clams in conditioning became reproductively ripe and ready for spawning. On day 22, the GSI was estimated to be 3.7% and it was 8.2% on day 57. The estimated fecundity of ripe clams ranged 2,876,684±1,473,906 eggs/clam. The protozoan parasite *Perkinsus olseni* infection intensity in clam also increased during the condition period, from 272,836±99,844 cells/clam to 705,064±313,231,844 cells/clam at the end of the experiment. Relatively small amount of egg produced at the end of the experiment was in part, explained by the high level of parasite infection.

### **b. Spawning induction and larval development in the Manila clam**

To understand hatching and subsequent larval development, sexually mature clams were induced to spawn in indoor tanks and the larvae were raised by supplying microalgae produced in the laboratory. Manila clams were collected from Kymnyeong in Jeju Island in August, 2011 and maintained in an indoor tank with supply of cultured microalgae. The clams from Kymnyeong spawned in the tank and produced approximately 5 million eggs per clam. Using compound microscope and scanning electron microscopy (SEM), the embryo and larval development of clam

were recorded. The size of fertilized egg ranged from 55 to 60  $\mu\text{m}$ , and the egg formed polar body within 1 hr. After progression in the cell division through 2, 4, and 8 cell stages, the gastrula stage of embryo observed in 5 hrs of post-fertilization and initiated the free swimming with developing the protoconch. At 19 hrs in post-fertilization, the embryos reached the D-shape stage and showed feeding behavior. The larvae were fed with micro-algae, *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis* and these algae could be observed in the digestive rack of the embryos. At 2 day, the embryos developed into the early D-shaped larvae with velum. As passed through four steps of development such as straight hinge veliger, early umboned veliger, late umboned veliger and pediveliger, the embryos was reached post-larvae stage with siphon at 36 days. During the period of experiment, the daily growth rate of clam larvae was 4.6  $\mu\text{m}$  and it reached 281.2  $\mu\text{m}$  in post setting.

### **3. Mass production of *R. philippinarum* seed in hatchery**

#### **a. Seed production system for Manila clam spat**

To produce clam seeds in hatchery, 3~5 years old adult clams were selectively chosen as broodstocks. The adult clams were rinsed with 3 ppm  $\text{KMnO}_4$  to eliminate parasites and pathogens. After transferred to the hatching pond, the water was changed everyday and food organisms were supplied 4 times a day after checking the decrease of the food level. After examining reproductive condition of the broodstock clams, they were transferred to the hatching tank and spawning was induced by 1) 4~5 times of desiccation stimulus, 2) freshwater stimulation (30 minutes of immersion), and 3) cold temperature stimulation (30 minutes in the refrigerator). Just prior to spawning induction, 3 ppm EDTA was added in the hatching pond, one capsule (0.1 g) of vitamin was also added. Spawning starts between mid-night and 2 a.m. under dark and quiet conditions. The water temperature of the hatching pond was adjusted to 23°C, then the plate was transferred to another hatching pond after the density of the fertilized egg reached 15~20 ind./mL. After 24 hours after fertilization D-larvae stage was observed.

Food organism was provided at 6 hour interval for 5~6 days, and water was changed twice a day. After 2 weeks, Manila clam larvae metamorphosed through umbone stage and reached 200~300  $\mu\text{m}$  in size and settled down on the pond floor. After the settlement, larvae are transferred to a larvae nursery pond, water circulation and food supply were kept in same condition, and transferred to other pond after screening with different size using Muller gauze.

#### **b. Seed collecting technique for the mass production**

Since clam larvae in D-shape larval stage need to be transferred with seawater, 60  $\mu\text{m}$

Muller gauze was placed on a bucket and the seawater was withdrawn using siphon. The clam larvae held in the bucket were transferred to other water tanks. When the larvae settled after the umbone stage, they were transferred to the larvae nursery pond, which was covered with mud to assist the settling and secure habitats for the larvae. Finally, the mud and waste material in the pond were discarded with dead larvae and the slow growing larvae were also eliminated. Fine mud filtered through 60 µm net was supplied into the larvae nursery pond, and spats were filtered onto 100, 200, 250, 320, or 420 µm Muller gauze according to the size. Because the water level of the settling pond was lower than the larvae nursery pond, Muller gauze was placed at the discharge pipe and filtered seawater was sprayed onto the pond wall to prevent dry. All the mud and spats were completely discharged slowly and filtered to harvest the clam spats. The clam larvae harvested from the nursery pond were filtered onto 500 µm mesh and weighed, then wet towels with filtered seawater were placed underneath the transportation container and transported.

#### 4. Mass culture techniques for the food organism of Manila clam

##### a. Mass culture techniques of microalgae as food for clam spats

One of the most important elements in the seed production in hatchery condition is the mass culture of microalgae as feed and pure culture of different sizes of algae to feed the different sizes of larvae or spats. To produce mass amounts of microalgae, several stages of culture were performed according to the size of the culture vessel, and inexpensive nutrients were supplied in the media to secure the economy of the culture operation. Microalgae selected as food organisms in this study included *Chaetoceros mulleri*, *Dicrateria inornata*, *Isochrysis galbana*, *Nitzschia* sp., *Platymonas subcordiformis*, and *Tetraselmis suecica*.

1st stage: stock culture (250 mL, 500 mL) → 2nd stage: small scale culture (2L, 3L) → 3rd stage: extended culture (middle culture; 20L) → 4th stage: extended culture (60L) → 5th stage: mass culture (6 m<sup>3</sup>)

Culture stages were composed of 4 to 5 sub culture steps with increasing volume, and the maintenance of stocks were carried out at a clean room at Gwangju University under the constant temperature. The concentration of algae before the inoculation of each culture stage was performed when *Tetraselmis suecica* and *Platymonas subcordiformis* reached 200,000 cells/mL, and *Nitzschia* sp., *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros mulleri* became 5,000,000 cells/mL. Before inoculation, the physiological status of phytoplankton was checked finally with microscope and fluorometer whether the FRI values were above 0.6.



b. Improvements of culture media and mass culture of food organism

The primary purpose of microalgae culture study was to develop low cost culture media to overcome the difficulties involved in algae mass culture and to maximize the benefit. Inexpensive agricultural fertilizer was tried in this study to enhance the algae growth in the media. However, it was realized that the agriculture fertilizer as nutrients in the algae culture had difficulty to reach the peak within a short period (5 days) and can not be used for an extended period, due to the imbalance in nutritional contents. Recipe for the mass culture of micro algae in the water tanks includes,

Species	Reagents	Normal growth	Reduced growth
<i>Platymonas subcordiformis</i>	Urea fertilizer	20 g	10 g
	Composite fertilizer	10 g	-
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	1.6 g
	MnSO <sub>4</sub>	0.1 g	-
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	5 g
	EDTA-2Na	10 g	8 g
<i>Isochrysis galbana</i>	Urea fertilizer	10 g	3.6 g
	Composite fertilizer	8 g	-
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	2 g
	KNO <sub>3</sub>	10 g	10 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	5 g
	EDTA-2Na	10 g	8 g
<i>Nitzschia sp. (&amp; Chaetoceros mulleri)</i>	Urea fertilizer	20 g	10 g
	Composite fertilizer	10 g	-
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	1.6 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	5 g
	EDTA-2Na	10 g	8 g
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	10 g	10 g

- The amount of reagents are per 1 ton (1m<sup>3</sup>)
- When preparing the culture solution, freshwater is used for *Chaetoceros mulleri* and seawater is used for the rest of algae species.

For normal growth,

- When physiological condition is good, *Platymonas subcordiformis* grows well with only urea and composite fertilizers. Other species grows slowly with the same fertilizers.
- *Platymonas sp.* reaches the peak of 200,000 cells/mL, and *Dicrateria inornata* and *Chaetoceros mulleri* reach peaks of 4,000,000 cells/mL.

For reduced growth,

- *Platymonas subcordiformis* reaches a peak of 80,000 cells/mL, *Isochrysis galbana* and *Nitzschia sp.* reach peaks of 700,000~1,000,000 cells/mL.
- When peaks do not reach after 5 day incubation, reagents were reduced to 50% level (To reduce the mortality rate of larvae and to prevent the deterioration of the water quality of hatching tank).

### c. Concentration system for the food organism

Food organisms were cultured in massive volume using a outdoor mariculture farming facility and concentrated to produce almost limitless amount. Because the microalgae were culture under a natural conditions, it was expected that the algae produced from this study could be healthier than the algae produced indoor incubation facility. Before condensing the algae, it was essential to remove impurities in the media including suspended solids and zooplankters such copepods. At 1st stage, the cultured seawater was passed through the long-hair filtration system, at 2nd stage, cloth bag filter removes 50~80  $\mu\text{m}$  sized particles, at 3rd stage, the cartrodge filter removed 20~30  $\mu\text{m}$  sized particles. To reduce effect of high temperature, a cooling system was installed. The concentration system was a modular structure adopting multi-stage membrane screens and 15 of which were connected in parallel with spacers in the middle to increase the filtering area and give structural strength. It could be easily expanded with the increase in food demand. The concentrated food organisms grown outdoor was proven to be unsuitable for early clam larvae as food, but it was good to the larvae larger than 600  $\mu\text{m}$  and supplied as food to spat and juvenile clams.

## **5. Study on the intermediate culture of juvenile clams using a suspended culture system**

### a. Growth of juvenile clam in bottom culture and suspended culture

Clams in conventional bottom culture are exposed to radical changes of the environment at the time of ebb tide and the feeding time is limited to high tide. Alternatively, clam may grow in a submerged suspended facility which increases the feeding time and subsequent better growth. In this study, juvenile clams were raised in hanging culture facility and conventional bottom culture. As a result, shell growth and fatness of clam spats raised in the hanging culture were far superior to the clams raised in bottom culture. The parasite infection and the mortality rate were also markedly lower in the suspended culture system. Therefor, it was concluded that the hanging culture technique developed in this study can be used in intermediate culture of juvenile clams for grow out, with low mortality and faster growth.

## **6. Analysis of economic value of the seed production technique and industrial application**

### **a. Plans to reduce the production cost of food organisms**

It is essential to supply enough food organism to produce Manila clam seed in hatchery condition in large scale. The algae culture methods with detailed sub culture stages developed in this study can be applied in field without any special equipments. The modified media formula uses low cost agricultural fertilizer instead of expensive high grade reagents and it reduces the food organism production cost. For f/2 media needs various reagents including  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , vitamin B12 (cyanocobalamin), Biotin, Thiamine·HCl, and macro-nutrients of  $\text{NaNO}_3$  with 75 mg/L, and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  with 5 mg/L, and total of 80 g is required to produce 1 ton of f/2 media. This modified media simplified reagents needed and macro-nutrients of N, P were replaced with agricultural fertilizers. The reagents used in the algae production cost less, 5~10 times less expensive than other reagents.

### **b. Development of efficient seed collecting methods with substrate**

The efficient seed collecting method was developed for D-larvae stage, for settling larvae through umbone stage, and for transferring to the nursery ground. This method can be applied in the seed production of other marine bivalve species, which share similar growth and metamorphosis process. The technique also reduces damage or loss of the seeds during the production, and maintains good water quality. Also, production can be increased by maintaining the spats separately sorted according to the size and changing the food ratio.

## **Chapter 5. Results of Current Research and Future Plan for the Application**

### **1. Study on selecting healthy broodstock for clam seed production in hatchery system**

#### **a. Evaluation of healthy broodstock clams and conditioning in indoor system**

In the present study, we collected baseline information on location of a high quality broodstock clam which produces high reproductive effort, low parasite infection and high condition index. The results obtained in this study will be usefully applied in selecting quality clam broodstock for seed production in shellfish farming industry. In addition, we established the artificial spawning technique for adjusting timing of the spawning using an indoor culturing system. This technique also will be widely applied in other marine shellfish aquaculture such as oysters and ark shell.

b. Development of health measurement techniques to select healthy broodstock

To obtain good broodstock for clam seed production in hatchery condition, the clam population must have superior physiological characteristics, and a technique to measure health condition of clam must be established. In this study we tried to develop a technique which quantify immune parameter of clams including level of DNA damage, apoptosis, necrosis and ROS production. Flow cytometry analyzed the immune parameters of clam and the technique indicated that clams from Gangjin were physiologically superior and could be a good broodstock for clam seed production. Such techniques and the research results were published in the Korean Malacological Society Journal in 2009, and a manuscript is under preparation.

c. Development of molecular marker for selecting healthy broodstock

We successfully developed the microsatellite marker derived from expressed sequence data of clam hemocyte and identified the marker polymorphism among clams in Korea. Also, these marker was found to be a useful tool to distinguish native Korean clams from oversea clam populations (Japan, China and HongKong). Accordingly, the molecular marker developed this study could be applied in identification of imported clams from abroad as well as in the study of population genetics of *R. philippinarum*. Genetic characterization of marine bivalves is routinely investigated using single source of DNA including 18S rDNA, ITS or COI. However, we examined the sequences of 3 nuclear genes and single mitochondrial gene to distinguish 2 clam species. The molecular technique used in this study is considered to be a powerful tool to resolve the issue of marine bivalve taxonomy. Outcome of this study is presented in international conferences, and under preparation to submit in an international journal.

## **2. Study on the high quality broodstock population**

a. Mass production of clam seeds in hatchery condition and seed collecting technique

The technique developed in this study for mass production of Manila clam seeds in hatchery could be widely used for the mass production of other marine bivalve seeds. The guideline of clam seed production in hatchery system prepared in this study could be used in the shellfish industry.

b. Mass culture of micro algae as food organism for clam seed and spats

The mass production of food organism can be utilized not only for marine bivalves seed production, but also for other shellfish seeds such as oysters, and sea cucumbers which feed on phytoplakton as food source. In this study, we used inexpensive fertilizers to reduce the

production cost, scaled-up the throughput using the facilities and equipments already available at the aquaculture farms, and presented good food organisms favored by various stages of Manila clam juveniles. The mass production of food organism can be a great business opportunity with the increase in the demand of food organisms due to the restructuring of aquaculture industry.

### **3. Growth and parasite burden of clams raised in intertidal bottom culture and the submerged hanging culture facility**

We developed a new suspended culture method for intermediate culture of juvenile clam. Juvenile clams were included in a closed net-bag and suspended underwater for grow-out. This technique was successfully applied to field condition, resulting in significantly higher growth rate and condition index with lower level of parasite infection and mortality rate compared to those of the intertidal bottom cultured clams. In particular, we developed an effective technique for reducing fouling organism, which increases the efficiency of suspended culture. Based on these achievements, we applied for a patent titled as "Fouling-reducing apparatus for bivalve suspended culture". In addition, we will also submit the remarkable result to an international journal.



## 그림 목 차

그림 1-1-1. 우리나라 바지락 천해양식 생산량과 금액 .....	59
그림 3-1-1. 2009-2011년 바지락 채집지역 .....	64
그림 3-1-2. 바지락 수컷 개체의 생식소 발달 단계 .....	65
그림 3-1-3. 바지락 암컷 개체의 생식소 발달 단계 .....	65
그림 3-1-4. ELISA를 이용한 바지락의 egg 단백질량 측정 과정 .....	66
그림 3-1-5. 2009-2011년 동·서·남해안 및 제주연안의 바지락 비만도 .....	68
그림 3-1-6. 2009-2011년 지역별 바지락의 생식소 발달 단계 비교 .....	69
그림 3-1-7. 2009-2011년 지역별 생식소지수 비교 .....	70
그림 3-1-8. 2009-2011년 지역별 바지락 포란수 (Fecundity) 비교 .....	71
그림 3-1-9. 2009-2010년 지역별 바지락 포자충 감염 비교 비교 .....	73
그림 3-1-10. 시료채집지역 .....	84
그림 3-1-11. 각 연령 그룹간 계절에 따른 패각성장, 기생충 감염 및 폐사율 .....	86
그림 3-1-12. 시료채집 지역 (충남 홍성, 전남 강진, 제주 외도) .....	88
그림 3-1-13. 충남 태안 바지락에서 분리된 미동정 원생동물 (MPX) 영양체 .....	89
그림 3-1-14. 연구실에서 2개월 이상 적응된 제주, 홍성, 강진 바지락 혈구의 DNA 손상도 비교 .....	91
그림 3-1-15. 연구실에서 2개월 이상 적응된 제주, 홍성, 강진 바지락 혈구의 세포자살율과 세포괴사율 비교 .....	92
그림 3-1-16. MPX와 <i>V. tapetis</i> 에 접종된 바지락의 폐사율 비교 .....	93
그림 3-1-17. cDNA library data를 이용한 microsatellite marker screening, primer 제작 및 PCR 반응 .....	96
그림 3-1-18. EST-microsatellite primer set을 이용하여 증폭된 바지락 15개체의 PCR 산물의 3% metaphore agarose gel 전기영동. (A)1-9; KCM12, 10-21; KCM19, 22-32; KCM15, 33-44; KCM7, 45-56; KCM17, (B)1-12; KCM1, 13-25; KCM2, 26-37; KCM6, 38-48; KCM9, M: 100bp marker .....	100
그림 3-1-19. 우리나라바지락과 외국 바지락 집단과의 유전학적 거리 분석 .....	103
그림 3-1-20. 바지락과 아기바지락의 서식지 (A) 성산, (B) 서귀, (C) 금능, (D) 외도 .....	106
그림 3-1-21. 바지락 ( <i>Ruditapes philippinarum</i> )과 아기바지락 ( <i>Ruditapes variegatus</i> )의 SSU rDNA와 백 합과 이매패류의 SSU rDNAs (18S rDNA)를 이용하여 MEGA 4.0 program의 Neighbor-Joining 방법에 의해 분석된 SSU rDNA의 계통도 .....	110
그림 3-1-22. 바지락 ( <i>Ruditapes philippinarum</i> )과 아기바지락 ( <i>Ruditapes variegatus</i> )의 histone 3 유전 자 염기서열을 이용하여 MEGA 4.0 program의 Neighbor-Joining 방법에 의해 분석된 histone 3 의 계통도 .....	111
그림 3-1-23. 바지락 ( <i>Ruditapes philippinarum</i> )과 아기바지락 ( <i>Ruditapes variegatus</i> )의 COI 유전자와 백	



합과 이매패류의 COI 유전자 (아미노산 서열)를 이용하여 MEGA 4.0 program의 Neighbor-Joining 방법에 의해 분석된 COI 유전자의 계통도 .....	112
그림 3-1-24. 바지락 ( <i>Ruditapes philippinarum</i> )과 아기바지락 ( <i>Ruditapes variegatus</i> )의 ITS 유전자와 과 백합과 이매패류의 ITS 유전자를 이용하여 MEGA 4.0 program의 Neighbor-Joining 방법에 의해 분석된 ITS 유전자의 계통도 .....	113
그림 3-2-1. 바지락 채집 지역 (충남 홍성) .....	115
그림 3-2-2. 순환여과 수조의 도면 .....	116
그림 3-2-3. 사육일수에 따른 환경변화 측정 (수온, 염분) .....	117
그림 3-2-4. 사육기간에 따른 용존산소 (a), 암모니아 (b) 및 아질산 (C) 변화 .....	119
그림 3-2-5. 바지락 생존률 .....	120
그림 3-2-6. 연구 기간 동안 비만도의 변화 (ANOVA, $p < 0.05$ ) .....	121
그림 3-2-7. 생식소 발달 단계 변화 .....	122
그림 3-2-8. 생식소 지수 Gonad somatic index (GSI) 결과 (ANOVA, $p < 0.05$ ) .....	123
그림 3-2-9. 환산된 바지락 포자충 감염도 ( <i>Perkinsus</i> cells/g tissue wet weight) (ANOVA, $p < 0.05$ ) .....	123
그림 3-2-10. 미세조류은행으로부터 분양받은 먹이생물 .....	125
그림 3-2-11. Conwy 배지 조성표 .....	126
그림 3-2-12. 용량에 따른 먹이생물 배양 방법 .....	127
그림 3-2-13. 모패 순치 및 치패사육을 위한 사육시스템 모식도 .....	128
그림 3-2-14. 채집 장소 (제주시 김녕항) .....	129
그림 3-2-15. 바지락 모패의 순치 및 완숙한 바지락의 외부모습 .....	130
그림 3-2-16. 산란하는 바지락 암컷과 수컷의 모습 .....	130
그림 3-2-17. 광학현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 I .....	132
그림 3-2-18. 광학현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 II .....	133
그림 3-2-19. 전자현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 I .....	134
그림 3-2-20. 전자현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 II .....	135
그림 3-2-21. 바지락 유생의 성장률 .....	136
그림 3-2-22. 산란 전·후 바지락 모패의 생리적 변화 .....	137
그림 3-3-1. 고흥 남성리, 강진 하저, 여수 선소, 고창 곰소바지락 모패 .....	139
그림 3-3-2. 2010년 4월 남성리 바지락 모패 .....	140
그림 3-3-3. 2011년 8월 충남 태안시 라향어촌계 바지락 모패 .....	140
그림 3-3-4. 바지락 모패 구입 후 모패 관리. 먹이생물 주입 전 후 .....	141
그림 3-3-5. 평면배치 양식장의 수동형 먹이 공급방법 .....	143
그림 3-3-6. 거제 두양수산 모래여과 시설과 펌프 및 대량배양 수조 .....	144
그림 3-3-7. 거제 두양수산 먹이생물 2, 3단계 수조 .....	145

그림 3-3-8. 현미경으로 관찰한 바지락의 정자와 난자 .....	146
그림 3-3-9. 성숙된 바지락 모패의 건조 자극 .....	147
그림 3-3-10. 성숙된 바지락 모패의 산란수조에서 산란 .....	147
그림 3-3-11. 3차년도 수정란에서 D상 유생기까지 변이 .....	149
그림 3-3-12. 뽕 전처리사진 .....	150
그림 3-3-13. 착저용 틀 (size: 91 x 76 x 4.5 cm) .....	151
그림 3-3-14. 착저판 소독 및 제작 .....	151
그림 3-3-15. 바지락 각정기 유생 (1.5~3 mm) .....	152
그림 3-3-16. 착저한 200 $\mu$ m의 바지락 유생 .....	152
그림 3-3-17. 착저한 500 $\mu$ m의 바지락 유생 .....	153
그림 3-4-1. 패류 먹이생물인 <i>Platymonas subcordiformis</i> .....	162
그림 3-4-2. 패류 먹이생물인 <i>Chaetoceros mulleri</i> .....	163
그림 3-4-3. 패류 먹이생물인 <i>Dicrateria inornata</i> .....	163
그림 3-4-4. 원종 (250 mL, 500 mL) 및 1단계 배양 (소량배양 (2 L, 3 L)) .....	165
그림 3-4-5. <i>Platymonas subcordiformis</i> 1단계 배양 (소량배양 (2 L, 3 L)) .....	166
그림 3-4-6. <i>Chaetoceros mulleri</i> 원종 (250 mL, 500 mL) 및 1단계 배양 (2 L, 3 L) .....	166
그림 3-4-7. <i>Isochrysis galbana</i> 원종 (250 mL, 500 mL) 및 1단계 배양 (2 L, 3 L) .....	166
그림 3-4-8. <i>Tetraselmis suecica</i> 원종 (250 mL, 500 mL) 및 1단계 배양 (2 L, 3 L) .....	167
그림 3-4-9. <i>Nitzschia sp.</i> 원종 (250 mL, 500 mL) 및 1단계 배양 (2 L, 3 L) .....	167
그림 3-4-10. 2단계 확대배양 (중간배양 (20 L)) .....	168
그림 3-4-11. <i>Platymonas subcordiformis</i> , <i>Chaetoceros mulleri</i> 2단계 확대배양 (중간배양 (20 L)) .....	168
그림 3-4-12. <i>Chaetoceros mulleri</i> , <i>Tetraselmis suecica</i> 2단계 확대배양 (중간배양 (20 L)) .....	169
그림 3-4-13. <i>Isochrysis galbana</i> 2단계 확대배양 (중간배양 (20 L)) .....	169
그림 3-4-14. <i>Chaetoceros mulleri</i> 3단계 대량배양 (6 m <sup>3</sup> ) .....	170
그림 3-4-15. <i>Isochrysis galbana</i> 3단계 대량배양 (6 m <sup>3</sup> ) .....	170
그림 3-4-16. <i>Platymonas subcordiformis</i> 3단계 대량배양 (6 m <sup>3</sup> ) .....	171
그림 3-4-17. <i>Tetraselmis suecica</i> 3단계 대량배양 (6 m <sup>3</sup> ) .....	171
그림 3-4-18. 패류 먹이생물인 <i>Nitzschia sp.</i> (상좌) <i>Platymonas subcordiformis</i> (상우) <i>Chaetoceros mulleri</i> (하좌) <i>Isochrysis galbana</i> (하우) .....	172
그림 3-4-19. 1단계 원종배양, 2단계는 2, 3 L 소량배양과 30 L 중간배양으로 구분 .....	173
그림 3-4-20. 3단계 먹이생물의 60 L 확대배양 .....	173
그림 3-4-21. 먹이생물의 4단계 대량배양 단계 .....	174
그림 3-4-22. 각 Media에 따른 <i>Platymonas subcordiformis</i> 의 활성화도 .....	175

그림 3-4-23. 각 Media에 따른 <i>Isochrysis galbana</i> 의 활성화도 .....	176
그림 3-4-24. 각 Media에 따른 <i>Chaetoceros mulleri</i> 의 활성화도 .....	176
그림 3-4-25. Media1에서 각 종류 별 개체수 (cells/mL) .....	177
그림 3-4-26. Media2에서 각 종류 별 개체수 (cells/mL) .....	177
그림 3-4-27. Media3에서 각 종류 별 개체수 (cells/mL) .....	178
그림 3-4-28. Media4에서 각 종류 별 개체수 (cells/mL) .....	178
그림 3-4-29. 염분변화에 따른 <i>Platymonas subcordiformis</i> 의 밀도 변화 .....	182
그림 3-4-30. 염분변화에 따른 <i>Isochrysis galbana</i> 의 밀도변화 .....	183
그림 3-4-31. 염분변화에 따른 <i>Chaetoceros mulleri</i> 의 밀도변화 .....	183
그림 3-4-32. 중공사막 필터 .....	184
그림 3-4-33. 자연상태에서 농축하기 위한 전처리 시스템 .....	185
그림 3-4-34. 농축시스템 .....	186
그림 3-5-1. 2011년 6월 7일 충남 홍성 지역 조간대에서 치패 채집 모습 및 채집된 치패. 치패 채집 지역 지도 (A), 채집지역 조간대 전경 (B), 치패 채집 모습 (C), 채집된 치패 (D, E, F). .....	190
그림 3-5-2. 양성 실험 수행 지역. 지도 (A), 위성사진 (B), 실험지역 전경 (C), 바닥식 양성 장소 (D), 수하식 양성장 (E). .....	191
그림 3-5-3. 조간대에 설치한 바닥식 양성 cage. 저질을 파낸 후 치패를 묻은 모습 (A), 치패 유실 및 해적생물 침입 방지를 위해 그물을 덮은 모습 (B), 바닥 양성용 cage 설치 모습 (C), 설치 완료된 바닥식 양성장 (D). .....	193
그림 3-5-4. 수하식 양성용 내부 및 외부 cage. 수하식 내외부 cage 모식도 (A), 수하식 양성용 내부 cage 모식도 (B), 해수의 유통에 의한 바지락의 이동 방지를 위해 내부 cage에 넣은 나일론 실타래 (C), 치패 유실 및 해적생물 침입 방지를 위해 뚜껑을 덮은 모습 (D), 수하식 양성시설 (E), 수하식 cage 설치 모습 (F). .....	194
그림 3-5-5. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 패각 성장 비교. 각장 (A), 각고 (B), 각폭 (C) .....	196
그림 3-5-6. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 패각 중량 비교. 패각중량 (A), 습중량 (B), 총중량 (C) 비교 .....	197
그림 3-5-7. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 비만도 비교. (A; 습중량/패각중량, B; 습중량 x 1,000/각장 x 각고 x 각폭) .....	199
그림 3-5-8. 수하식 양성 바지락의 성장 결과. 내부 cage에 나일론 실타래를 충전한 모습 (A), 바닥식 양성장에서 채집된 바지락 (B), 수하식 양성장에서 채집된 바지락 (C), 바닥식과 수하식 바지락의 크기 비교 (D), 실험 과정 중 수하식과 바닥식 양성 바지락의 성장 비교 (E) .....	200
그림 3-5-9. 다양한 부착생물이 부착된 수하식 양성 외부 cage의 모습 .....	202

그림 3-5-10. 수하식 양성 내부 cage 바깥쪽에 부착한 지중해담치 .....	203
그림 3-5-11. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 누적폐사율과 <i>P. olsenii</i> 감염. 누적폐사율 (A), <i>P. olsenii</i> 감염률 (B), <i>P. olsenii</i> 의 감염도 (C; Cells/clam, D; Cells/g) .....	206
그림 3-5-12. 수하식과 바닥식 바지락의 생식주기 비교. 수하식 (A), 바닥식 (B) .....	208
그림 3-5-13. 바지락 난모세포의 성숙단계 (A; Early active, B; Late active, C; Ripe, D; Partially spawned, E; Spent/Inactive) .....	209
그림 3-5-14. 바지락 수컷 생식세포의 성숙단계 (A; Early active, B; Late active, C; Ripe, D; Partially spawned, E; Spent/Inactive.) .....	210
그림 3-5-15. 실험 지역의 수온, 염분 및 플랑크톤 변화. 수온 및 염분 (A), 식물플랑크톤 FSU (B) .....	211
그림 6-1-1. 하와이 힐로에 위치한 Pacific aquaculture & coastal resources center .....	221
그림 6-1-2. PACRC안에 있는 패류양식장의 전경 .....	222
그림 6-1-3. 하우스 내부 도면도 .....	222
그림 6-1-4. 하우스 내부에 있는 3톤 규모 사육탱크 .....	223
그림 6-1-5. 유생실험 탱크의 전경 및 구성 요소 .....	223
그림 6-1-6. 이매패류의 인공산란 유도탱크 .....	224
그림 6-1-7. 식물 플랑크톤 배양장의 전경 및 식물플랑크톤 저장소 .....	224
그림 6-1-8. 먹이생물 수조 해수의 필터 시스템 .....	225



## 표 목 차

표 1-1-1. 이상적인 바지락의 서식환경 .....	57
표 3-1-1. 시료 A와 B의 크기 및 면역력 비교 .....	78
표 3-1-2. 시료 A와 B의 크기 및 면역력간 상관관계 .....	81
표 3-1-3. 현재까지 보고된 면역값 중 최저값 비교 .....	82
표 3-1-4. 면역력 측정과 감염 실험에 사용된 바지락 .....	91
표 3-1-5. 바지락 ( <i>R. philippinarum</i> ) hemocyte cDNA library 클론 분석결과 .....	97
표 3-1-6. Microsatellite 검색 프로그램을 이용하여 검색된 바지락 ( <i>R. philippinarum</i> ) EST clone내 repeat motif 검색 .....	98
표 3-1-7. Microsatellite 증폭에 사용된 EST clones의 primer list, repeat motif와 PCR 증폭결과 .....	99
표 3-1-8. EST-microsatellite marker를 이용한 바지락 ( <i>R. philippinarum</i> )의 microsatellite locus의 다형성 .....	99
표 3-1-9. 우리나라 바지락과 외국바지락 집단간의 5 microsatellite marker의 특성 비교 .....	102
표 3-1-10. PCR 반응에 사용한 각 유전자 primer 목록 및 annealing temperature .....	105
표 3-1-11. 바지락 ( <i>R. philippinarum</i> )과 아기바지락 ( <i>R. variegatus</i> )의 형태학적 특성	106
표 3-1-12. 바지락과 아기바지락 SSU rDNAs (18S rDNA)의 염기서열과 BLAST similarity 비교 (SG: 서귀포, SS: 성산, WD: 외도, GN: 김녕) .....	108
표 3-1-13. 바지락과 아기바지락의 H3 유전자의 염기서열 분석 (SG: 서귀포, SS: 성산, WD: 외도, GN: 김녕) .....	108
표 3-1-14. 바지락과 아기바지락의 COI 유전자 염기서열과 BLAST similarity 비교 (SG: 서귀포, SS: 성산, WD: 외도, GN: 김녕) .....	109
표 3-1-15. 바지락과 아기바지락의 ITS 유전자 염기서열과 BLAST similarity 비교 (SG: 서귀포, SS: 성산, WD: 외도, GN: 김녕) .....	109
표 3-2-1. Conditioning일에 따른 바지락의 크기 및 중량 .....	120
표 3-4-1. 식물성플랑크톤 1, 2 단계 배양 & 원종 보관 배양 .....	180
표 3-4-2. 식물성플랑크톤 수조 대량 배양액 제조 방법 .....	181
표 3-5-1. 채집 날짜별 수하식과 바닥식 양성 바지락의 체장 및 체중 변화 .....	198
표 3-5-2. 수하식 양성 시설 중 외부 cage와 내부 cage에 부착한 지중해 담치의 개체 수 비교 .....	204
표 3-5-3. 수하식 양성 시설 중 외부 cage와 내부 cage에 부착한 주름 미더덕의 개체 수 비교 .....	204
표 3-5-4. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 누적 폐사율 비교 .....	207
표 3-5-5. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 <i>P. olseni</i> 감염률 비교 .....	207



## List of Figures

Figure 1-1-1. Annual landing of Manila clam in Korea .....	59
Figure 3-1-1. Map showing the sampling sites during the 2009-2011 .....	64
Figure 3-1-2. Gonad developmental stages of male clam .....	65
Figure 3-1-3. Gonad developmental stages of female clam .....	65
Figure 3-1-4. Flow chart showing the quantification method of clam egg protein using indirect-enzyme linked immunosorbent assay .....	66
Figure 3-1-5. Condition index of clams sampled in East, West, Southern coasts and Jeju Island from 2009 to 2011 .....	68
Figure 3-1-6. Gonad developmental stages of clams sampled in East, West, Southern coast and Jeju Island from 2009 to 2011 .....	69
Figure 3-1-7. Gonad somatic index of clams sampled in East, West, Southern coast and Jeju Island from 2009 to 2011 .....	70
Figure 3-1-8. Comparison of clam fecundity in locations during 2009-2011 .....	71
Figure 3-1-9. Comparison of <i>Perkinsus</i> intensity of clams in locations during 2009-2010 .....	73
Figure 3-1-10. Map showing the sampling location on the west coast of Korea .....	84
Figure 3-1-11. Seasonal variations of shell growth, <i>P. olseni</i> infection and mortality of different age groups of Manila clams reared in caged culture ground .....	86
Figure 3-1-12. Sampling locations (Hongsung, Gangjin and Weido) .....	88
Figure 3-1-13. Unidentified protozoan trophozoites (MPX) isolated from the Manila clam from Taean, Choongnam Province (scale bar=10 $\mu$ m) .....	89
Figure 3-1-14. DNA damage of the hemocytes of the Manila clams acclimated in the laboratory for 2 months after collection from Jeju, Hongsung and Gangjin .....	91
Figure 3-1-15. Apoptotic and necrotic cells of the hemocytes of the Manila clams acclimated in the lab for 2 months after collection from Jeju, Hongsung and Gangjin .....	92
Figure 3-1-16. Mortality rates of the Manila clam challenged by MPX and <i>V. tapetis</i> .....	93
Figure 3-1-17. Flow chart showing the method of microsatellite marker screening, primer design and polymerase chain reaction .....	96
Figure 3-1-18. A photograph of 3% Metaphore agarose gel electrophoresis of the amplified PCR products from 15 Manila clams using the EST-microsatellite primer sets. (A) 1-9; KCM12, 10-21; KCM19, 22-32; KCM15, 33-44; KCM7, 45-56; KCM17, (B)1-12; KCM1, 13-25; KCM2, 26-37; KCM6, 38-48; KCM9, M: 100bp marker .....	100
Figure 3-1-19. Genetic relationships among the Manila clams sampled from Korea, China, Japan and HongKong using Da genetic distance matrix .....	103
Figure 3-1-20. Habitats of <i>Ruditapes philippinarum</i> and <i>Ruditapes variegatus</i> in Jeju Island. (A) Sungsan, (B) Seogwi, (C) Geumneung, (D) Oeido .....	106
Figure 3-1-21. Phylogenetic relationship among Veneroid bivalves and two <i>Ruditapes</i> clams based on 18S rDNA sequences .....	110
Figure 3-1-22. Phylogenetic relationship among Veneroid bivalves and two <i>Ruditapes</i> clams based on	



Histone 3 sequences .....	111
Figure 3-1-23. Phylogenetic relationship among Veneroid bivalves and two <i>Ruditapes</i> clams based on COI sequences .....	112
Figure 3-1-24. Phylogenetic relationship among Veneroid bivalves and two <i>Ruditapes</i> clams based on ITS sequences .....	113
Figure 3-2-1. Map showing the sampling site (Hongsung in Chungnam province) of clam used in this study .....	115
Figure 3-2-2. Schematic illustration of the recirculation system in indoor tank .....	116
Figure 3-2-3. The graph showing the exchange of physical parameters (temperature and salinity) during the experimental period .....	117
Figure 3-2-4. The graph showing the exchange of dissolved oxygen (a), ammonium (b) and nitrogen dioxide (c) during the experimental period .....	119
Figure 3-2-5. Survival rates of clams during the experimental period .....	120
Figure 3-2-6. Variations of Condition index (CI) in clams during the experimental period (ANOVA, $p < 0.05$ ) .....	121
Figure 3-2-7. Variations of gonad developmental stage in clams during the experimental period .....	122
Figure 3-2-8. Variations of gonad somatic index (GSI) in clams during the experimental period (ANOVA, $p < 0.05$ ) .....	123
Figure 3-2-9. Variations of infection intensity of <i>Perkinsus</i> sp. in clams during the experimental period ( <i>Perkinsus</i> cells/g tissue wet weight) .....	123
Figure 3-2-10. Three species of microalgae purchased from KMMCC (Korea marine microalgae culture center) .....	125
Figure 3-2-11. Composition of Conwy medium .....	126
Figure 3-2-12. The figure showing the culture procedure of microalgae according to culture volume 127	
Figure 3-2-13. Schematic illustration of the recirculation system in indoor tank used for broodstock adaptation and spat culture of Manila clam .....	128
Figure 3-2-14. Map showing the sampling site (Kimneyong port in Jeju city) of clams used in conditioning experiment .....	129
Figure 3-2-15. The figure showing the adaptation of broodstock clams in indoor tank and appearance of fully matured male and female clam .....	130
Figure 3-2-16. Spawning of male and female clam .....	130
Figure 3-2-17. Developmental stages of clam embryo observed in light microscope (I) .....	132
Figure 3-2-18. Developmental stages of clam embryo observed in light microscope (II) .....	133
Figure 3-2-19. Developmental stages of clam embryo observed in scanning electrofield microscope (I). .....	134
Figure 3-2-20. Developmental stages of clam embryo observed in scanning electrofield microscope (II). .....	135
Figure 3-2-21. Growth rates of clam larvae during the experimental period. ....	136

Figure 3-2-22. Comparison of condition index and fecundity of clams before and after spawning	137
Figure 3-3-1. Broodstocks of Manila clams from Namseong-ri Goheung, Hajeo Gangjin, Seonso Yeosu, and Gomso Gochang	139
Figure 3-3-2. Broodstock of Manila clams from Namseong-ri Goheung, April 2010	140
Figure 3-3-3. Broodstock of Manila clams from Rahyang, Taean, August 2011	140
Figure 3-3-4. Conditioning of Manila clam broodstocks. Before and after the addition of food organisms	141
Figure 3-3-5. Manual feeding mechanism of food organisms in a flat-arrangement aquaculture hatchery	143
Figure 3-3-6. Sand filter equipments, pumps, and mass culture water tanks at Doo-Yang Hatchery in Geoje	144
Figure 3-3-7. 2nd and 3rd water tanks for food organism at Doo-Yang Hatchery in Geoje	145
Figure 3-3-8. Sperms and eggs of Manila clams under the microscope	146
Figure 3-3-9. Desiccation stimulus to the mature Manila clam broodstock	147
Figure 3-3-10. Spawning of the mature Manila clam broodstock	147
Figure 3-3-11. Morphosis from the fertilized egg to D-larva stage	149
Figure 3-3-12. Pre-treatment of the mud for the settlement of larvae	150
Figure 3-3-13. Frames for larvae settlement (size: 91 x 76 x 4.5 cm)	151
Figure 3-3-14. Sterilization and manufacture of the settling frames	151
Figure 3-3-15. Umbone (Prodissoconch II) stage of Manila clam (size 1.5~3 mm)	152
Figure 3-3-16. 200 µm size juveniles Manila clam settled on the settling frame	152
Figure 3-3-17. 200 µm size juveniles Manila clam settled on the settling frame	153
Figure 3-4-1. <i>Platymonas subcordiformis</i> , a food organism for shellfish	162
Figure 3-4-2. <i>Chaetoceros mulleri</i> , a food organism for shellfish	163
Figure 3-4-3. <i>Dicrateria inornata</i> , a food organism for shellfish	163
Figure 3-4-4. Stock culture (250 mL, 500 mL) and 1st stage culture (2 L, 3 L)	165
Figure 3-4-5. 1st stage culture (2 L, 3 L) of <i>Platymonas subcordiformis</i>	166
Figure 3-4-6. Stock culture (250 mL, 500 mL) and 1st stage culture (2 L, 3 L) of <i>Chaetoceros mulleri</i>	166
Figure 3-4-7. Stock culture (250 mL, 500 mL) and 1st stage culture (2 L, 3 L) of <i>Isochrysis galbana</i>	166
Figure 3-4-8. Stock culture (250 mL, 500 mL) and 1st stage culture (2 L, 3 L) of <i>Tetraselmis suecica</i>	167
Figure 3-4-9. Stock culture (250 mL, 500 mL) and 1st stage culture (2 L, 3 L) of <i>Nitzschia</i> sp.	167
Figure 3-4-10. 2nd stage expanded culture (20 L)	168
Figure 3-4-11. 2nd stage expanded culture (20 L) of <i>Platymonas subcordiformis</i> & <i>Chaetoceros</i>	

<i>mulleri</i> .....	168
Figure 3-4-12. 2nd stage expanded culture (20 L) of <i>Chaetoceros mulleri</i> & <i>Tetraselmis suecica</i> ·	169
Figure 3-4-13. 2nd stage expanded culture (20 L) of <i>Isochrysis galbana</i> .....	169
Figure 3-4-14. 3rd stage mass culture (6 m <sup>3</sup> ) of <i>Chaetoceros mulleria</i> .....	170
Figure 3-4-15. 3rd stage mass culture (6 m <sup>3</sup> ) of <i>Isochrysis galbana</i> .....	170
Figure 3-4-16. 3rd stage mass culture (6 m <sup>3</sup> ) of <i>Platymonas subcordiformis</i> .....	171
Figure 3-4-17. 3rd stage mass culture (6 m <sup>3</sup> ) of <i>Tetraselmis suecica</i> .....	171
Figure 3-4-18. <i>Nitzschia</i> sp. (upper-left) <i>Platymonas subcordiformis</i> (upper-right) <i>Chaetoceros mulleri</i> (lower-left) <i>Isochrysis galbana</i> (lower-right), food organisms for shellfish .....	172
Figure 3-4-19. 1st stage stock culture, 2nd stage small scale culture and 30L intermediate culture	173
Figure 3-4-20. 3rd stage 60 L expanded culture of food organism .....	173
Figure 3-4-21. 4th stage mass culture of food organism .....	174
Figure 3-4-22. The physiological activity of <i>Platymonas subcordiformis</i> in different media .....	175
Figure 3-4-23. The physiological activity of <i>Isochrysis galbana</i> in different media .....	176
Figure 3-4-24. The physiological activity of <i>Chaetoceros mulleri</i> in different media .....	176
Figure 3-4-25. Cell density of different phytoplankton species in Media 1 .....	177
Figure 3-4-26. Cell density of different phytoplankton species in Media 2 .....	177
Figure 3-4-27. Cell density of different phytoplankton species in Media 3 .....	178
Figure 3-4-28. Cell density of different phytoplankton species in Media 4 .....	178
Figure 3-4-29. Variations in <i>Platymonas subcordiformis</i> cell density with salinity .....	182
Figure 3-4-30. Variations in <i>Isochrysis galbanas</i> cell density with salinity .....	183
Figure 3-4-31. Variations in <i>Chaetoceros mulleri</i> cell density with salinity .....	183
Figure 3-4-32. Hollow fiber membrane filter .....	184
Figure 3-4-33. Pre-treatment system for concentrating food organism under the natural environments .....	185
Figure 3-4-34. Concentration system for food organism .....	186
Figure 3-5-1. Spat collection area (Tidal flat in Hongsung County, Choognam Province, Korea) and sampling activity. Map of Hongsung area (A), Tidal flat where spats of Manila clams collected (B), spat collection (C), collected spats (D, E, F) .....	190
Figure 3-5-2. View of spat grow out place. Location map (A), satellite view (B), sowing culture site and hanging culture site (C), sowing culture site (D), hanging culture site (E). .....	191
Figure 3-5-3. Installation of sowing culture cage. Buried spats (A), protection net from wave loss and scavengers (B), installation of sowing culture cage in progress (C; 7 <sup>th</sup> of July), completed installation of sowing culture cage (D).View of spat grow out place. Location map (A), satellite view (B), sowing culture site and hanging culture site (C), sowing culture site (D), hanging culture site (E) .....	193
Figure 3-5-4. Inner and outer cages for hanging culture. Design of inner and outer culture cage (A), design of inner culture cage (B), bundle of nylon threads filled in the inner cage to prevent	

shaking of spats during culture (C), completed inner cage (D), hang culture cage assembled with inner and outer cages (E), Installation of hang culture cage (F) .....	194
Figure 3-5-5. Comparison of shell growth between hang culture and sowing culture clams. Shell length (A), shell height (B), shell width (C) .....	196
Figure 3-5-6. Comparison of wet weight growth of hang culture and sowing culture clams. Shell weight (A), wet weight (B), total weight (C) .....	197
Figure 3-5-7. Comparison of condition index between hanging culture and sowing culture clams. (A; wet weight/shell weight, B; wet weight x 1,000/shell length x shell height x shell width) .....	199
Figure 3-5-8. Result of hanging culture. Inner cage filled with nylon threads (A), spats grown by sowing culture (B), spats in inner cage of hanging culture (C), comparison of shell growth between hanging culture and sowing culture (D), growth of hanging culture and sowing culture clams during experimental period (E) .....	200
Figure 3-5-9. Various fouling organisms on the outer cage of hanging culture .....	202
Figure 3-5-10. Mussels attached on the outer side of the inner cage of hanging culture .....	203
Figure 3-5-11. Cumulative mortality and <i>P. olsenii</i> infection rate of Manila clams raised by hanging culture and sowing culture. Mortality (A), <i>P. olsenii</i> infection rate (B), infection intensity of <i>P. olsenii</i> (C; Cells/clam, D; Cells/g) .....	206
Figure 3-5-12. Comparison of reproductive cycle of manila clam cultivated by hanging culture and sowing culture .....	208
Figure 3-5-13. Development of female gonad (A; Early active, B; Late active, C; Ripe, D; Partially spawned, E; Spent/Inactive) .....	209
Figure 3-5-14. Development of male gonad (A; Early active, B; Late active, C; Ripe, D; Partially spawned, E; Spent/Inactive) .....	210
Figure 3-5-15. Changes in water temperature, salinity and phytoplankton. Water temperature and salinity (A), phytoplankton FSU (B) .....	211
Figure 6-1-1. Map showing the location of Pacific aquaculture & coastal resources center on Hilo, Hawaii .....	221
Figure 6-1-2. The view of shellfish farm located on PACRC .....	222
Figure 6-1-3. The diagram showing the inner structure of green house .....	222
Figure 6-1-4. Three tones of culture tank inside the green house .....	223
Figure 6-1-5. The view of larvae culture tank .....	223
Figure 6-1-6. Spawning induction tank .....	224
Figure 6-1-7. The view of culturing and storage systems of phytoplankton .....	224
Figure 6-1-8. The view of filtering system of sea water for phytoplankton culture .....	225



## List of Tables

Table 1-1-1. Optimal inhabitation of Manila clam.....	57
Table 3-1-1. Comparison of sample dimensions and immune parameters of <i>R. philippinarum</i> for Samples A and B.....	78
Table 3-1-2. Correlation coefficients among sample dimensions and immune parameters for Sample A and B .....	81
Table 3-1-3. The lowest marine bivalve immune values in various experiments.....	82
Table 3-1-4. Dimensions of the Manila clams used in comparison of immune parameters and challenge test .....	91
Table 3-1-5. Summary of <i>Ruditapes philippinarum</i> hemocyte cDNA library.....	97
Table 3-1-6. Screening results of <i>Ruditapes philippinarum</i> EST clones containing repeat motifs using microstallite searching softwares .....	98
Table 3-1-7. Primer list, repeat motif and PCR amplification of EST clones used in microsatellite amplification .....	99
Table 3-1-8. Summary of polymorphic microsatellite loci in Manila clam <i>Ruditapes philippinarum</i>	99
Table 3-1-9. Characterization of 5 microsatellite markers analyzed in Korean and foreign Manila clam populations.....	102
Table 3-1-10. Primer list and annealing temperature used in PCR reaction.....	105
Table 3-1-11. Morphometric comparisons of <i>Ruditapes philippinaruma</i> and <i>Ruditapes variegatus</i> sampled in Jeju Island. (SS: Sungsan, SG: Seogwi, OD: Oeido, GN: Geumneung)....	106
Table 3-1-12. Nucleotide length and sequence similarity of 18S rDNA determined in <i>Ruditapes philippinarum</i> and <i>Ruditapes variegatus</i> (SS: Sungsan, SG: Seogwi, OD: Oeido, GN: Geumneung).....	108
Table 3-1-13. Nucleotide length of H3 gene determined in <i>Ruditapes philippinarum</i> and <i>Ruditapes variegatus</i> (SS: Sungsan, SG: Seogwi, OD: Oeido, GN: Geumneung) .....	108
Table 3-1-14. Nucleotide length and sequence similarity of COI determined in <i>Ruditapes philippinarum</i> and <i>Ruditapes variegatus</i> (SS: Sungsan, SG: Seogwi, OD: Oeido, GN: Geumneung).....	109
Table 3-1-15. Nucleotide length and sequence similarity of ITS determined in <i>Ruditapes philippinarum</i> and <i>Ruditapes variegatus</i> (SS: Sungsan, SG: Seogwi, OD: Oeido, GN: Geumneung).....	109
Table 3-2-1. Variations of size and total tissue wet weight of clams during the experimental period .....	120
Table 3-4-1. 1st, 2nd stage of phytoplankton culture & culture media for maintaining phytoplankton stock.....	180

Table 3-4-2. Manufacturing recipe of culture media for the mass culture of phytoplankton in water tanks.....	181
Table 3-5-1. Changes in shell and tissue wet weight growth of hanging culture and sowing culture spats.....	198
Table 3-5-2. Comparison of the number of mussels ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) attached on the inner and outer cages.....	204
Table 3-5-3. Comparison of the number of ascidians ( <i>Styela plicata</i> ) attached on the inner and outer cages.....	204
Table 3-5-4. Comparison of cumulative mortality between hanging culture and sowing culture spats .....	207
Table 3-5-5. Comparison of <i>P. olseni</i> infection between hanging culture and sowing culture spats .....	207

# 목 차

요약문 .....	3
그림 목차 .....	29
표 목차 .....	35
목 차 .....	45
<b>제 1장 연구개발과제의 개요</b> .....	<b>53</b>
<b>1절 연구개발의 개요 및 목적</b> .....	<b>53</b>
1-1. 연구개발 개요 .....	53
1-2. 연구개발 최종 목표 .....	53
<b>2절 연구개발의 필요성</b> .....	<b>53</b>
2-1 연구개발 과학기술 및 사회경제적 중요성 .....	53
가. 기술적 측면 .....	54
나. 경제·산업적 측면 .....	56
<b>제 2장 국내외 기술 개발 동향</b> .....	<b>59</b>
2-1절 국내기술 개발 동향 .....	59
2-2절 국외 기술 개발 동향 .....	59
<b>제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과</b> .....	<b>61</b>
<b>3-1절 바지락우량 모패 집단 발굴을 위한 연구</b> .....	<b>61</b>
1. 2009-2011 우리나라 동·서·남해안 및 제주도 바지락 개체군의 번식생태 연구 및 바지락 포자충 ( <i>Perkinsus olseni</i> ) 감염도 측정 .....	61
가. 연구목적 .....	61
나. 재료 및 실험방법 .....	62
다. 연구결과 .....	65
2. 전국 바지락의 질병감염 및 면역력에 관한 연구 .....	73
2-1 우량 모패 확보를 위한 건강도 측정 기술 개발 및 바닥식 양성 바지락의 성장 및 질병 감염연구 .....	73
가. 건강도 측정 기술 개발 .....	73
나. 바닥식 양성 바지락의 연령별 성장, 질병 감염 및 폐사연구 .....	81
2-2 바지락 모패 및 치패의 건강관리 기술개발 .....	85
가. 지역별 바지락 개체군의 질병 감염에 대한 생리적 반응 비교 .....	85
3. 건강한 바지락 모패 확보를 위한 바지락의 유전학적 특성 분석 .....	93
3-1 바지락 집단 구별을 위한 microsatellite marker 개발 .....	93
가. 연구목적 .....	93
나. 실험방법 .....	93
다. 연구 결과 .....	95



3-2. Microsatellite marker를 이용한 우리나라 바지락과 외국 바지락 집단과의 유전학적 특성 규명 ...	99
가. 연구목적 .....	99
나. 실험방법 .....	99
다. 연구결과 .....	100
3-3 바지락과 아기바지락의 형태 및 유전학적 특성 비교 .....	102
가. 연구목적 .....	102
나. 실험 방법 .....	102
다. 연구 결과 .....	103
<b>3-2절 바지락 종묘의 안정적 공급에 관한 연구</b> .....	113
1. 바지락 순치를 통한 조기 성 성숙에 관한 연구 .....	113
가. 연구목적 .....	113
나. 실험방법 .....	113
다. 연구결과 .....	116
2. 바지락 인공산란 유도 및 유생관찰 .....	123
가. 실험 방법 및 시료 채집 .....	123
나. 연구결과 .....	129
<b>3-3절 바지락 치패 인공종묘 생산</b> .....	137
1. 바지락 치패 종묘 생산 시스템에 관한 연구 .....	137
가. 바지락 모패 구입 .....	137
나. 모패 관리 .....	139
다. 먹이생물 배양 및 공급방법 .....	140
라. 바지락 산란 및 수정 .....	144
마. 유생관리 .....	146
바. 초기 치패관리 .....	148
2. 인공종묘 대량 생산 채묘기술 .....	152
<b>3-4절 먹이생물 대량 배양</b> .....	154
1. 바지락 먹이생물의 특성 .....	154
2. 먹이생물 대량 배양기술 .....	157
가. 먹이생물 생산과정 .....	157
3. 먹이생물 배지 개량 및 먹이생물 대량 배양 연구 .....	167
가. 식물플랑크톤 배지 조성에 따른 성장 .....	167
나. 먹이생물 생산비 절감을 위한 양식현장에서 먹이생물 생산방법 .....	171
다. 염분변화에 따른 먹이생물 변화 .....	175
4. 먹이생물 농축시스템 기술에 관한 연구 .....	177
<b>3-5절 바지락 중간 육성방법에 관한 연구</b> .....	181
1. 바지락 치패의 바닥식과 수하식 육성 방법 비교 .....	181
가. 이론적, 실험적 접근 방법 .....	181
나. 연구내용 .....	181
다. 연구결과 및 고찰 .....	187
<b>3-6절 인공 종묘생산의 산업화 적용 및 경제성 분석</b> .....	205
1. 먹이생물 생산비 저감을 위한 방안 .....	205

2. 기질에 따른 효율적인 채묘방법 개발 .....	205
<b>제 4장 목표달성도 및 관련 분야 기여도 .....</b>	<b>207</b>
1절 1차년도 .....	207
2절 2차년도 .....	208
3절 3차년도 .....	209
<b>제 5장 연구개발 성과 및 성과활용계획 .....</b>	<b>211</b>
1절 우량 모패 확보 기술 및 바지락 성 성숙 유도 기술 .....	211
2절 건강한 바지락 모패 선정을 위한 분자 marker 기술 .....	211
3절 먹이생물 대량 배양 및 인공종묘 생산 기술 .....	212
<b>제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술 정보 .....</b>	<b>213</b>
1절 미국 하와이 Pacific aquaculture & coastal resources center (PACRC) 방문 .....	213
<b>제 7장 참고 문헌 .....</b>	<b>219</b>
<b>제 8장 성과물 .....</b>	<b>227</b>



# Content

Summary .....	15
List of figures .....	37
List of table .....	43
Content .....	49
<b>Chapter 1. Outline of the study</b> .....	53
<b>Section 1. Aim and scope of the study</b> .....	53
1-1. Aim and scope of the study .....	53
1-2. Final goal of the research .....	53
<b>Section 2. Background</b> .....	53
2-1 Socio-economic and scientific importance of the study .....	53
a. Scientific aspect .....	54
b. Economic and industrial aspect .....	56
<b>Chapter 2. Current status of seed production technology</b> .....	59
<b>Section 2-1.</b> Background of clam seed production in Korea .....	59
<b>Section 2-2.</b> Background of clam seed production oversea .....	59
<b>Chapter 3. Results of the research</b> .....	61
<b>Section 3-1. Study on the clam populations healthy broodstock of Manila clam</b> .....	61
1. Evaluation of reproductive effort, condition index and <i>P. olsenii</i> infection intensity of Manila clam on the East, West and South coasts and Jeju Island, Korea in 2009, 2010 and 2011. ....	61
a. Objective .....	61
b. Materials and methods .....	62
c. Result .....	65
2. Immuno-capacity and resistance to infection of clams from different coastal regions .....	73
2-1 Health assessment and monitoring growth and parasite infection of clams in different age group .....	73
a. Evaluation of health level of clams to secure healthy brood stock .....	81
b. Age-dependent growth <i>P. olsenii</i> infection intensity in bottom cultured clam .....	85
2-2. Physiological response of clam populations challenged by <i>P. olsenii</i> .....	85
3. Genetic characterization of Manila clam in Korean waters .....	93
3-1 Development of microsatellite maker to differentiate Manila clam populations .....	93
a. Objective .....	93
b. Materials and methods .....	93
c. Result .....	95
3-2. Genetic characterization of Manila clam populations between Korea and foreign country using microsatellite marker .....	99

a. Objective .....	99
b. Materials and methods .....	99
c. Result .....	100
3-3 Comparison of genetic characteristics of Manila clam ( <i>R. philippinarum</i> ) and variegated carpet shell ( <i>R. variegatus</i> ) .....	102
a. Objective .....	102
b. Materials and methods .....	102
c. Result .....	103
<b>Section 3-2. Study on Manila clam seed production in hatchery</b> .....	113
1. Study on conditioning of Manila clam in an indoor recirculation system .....	113
a. Objective .....	113
b. Materials and methods .....	113
c. Result .....	116
2. Spawning induction and larval development in the Manila clam .....	123
a. Materials and methods .....	123
b. Result .....	129
<b>Section 3-3. Mass production of <i>R. philippinarum</i> seed in hatchery</b> .....	137
1. Seed production system for Manila clam spat .....	137
a. Purchase of broodstock .....	137
b. Broodstock conditioning .....	139
c. Supply method and cultured algae .....	140
d. Spawning and fertilization of Manila clam .....	144
e. Controlling of larvae .....	146
f. Controlling of early post-set .....	148
2. Seed collecting technique for mass production .....	152
<b>Section 3-4. Mass culture techniques for the food organism of Manila clam</b> .....	154
1. Characteristic of food organism .....	154
2. Mass culture techniques of micro-algae as food for clam spats .....	157
a. Production process of phytoplankton culture .....	157
3. Improvements of culture media and mass culture of food organism .....	167
a. Phytoplankton growth consequential media composition .....	167
b. Development of low cost culture media for hatchery .....	171
c. phytoplankton exchange from different of salinity .....	175
4. Concentration system for the food organism .....	177
<b>Section 3-5. Study on the intermediate culture of juvenile clams using a suspended culture system</b> .....	181
1. Growth of juvenile clam in bottom culture and suspended culture .....	181
a. Introduction .....	181
b. Materials and methods .....	181

c. Result and discussion .....	187
<b>Section 3-6. Analysis of economic value of the seed production technique and industrial application</b> .....	205
1. Plans to reduce the production cost of food organisms .....	205
2. Development of efficient seed collecting methods with substrate .....	205
<b>Chapter 4. Output from this study</b> .....	207
<b>Section 1. First year</b> .....	207
<b>Section 2. Second year</b> .....	208
<b>Section 3. Third year</b> .....	209
<b>Chapter 5. Results of current research and future plan for the application</b> .....	211
<b>Section 1. Study on selecting broodstock clams and conditioning in indoor system</b> .....	211
<b>Section 2. Development of molecular marker for selecting healthy broodstock</b> .....	211
<b>Section 3. Study on the high quality broodstock population</b> .....	212
<b>Chapter 6. Research activity during the study</b> .....	213
<b>Section 1. Visit the Pacific aquaculture &amp; coastal resources center</b> .....	213
<b>Chapter 7. Reference</b> .....	219
<b>Chapter 8. Output</b> .....	227



# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

## 1절. 연구개발의 개요 및 목적

### 1-1. 연구개발의 개요

대규모 연안개발과 이로 인한 바지락 서식 환경악화로 인하여 자연채묘를 통한 바지락 종패 생산이 점점 감소하고 있으며, 이로 인하여 바지락양식을 위한 종묘 생산 및 공급이 심각한 상황에 처해 있다. 이러한 상황을 반영하듯 최근에는 중국에서 인공종묘 생산을 통하여 생산된 바지락 종패가 식용으로 수입된 후에 불법적으로 바지락양식장에 살포하는 등의 문제가 제기되고 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해 유전적으로 건강한 바지락 모패를 선별하는 기술을 개발하며, 우량 모패를 이용하여 바지락 종묘를 인공적으로 대량 생산할 수 있는 시스템을 개발한다. 이를 통하여 향후 바지락 양식 산업에 안정적인 우량 종묘를 공급함을 목표로 한다.

### 1-2. 연구개발의 최종 목표

#### 최종목표

#### ◎ 바지락 양식 산업의 지속적인 발전을 위해 건강한 종묘의 안정적 공급 방법 확보

- 지역 환경특성에 잘 적응된 건강한 어미 확보 및 성숙관리
- 치패 생산을 위한 먹이생물 대량 배양 기술 및 농축 시스템 개발
- 인공으로 대량 발생시킨 유생의 효율적인 채묘방법 개발
- 육상수조 또는 축제식 양식장을 활용한 바지락 치패의 대량생산 (중간육성 포함)
- 우리나라 연안 바지락 개체군의 유전학적 특성 규명
- 바지락 치패 종묘 대량 생산에 관한 지침서 제작

## 2절. 연구개발의 필요성

### 2-1. 연구개발의 과학기술 및 사회경제적 중요성

바지락 (Manila clam, Little neck clam, Japanese carpet shell clam; *Ruditapes philippinarum*, *Tapes philippinarum*, *Venerupes philippinarm*)은 우리나라 전 연안에 서식하며, 환경에 잘 적응하므로 굴과 더불어 산업적 가치가 매우 높은 이매패류이다. 우리나라에서는 1912년 경기도 연안에서 처음으로 양식이 시작되었고 (유, 2000), 본격적으로는 1980년부터 추정된다. 바지락의 연간생산량은 1990년에 약 7만톤으로 최고를 기록한 이후 최근에는 34만톤 정도를 생산하고 있다.

1980년대에 국내에서 생산된 대부분의 바지락은 일본에 수출하여 외화획득에 기여하였



고, 1990년대에는 국내 소비로 충당되었으나, 2000년대에는 오히려 외국에서 3만톤 정도를 수입하고 있다. 2000년대에 들어서면서 바지락과 관련된 음식들이 많이 개발되면서 시장규모는 2,000억 이상으로 성장하였고 바지락의 수요는 앞으로도 현 상태를 유지하거나 늘어날 것으로 전망되고 있다.

그러나 최근 연안역 개발과 매립으로 주요 바지락 치패서식장의 면적이 크게 감소되었고 그 생산량도 감소하게 되었다. 이러한 결과, 바지락 치패는 품귀현상을 빚게 되었고, 어업인들은 중국으로부터 불법적으로 종패를 식용으로 둔갑시켜 수입한 후 양식장에 살포하는 등의 문제가 발생하기도 하였다. 따라서 우리나라의 서남해에 분포하는 수많은 바지락양식장이 원활하게 유지되기 위해서는, 무엇보다도 안정적인 바지락치패의 공급이 우선되어야 한다. 그런데 상기에서 언급한 바와 같이 치패의 자연발생장이 감소하고 생산량이 감소하여, 더 이상 자연에 의존하기에는 한계가 있는 것으로 판단되고 있다. 따라서 바지락 치패를 인공적으로 대량 생산하는 기술을 시급히 완성하여 어업인들에게 치패를 안정적으로 공급하여야만, 어업인들의 애로사항 해결뿐 아니라 소득도 증대시킬 수 있다.

## 가. 기술적 측면

### (1) 바지락 치패 발생지 정밀연구와 응용

자연에서 바지락 치패가 형성되는 이상적인 서식환경은 표 1-1-1과 같이 요약된다. 특히 이 중에서도 바지락 치패가 형성되기 위해서는 담수의 유입과 와류가 있는 해역에 니질과 조립질 퇴적물이 존재하여야 한다 (Ueda and Yamasita, 1997; Yamamoto, 1997; Hiroko et al., 1999). 또한 지역별로 바지락의 건강도는 큰 차이가 있으므로, 유전적 또는 질병 등의 분석을 통해 건강한 모패를 선택하고 이 지역의 번식산란 특성 (Park and Choi, 2004) 생태 (de Montaudouin, 1997), 생리 (Kim et al., 1999), 양식환경 (Ali and Nakamura, 1999; Gouletquer et al., 1999), 먹이생물 (Defossez and Hawkins, 1997; Kim and Hur, 1998), 산소 소비량 (Kim et al., 1996), 용존산소 변화에 따른 생리적 반응 (신 외, 2001), 질병 (박 외, 1999; Park and Choi, 2001; Ngo and Choi, 2004; 박 외, 2005, Park et al., 2006) 등과 같은 다양한 연구결과를 적용하여 인공치패를 생산하여야 한다.

표 1-1-1. 이상적인 바지락의 서식환경 (Ueda and Yamasita, 1997; Yamamoto, 1997)

항목	바지락 서식환경	항목	바지락 서식환경
유황	난류역의 착저가 용이한 곳	저질	평균 2φ(fine sand)가 최적
유속	치패는 35 cm/sec 이내	부유 물질	0.5% 이내 (0.5~2% 범위)
수온	23℃ 최적 (-2~35℃)	전 (total) 황화물	0.2 mL/g 이하가 최적
염분	25‰	지반 조성	0~+1 m (평균해수면 기준)
용존 산소	1.4ppm 이상 (최저값: 0.7 ppm)	퇴적물	10 cm 이내

### (2) 인공종묘 대량생산을 위한 배지개량 및 먹이생물 농축

바지락 인공종묘 대량생산을 위해서는 반드시 충분한 먹이 생물이 확보되어야 한다. 바지락 치패의 먹이생물은 *Isochrysis galbana*와 *Chaetoceros simplex* 등 일반적인 패류 종묘 생산에 사용되는 규조류가 적당한 것으로 판단되지만, 실제로 어떠한 먹이를 얼마만큼 단계별로 투입하는 것이 좋은지는 국내의 경우 아직 밝혀지지 않고 있다. 즉 바지락치패의 먹이생물 선호도를 파악하여 단계별로 공급해주는 방안이 필요하다. 특히 치패는 여수율이 매우 높기 때문에 많은 양의 먹이생물이 필요하다. 즉, 충분한 먹이생물의 배양과 함께 유사시를 대비한 먹이생물 농축이 필요하다. 따라서 자체적으로 대량의 먹이생물배양 시스템과 동시에 농축 시스템 개발도 병행되어야만 경제적으로 대량의 바지락 인공종묘를 생산할 수 있다.

### (3) 배설물처리 (수질관리)와 천적생물 대비

바지락 인공종묘는 제한된 수조에서 생산되므로 치패가 배출한 배설물은 수질을 오염시키고 원생동물이나 기타 기생충의 발생을 용이하게 한다. 이 결과, 치패의 성장을 방해하고 생존율을 크게 낮출 수 있다. 따라서 주기적으로 배설물을 처리하여 깨끗한 수질을 유지토록 하여야 한다. 또한 사육수에 원생동물이나 천적생물의 발현을 바지락 치패의 대량생산의 성공 여부에 크게 관여하므로 처음부터 유입되지 않도록 하여야만 한다.

### (4) 우리나라 연안 바지락 개체군의 유전적 특성 규명

바지락은 황해 특산으로 베트남 북부에서 오츠크해까지 널리 분포하는 이매패류로, 1935년 미국에 이식되었고, 1972년 프랑스로 양식목적으로 이식되었다. 현재 바지락은 유럽 전역과 아시아 및 북미 연안에 널리 분포한다. 아시아의 경우 바지락은 중국, 북한, 일본 및 한국에서 생산되며, 국가 간에 교역이 활발히 이루어지고 있다. 이러한 수출입을 통한 바지락의 국가 간 이동은 번식을 통하여 바지락 개체군의 유전적 특성을 변형시키고 있으며, 일본의 경우 이미 일본전역에 서식하는 바지락 개체군의 유전적 특성 분석을 통하여 수입산

바지락의 분포를 보고한 바 있다.

우리나라의 경우 바지락 개체군의 유전적 특성에 관한 연구는 지역적으로 수행되고 있으나 전국의 바지락을 대상으로는 수행되지 않았다. 따라서 이 연구에서는 우리나라 전역에 분포하는 바지락 개체군의 유전적 특성을 DNA 마커를 이용하여 분석하고자 한다. 이를 위하여 바지락 핵 DNA의 microsatellite 부분과 COI 부분을 비교한다. 핵 DNA 중 microsatellite는 짧은 염기가 여러 번 반복되는 구조를 가진 염기서열로써 매우 높은 유전적 다형성 (polymorphism)을 갖고 있고 대립유전자의 차이를 분석할 수 있어서 특정한 유전 집단의 유전적 다양성을 연구하는데 매우 유용하게 사용되는 방법이다. 또한 분석이 용이하고 공우성 (codominance)을 갖기 때문에 다양한 분야에서 분자마커로써 각광 받고 있다. 이러한 장점 때문에 특히 자연산이나 양식산 어류나 연체동물의 유전적 변이를 연구하는데 있어 적합한 방법이며, 이를 이용하여 유전적 다양성이 높은 우수 집단을 발굴 하거나 또한 동일종 내 다른 집단간 유전적 유연관계를 조사하는데 유용하게 이용될 수 있다 (Galindo-Sanchez et al., 2007).

## 나. 경제·산업적 측면

### (1) 시장동향 및 규모

바지락치패는 주로 충청남도 연안에서 대량 발생되며, 이것을 지역 어촌계에서 채취하여 전국의 바지락 양식업자나 어촌계에 공급하고 있다. 그러나 최근 국내 자연산 치패의 생산량 감소로 불법적으로 중국산 치패가 유입되고 있다. 이러한 상황을 반영하여 정부에서는 최근 (2007년 말~2008년 초) 중국산 바지락 종패의 이식승인을 통해 유통의 합법화 절차를 밟고 있다. 그러나 중국산 치패는 질병 감염과 운송기간의 지연에 따른 활성도의 감소로 인하여 생존율이 감소하는 등의 많은 문제점을 내포한다.

천해양식 (참바지락)으로 생산되는 바지락은 통계상 연간 1~3만 톤이며 금액으로는 200~600억 규모이다 (그림 1-1-1). 2006년의 경우 중국에서 약 15,000톤이 수입되었고, 북한에서 약 20,000톤 정도가 반입되었다. 그리고 그 이외에 비계통으로 출하되는 바지락을 고려하면 시장에서 유통되는 바지락의 총량은 약 100,000톤으로 평가된다. 도매가격 기준으로 바지락 성패시장은 약 2,000억 규모이다. 그리고 바지락 시장의 규모를 결정하고, 최하부에서 지지하는 치패시장은 약 200억 규모로 평가된다. 최근 중국수산물 가격이 우리나라의 70% 이상 수준까지 육박하고 있고, 이러한 상황이 국내에 영향을 미치게 되면 치패 시장 규모는 더욱 커질 가능성이 있다.

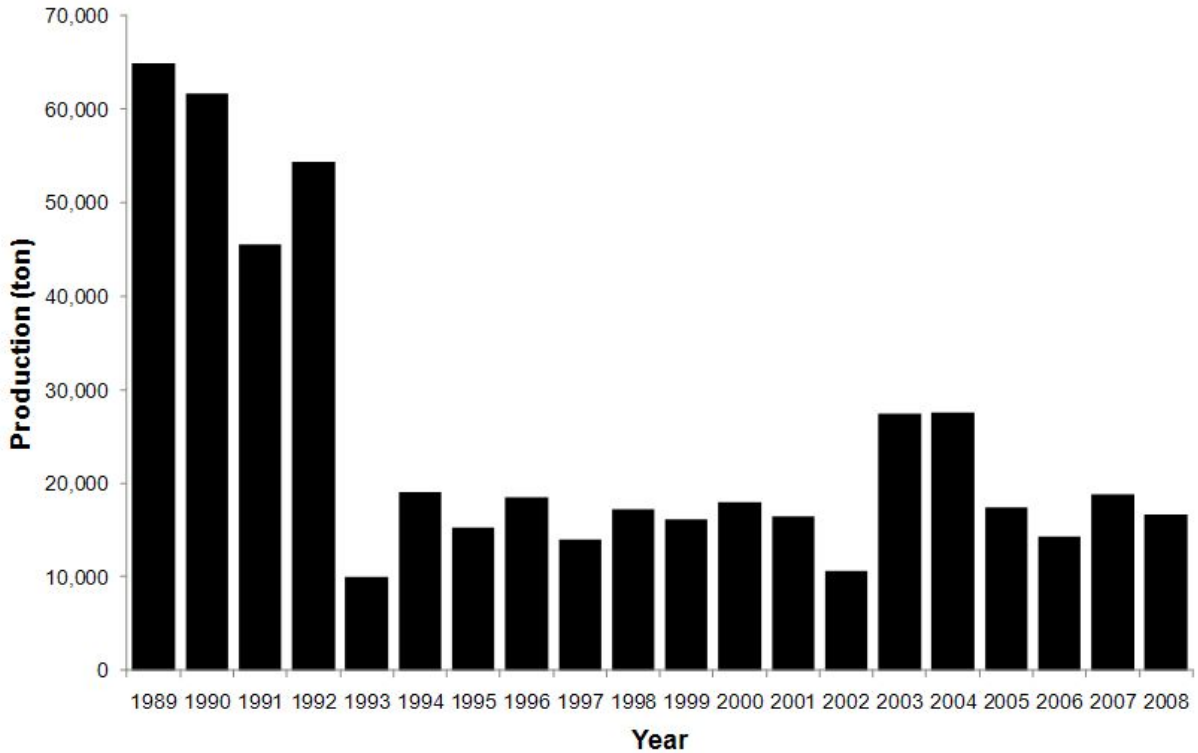


그림 1-1-1. 우리나라 바지락 천해양식 생산량과 금액 (연간 1~3만톤 정도 생산되며, 최근 급격한 감소가 뚜렷하게 나타나고 있음) 자료출처: FAO

## (2) 수출·입 효과

2006년 중국에서 수입된 바지락은 약 15,000톤 이고, 북한에서도 약 20,000톤이 반입되었다. 바지락 치패는 질병 감염 등의 문제로 그 동안 수입이 허가되지 않았지만, 2007년도 국내 생산량이 크게 감소하였기 때문에 치패이식은 절박한 상황이다. 결과적으로 정부에서는 2008년 초 약 5,000톤의 치패를 이식 승인 해주었다.

2007년도 국내에서 생산된 모든 치패를 전국의 바지락양식장에 전량 공급하였는데도 상당량이 부족하였다. 구체적으로는 고평만에서 4,000톤, 그 외 다른 지역에서 2,000톤 도합 6,000톤의 치패가 부족한 것으로 추정되고 있다. 현재 바지락치패의 시세는 1 kg에 약 1,000원에 거래되고 있으므로, 수입이 허가될 경우 매년 60억 원의 외화유출이 예상된다. 한편 중국수산물의 가격이 국내 가격의 70~80% 수준까지 육박하고 있으므로, 실제 바지락 치패의 대량생산 기술의 정립은 조만간 연간 수백 억 원의 수입대체 효과가 있을 것으로 추정하고 있다.

## 다. 사회·문화적 측면 (공공성 포함)

WTO 및 자유무역협정 (FTA)체제로 어업여건 악화와 연안어장의 대규모 간척매립으로 수산생물의 산란장 및 서식장이 파괴되고, 양식어장의 기능은 급속히 상실되어 가고 있다. 갯벌은 아시아에서 우리나라와 중국만이 가지고 있는 경쟁력 있는 천연자원으로, 바지락과

같은 패류를 갯벌에서 계획적으로 대량 생산한다면 피해해가는 어촌경제를 크게 활성화시킬 수 있다고 본 연구팀은 확신하고 있다. 이러한 패류양식을 활성화하기 위해서는 기본적으로 대량의 치패생산 기술이 확립되어야 한다. 즉 바지락 치패생산은 어업인들에게 실질적으로 소득을 증대시킬 수 있는 시급한 현안 중의 하나이며, 패류 양식업을 하는 어민들뿐만 아니라 국가적으로도 커다란 경제이익을 창출할 것으로 판단된다.

## 제 2 장. 국내외 기술개발 현황

### 2-1절. 국내기술 개발동향

현재까지 국내에서 바지락치패를 인공적으로 대량생산한 연구사례는 없다. 2002년 태안 파도리의 치패 자연발생지에 왕모래를 인위적으로 깔아 치패발생량을 증가시킨 사례는 있으나, 이 방법은 주변 환경 변화에 따라 생산량이 크게 변동하는 단점이 있다. 2004년 남해패류센터에서는 수조에서 인공적으로 바지락치패를 생산하여 105일 동안 3~4 mm까지 양성시킨 사례가 있다.

(주)해양비전21은 2000년부터 2007년까지 우리나라의 주요 치패발생지 및 모패 서식장의 특성을 조사한 후, 해남군 황산면의 축제식양식장에서 총 5회의 산란실험을 시도한 바 있다.

### 2-2절. 국외기술 개발동향

중국에서는 이미 바지락 치패를 인공적으로 대량생산하여 상용화 단계에 있다. 북방지역 (대련 이북)과 남방지역 (북건성 주변지역)에서 주로 생산하고 있는데, 자연환경의 차이로 생산하는 방식은 크게 차이가 있다. 대련지역에서는 육상수조에서 산란시켜 600 μm 크기까지 관리한 다음에 중간 육성장으로 이동시켜 생산하고 있고, 북건성 지역에서는 축제식양식장에서 산란시켜 바지락 치패를 생산하고 있다. 우리나라의 경우는 북건성 방식을 취할 경우 1년 중 제한된 기간만 시도할 수 있고, 기술적으로도 큰 어려움이 있는 것으로 판단된다. 따라서 국내에서는 대련에서 취하고 있는 방법을 적용하여 치패를 대량생산하는 것이 합리적이다.

바지락은 1970년대 후반 미국 서부연안에서 프랑스로 처음 이식되어 양식된 이래 아프리카 북부의 모로코, 튀니지 연안, 그리스 연안, 이탈리아, 스페인, 프랑스 및 영국과 아일랜드 지역에서도 양식되고 있다. 바지락 종묘생산을 대규모로 하고 있는 국가는 현재 이탈리아이며, 이는 베니스 기수역에 속하는 파도바 지역에서 인공종묘 배양시설을 통하여 종패를 생산하고 있다. 특히 이탈리아는 바지락 인공종묘생산에 관한 표준지침서를 개발 종묘생산기술을 일반에게 보급하고 있는 실정이다. 유럽의 경우 바지락 소매가는 이탈리아의 경우 6 Euro/kg, 프랑스의 경우 10~12 Euro/kg 정도로 비교적 고가이다. 그러나 스페인, 프랑스 등과 같이 바지락의 대량 양식을 하는 지역은 아직 종묘 공급을 자연산 종패 채취에 의존하고 있으나, 점진적으로 종묘의 공급이 부족함에 따라 인공종묘생산을 시도하고 있다. 특히 프랑스의 경우 가장 큰 양식산업인 굴 양식의 경우 모든 종묘를 인공종묘생산에 의존하고 있어, 향후 바지락의 인공 종묘생산에 관한 기술력은 이미 확보된 것으로 볼 수 있다.



## 제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

### 3-1절. 바지락 우량 모패 집단 발굴을 위한 연구

1. 2009-2011년 우리나라 동·서·남해안 및 제주도 바지락 개체군의 번식 생태연구 및 바지락 포자충 (*P. olsenii*) 감염도 측정

#### 가. 연구 목적

이매패류의 건강도 또는 비만도를 측정하는 기준인 condition index (CI)는 이매패류의 건강도 또는 비만도를 측정하는 기준으로 다양한 방법에 의하여 산출되어 이매패류의 생태적 연구에 이용되고 있다. 비만도를 측정하는 방법에 있어 다양한 방법들이 연구되어 왔고 이매패류의 생태학적 연구에 널리 사용되고 있다. 참굴 및 강굴 등 대형 이매패류의 경우 패각 표면의 부착물로 인해 성장 변이가 심한 관계로 패각 내 부피에 대한 육질중량 비를 사용한다. 반면, 바지락과 담치 등 패각 성장이 일정한 이매패류의 비만도는 육질 습중량 또는 건중량과 패각 무게비로 나타내고 있다.

이매패류의 산란량을 측정하는 방법에는 조직학적 관찰, 산란 전·후의 무게 비율 그리고, 산란방법에 따른 방난 된 알을 계수하는 방법을 사용하고 있다 (Toba and Miyama, 1994; Tirado and Salas, 1998; Ceballos N et al, 2000; Zhang and Yan, 2006). 하지만, 이들 방법은 이매패류 산란 시기가 정확하지 않을 경우 정확한 정보를 제공하지 못하는 단점을 가지고 있다. 이에 항원-항체 반응을 이용한 번식량 측정 방법 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)이 개발 되었다 (Choi et al., 1993). 이 방법은 이매패류의 알 단백질에 대한 항체를 개발하여 손쉽게 이매패류의 번식량을 측정함으로써, 소량의 알 단백질에도 반응할 뿐만 아니라 시간과 비용도 절감할 수 있는 아주 유용한 방법이다. 바지락 인공종묘 시 사용 될 우량 모패 확보에 있어 지역별 바지락의 건강도 및 번식량 비교는 우량 모패를 선정하기 위한 가장 적절한 방법이라 생각된다.

원생성 기생충인 *Perkinsus* sp.는 굴, 바지락, 전복 등의 상업적으로 중요한 해산 연체동물의 대량폐사 원인 생물로 알려져 있다 (Choi et al., 1993, 1994; Dittman, 1993; Dittman et al., 2001). 우리나라에서 발견된 *Perkinsus olsenii* 역시 남해안 및 서해안에 서식하는 바지락의 대량폐사를 일으키는 원인생물로 지목되어 왔다 (Park et al., 1999; Park and Choi 2001). Park et al., (2006)은 곰소만에 서식하는 바지락의 *Perkinsus* 감염도를 측정한 결과, 감염이 심한 개체에서는 낮은 비만도와 번식량의 저하가 관찰되었다. 따라서, 연구가 시작된 2009년부터 2011년까지 매년 6~7월 전국에 서식하는 바지락을 대상으로 생태학적으로 우수한 모패를 선정하기 위해 비만도와 ELISA를 이용하여 번식량을 측정 하였고, *Perkinsus* 감염도를 파악하여 우수한 모패 조건인 비만도 및 번식량을 측정하여 지역별 번식량의 특



성을 이해하고 인공종묘에 사용할 우량 모패를 선정하는데 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

## 나. 재료 및 실험 방법

### (1) 2009~2011년 바지락 비만도 (Condition index, CI) 측정

우리나라 동·서·남해안 및 제주지역에 서식하는 바지락의 비만도를 비교하기 위해 총 24개 지역을 선정하였고, 2009년 6월, 2010년 7월, 2011년 6월에 채집을 실시하였다 (그림 3-1-1). 바지락의 비만도는 바지락 습중량과 패각 건조중량의 비로 나타내었으며, 이는 향후 국내외에서 수행된 연구로부터 얻어질 자료와 같은 방법으로 측정하여 그 값을 비교하기 위함이다.

$$CI = \text{바지락 습중량 (g)} / \text{패각 건조중량 (g)}$$

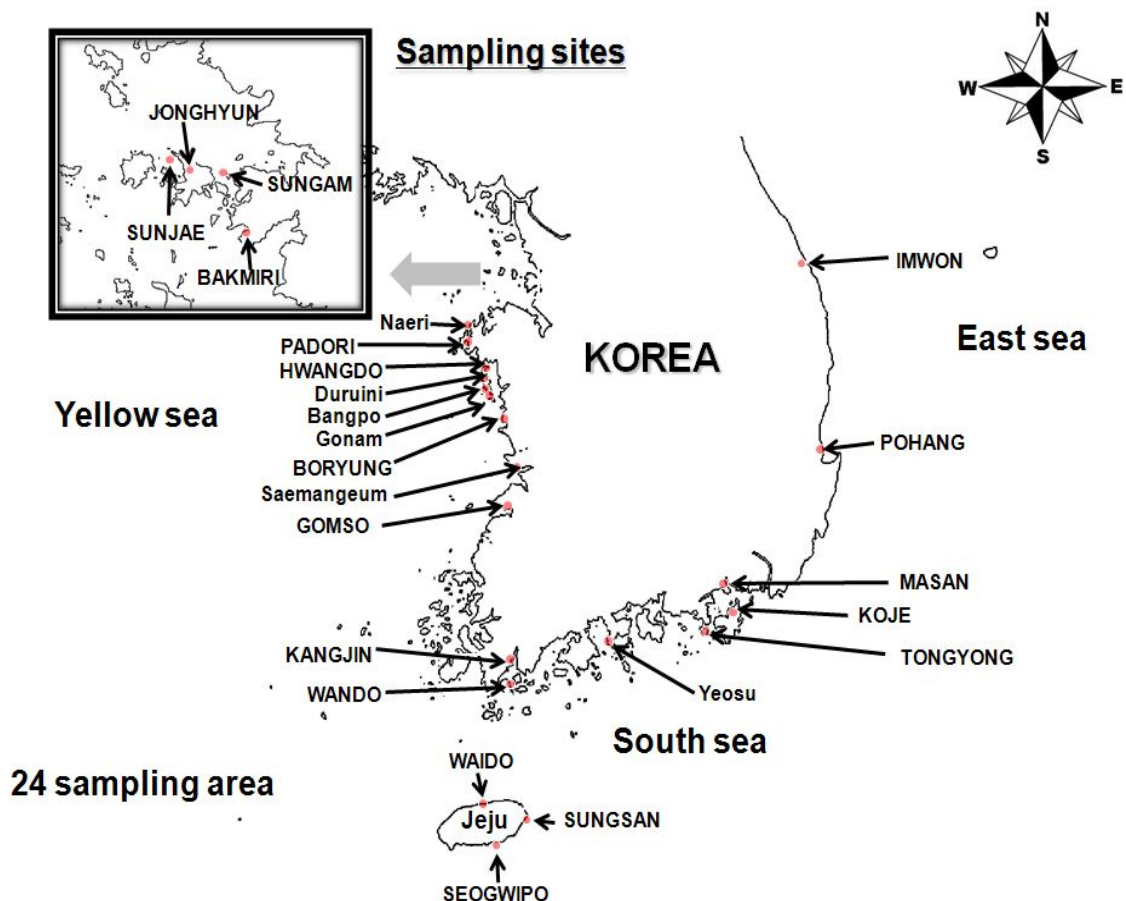


그림 3-1-1. 2009~2011년 바지락 채집지역

## (2) 조직학적 관찰을 통한 2009~2011년 전국 바지락의 생식소 발달 단계 관찰

조직학적 방법을 통한 바지락의 생식소 발달 단계를 관찰하기 위해 생식소가 포함되도록 1.5~2 mm 두께로 적출하여 Davidson's solution에 48 시간 고정하였다. 고정이 완료된 시료는 70% 알코올을 이용하여 탈수한 뒤 파라핀으로 포매하였다. 포매된 조직은 마이크로톰을 이용하여 6 µm 두께로 절단하여 Harris' Hematoxylin과 Eosin Y (Kang et al., 2004; Ngo et al., 2004)로 염색하였다. 제작된 조직 시료는 광학 현미경을 이용하여 생식소 발달 단계를 관찰하였다. 바지락 생식소 발달 단계는 (Drummond et al., 2006)의 방법에 따라 광학현미경하에서 휴지기 (Resting stage), 초기 발달기 (Early developing stage), 후기 발달기 (Late developing stage)와 완숙기 (Ripe stage)로 구분하였다 (그림 3-1-2, 그림 3-1-3).

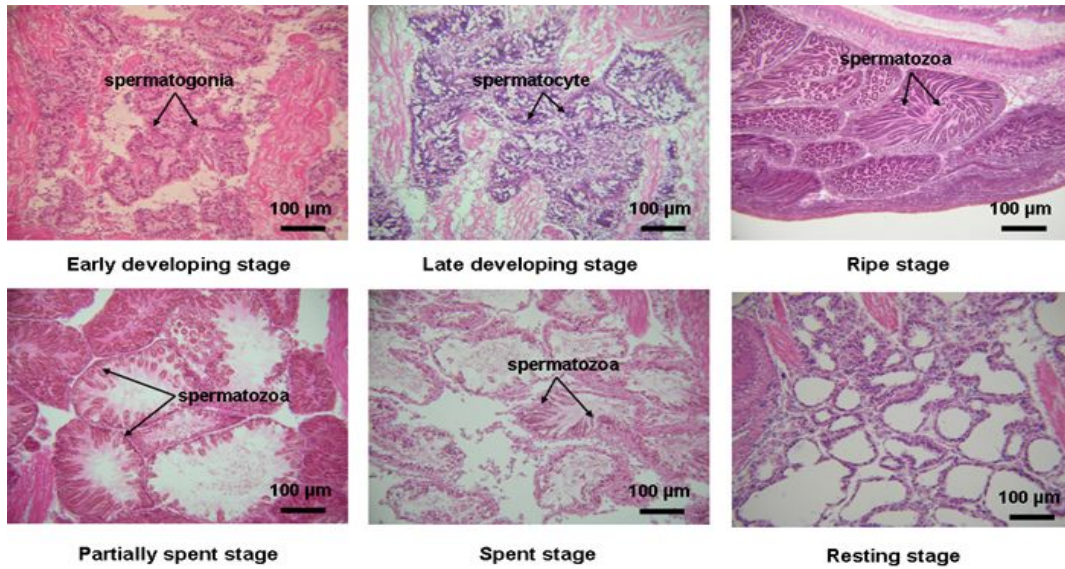


그림 3-1-2. 바지락 수컷 개체의 생식소 발달 단계

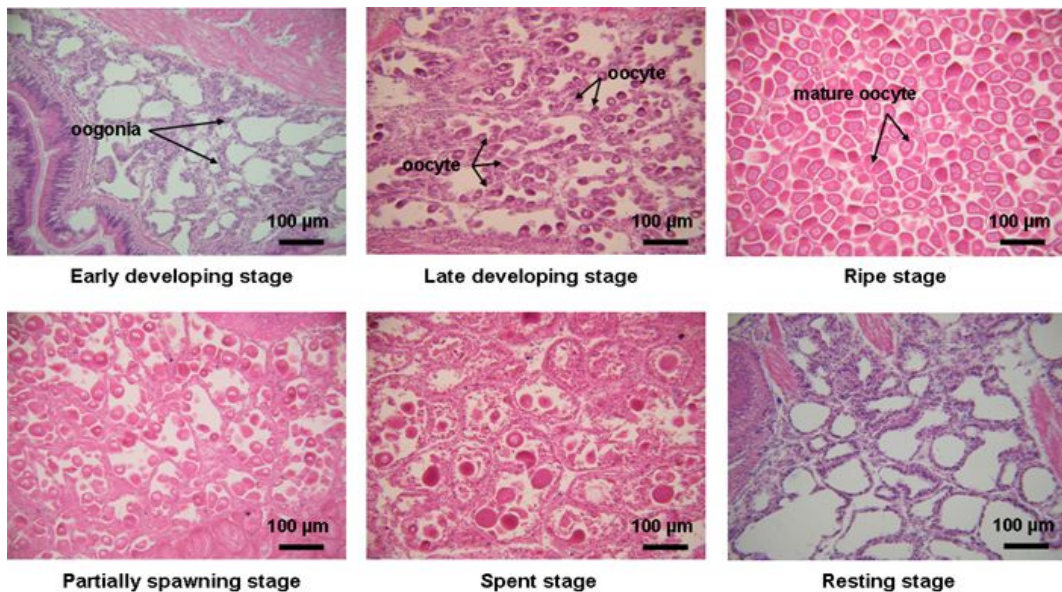


그림 3-1-3. 바지락 암컷개체의 생식소 발달 단계

### (3) 2009~2011년 동·서·남해안 및 제주연안 바지락의 번식량 측정방법

바지락의 번식량 측정을 위해 indirect-ELISA 방법을 실시하였다 (Park et al., 2004). 96well ELISA microplate에 초음파로 균질화된 100  $\mu$ L의 바지락 시료를 첨가 한 후, 상온에서 3시간 또는 4°C에서 하루 동안 반응시키고 washing 과정을 거쳐 0.1% BSA (in PBS containing 0.05% TritonX-100, pH 7.4)를 150  $\mu$ L씩 넣어 1시간동안 blocking을 하였다. 1차 항체는 Park et al. (2004)에 의해 개발된 바지락 알에 대한 항체, 2차 항체는 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG를 사용하였고, 발색 기질로는 pNPP (1 mg/mL in 0.1M glycine buffer)를 처리한 후, microplate reader를 이용하여 405 nm 파장에서 O.D. (Optical Density)를 측정하였다 (그림 3-1-4).

알 하나의 건조중량에 대한 난 단백질량의 비례식을 이용하여 ELISA에서 추정된 총 난 단백질의 양으로부터 알의 총 건조중량을 환산하였고, 생식소지수 (GSI)는 개체의 총 건조중량에 대한 알의 건조 중량 비율로 계산하였다.

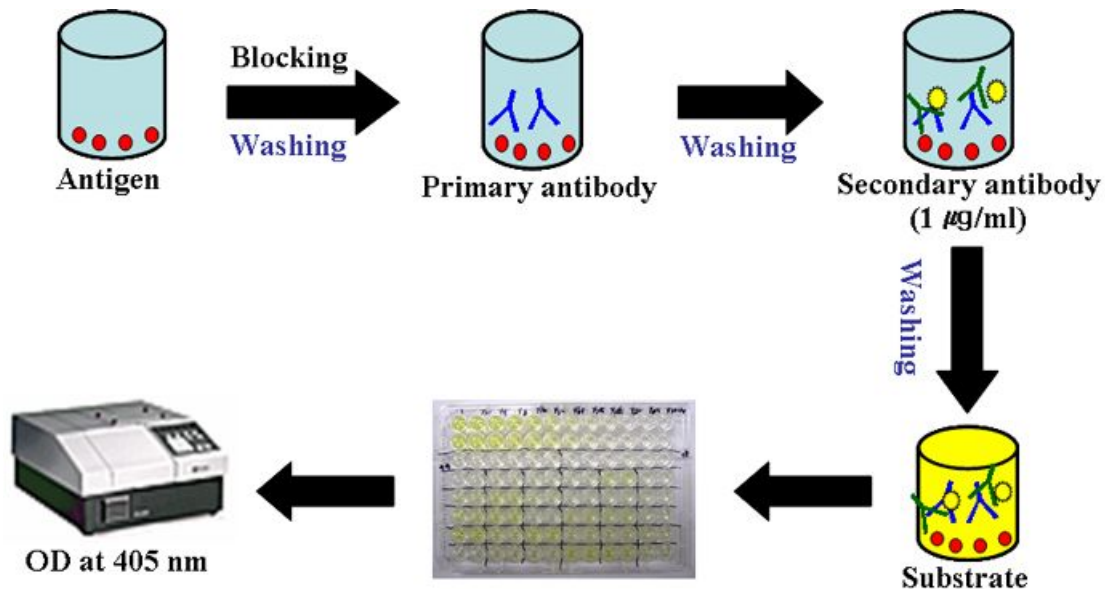


그림 3-1-4. ELISA를 이용한 바지락의 egg 단백질량 측정과정

### (4) 2009~2011년 동, 서, 남해안 및 제주도 바지락의 바지락 포자충 (*P. olseni*) 감염도 측정

바지락 포자충 (*Perkinsus* sp.)의 감염도는 Park & Choi (2001)의 방법에 따라 측정하였다. 바지락 조직 전체 또는 적출된 아가미의 습중량을 측정한 뒤, Ray's fluid thyoglycolate (RFTM) 배지가 담긴 튜브에 넣어 실온의 암실에서 1주간 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 정량적인 감염도 측정을 위하여 바지락 조직은 2M NaOH를 이용하여 바지락 포자충 이외의 조직을 분해하였고, *Perkinsus* 충만을 순수 분리하였다. 분리된 바지락 포자충은 혈구계수판을 이용하여 4회 반복 계수하였으며, 최종적으로 바지락포자충 감염도는 *Perkinsus* cells/gill

weight or tissue wet weight (g)으로 나타내었다. 바지락 조직 전체에 대한 *Perkinsus* 감염도를 나타내기 위해 Park (1999)의 공식을 이용하여 바지락 개체에 대한 감염도를 다음과 같이 환산하여 추정하였다.

$$Y (\text{바지락 } 1 \text{ g 중의 } Perkinsus \text{ 수}) = 3.37 \times (\text{아가미 } 1 \text{ g 중의 } Perkinsus \text{ 수}) - 104,612$$

#### (5) 통계 분석

통계분석은 SAS 9.1 (SAS institute, Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 각 실험기간의 평균 값과 표준편차를 구한 뒤, ANOVA와 Duncan Test로  $p < 0.05$ 의 유의차 수준에서 비교하였다.

### 다. 연구 결과

#### (1) 비만도 (Condition index)

2009년 6월, 2010년 7월, 2011년 6월 우리나라 동·서·남해안 및 제주도에서 채집된 바지락의 평균 비만도는  $0.6 \pm 0.1$ 이었다 (그림 3-1-5). 지역별 바지락 비만도 측정결과 2009년 서해안 ( $0.7 \pm 0.1$ ), 남해안 ( $0.6 \pm 0.1$ ), 동해안 및 제주도 ( $0.5 \pm 0.1$ ) 순으로 조사되었다. 서해안 지역 중에서도 충남 보령 ( $0.8 \pm 0.1$ ), 충남 방포 ( $0.8 \pm 0.1$ ), 충남 드르니 ( $0.8 \pm 0.1$ ), 충남 황도 ( $0.8 \pm 0.1$ ) 지역은 서해안 평균 비만도보다 높았으며, 남해안의 완도 ( $0.7 \pm 0.1$ ) 및 마산 ( $0.7 \pm 0.1$ ) 지역도 남해안 평균 비만도보다 높게 조사되었다.

2010년은 서해안 및 남해안 ( $0.6 \pm 0.1$ ), 동해안 ( $0.5 \pm 0.1$ ), 제주도 ( $0.4 \pm 0.1$ ) 순으로 비만도가 측정되었다. 그중 충남 고남 ( $0.8 \pm 0.1$ ), 경기 내리 ( $0.7 \pm 0.1$ ), 충남 드르니 ( $0.7 \pm 0.1$ ), 충남 방포 ( $0.7 \pm 0.1$ ), 충남 보령 ( $0.7 \pm 0.1$ ), 경남 거제 ( $0.7 \pm 0.1$ ), 경북 포항 ( $0.7 \pm 0.1$ ) 바지락의 비만도가 전국 평균보다 높게 조사되었다.

2011년에는 서해안 ( $0.7 \pm 0.1$ ), 남해안 및 동해안 ( $0.6 \pm 0.1$ ), 제주도 ( $0.4 \pm 0.1$ )로 측정되어 서해안 지역의 바지락이 다른 지방에 비해 비만도가 높게 측정되었다. 가장 높은 비만도를 보인 지역은 충남 드르니 ( $0.9 \pm 0.1$ )였고, 충남 황도 ( $0.8 \pm 0.1$ ), 충남 보령 ( $0.8 \pm 0.1$ ), 경남 거제 ( $0.8 \pm 0.1$ )로 조사되었다.



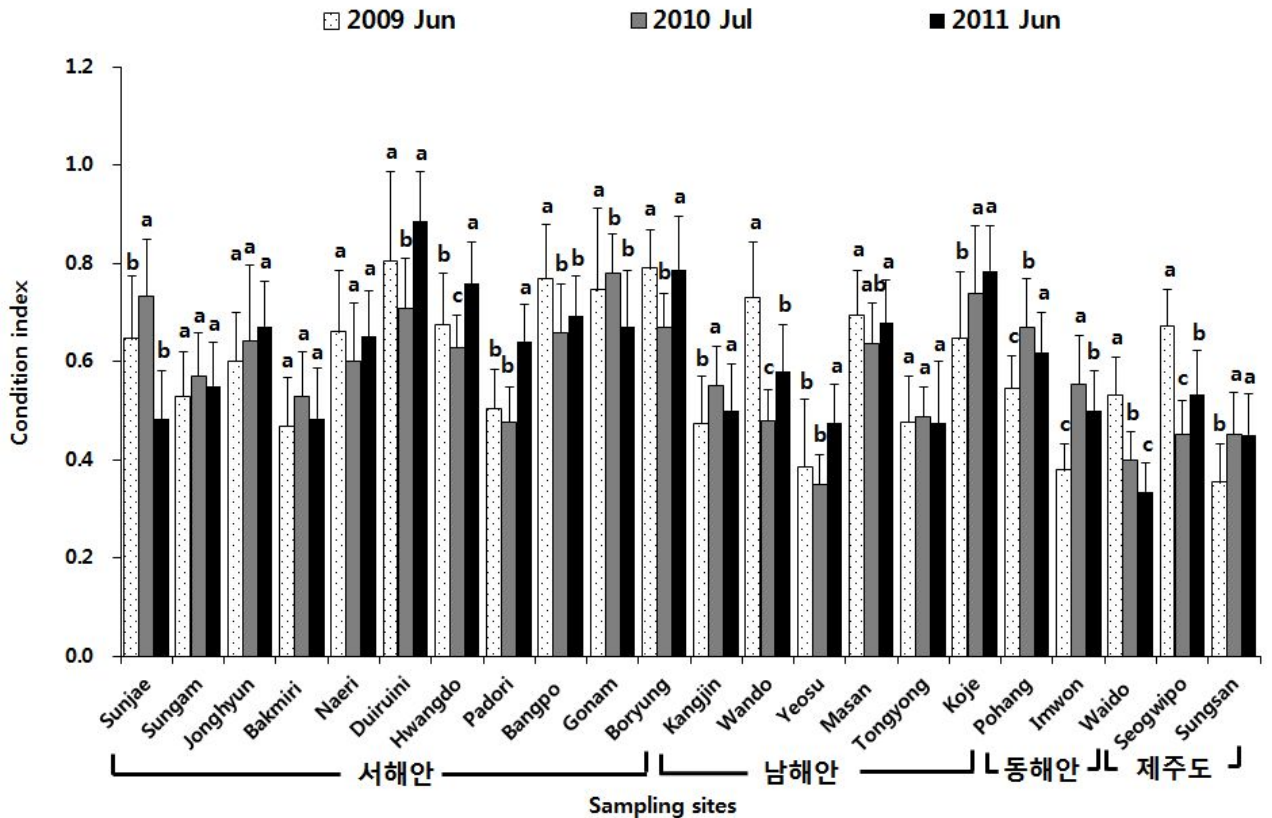


그림 3-1-5. 2009~2011년 동·서·남해안 및 제주연안의 바지락 비만도

(2) 조직학적 관찰을 이용한 생식소 발달단계 비교

각 지역별 생식소 발달 변화결과를 그림 3-1-6.에 나타내었다. 2009년 6월에 채집된 바지락은 휴지기 단계부터 소모기단계의 생식소 발달 단계가 관찰되었다. 특히, 2009년 6월 서해안 지역에 서식하는 바지락의 대부분은 완숙기 (21.6~89.5%) 단계이거나, 부분산란기 (7.9~73.5%) 상태인 것으로 확인되었다. 반면, 남해안 바지락은 대부분 부분산란기 (28.9~70.4%)였으며, 제주도 바지락 및 동해안 바지락은 약 50%가 완숙기 상태였다.

2010년 7월 채집된 동·서·남해안 및 제주도에 서식하는 바지락은 초기발달단계부터 소모기 상태의 바지락 생식소가 관찰되었다. 동해안 지역의 경북 울산, 경남 마산, 전남 여수, 전남 완도 및 충남 황도지역의 바지락은 대부분 산란 (42.1~78.9%) 중이거나, 소모기 (21.1~526%)인 것으로 관찰되었다. 경북 포항, 전남 무안, 전북 고창, 충남 방포, 고남, 드르니, 파도리 및 경기 내리지역의 바지락은 산란 직전의 완숙기 (50.0~90.5%)로 관찰되었다.

2011년 6월 채집된 서해안 지역 바지락은 대부분이 완숙기 (36.7~93.3%) 및 부분산란기 (3.3~46.7%)가 관찰되었고, 남해안 바지락은 완숙기 (10~90%)와 부분산란기 (3.3~50%)가 관찰되었으며, 동해안 바지락은 완숙기 (33.3~76.7%)와 부분산란기 (6.7~46.7%)를 보였다. 제주 바지락의 경우 완숙기 및 부분 산란기가 63.3%가 관찰되었다. 부분산란기의 경우 인천 지역의

바지락 (34.2%), 전남지역 (40%)로 다른 지역에 비해 높게 나타났으며, 이러한 생식소 발달단계는 번식량 측정 결과와 유사하게 나타났다.

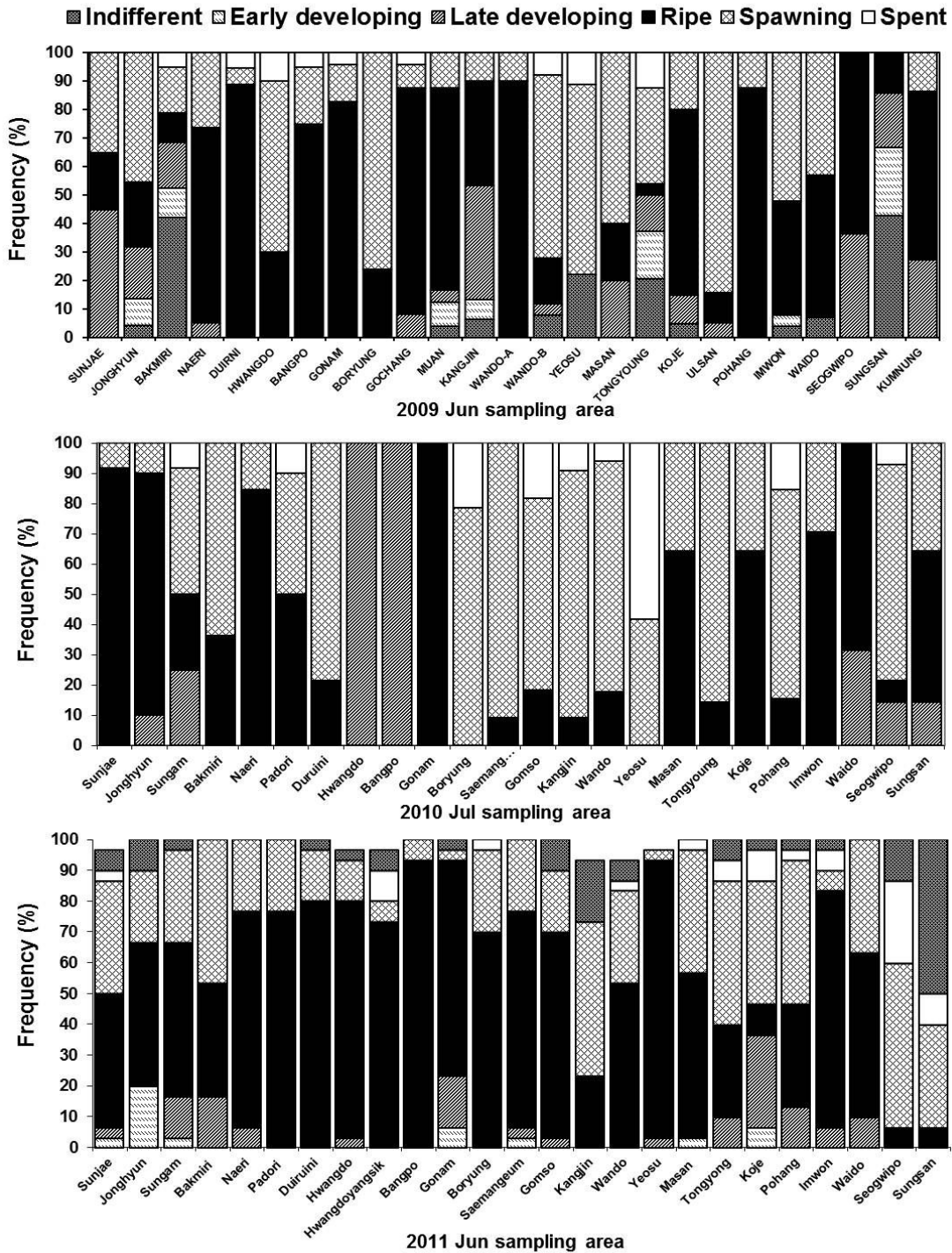


그림 3-1-6. 2009~2011년 지역별 바지락의 생식소 발달단계 비교

### (3) 생식소 지수 (Gonad somatic index) 와 포란도 (Fecundity)

2009년부터 2011년까지 채집된 전국 바지락의 생식소지수를 측정한 결과, 2009년 6월의 바지락은 0.5~18.9%, 2010년 7월은 3.7~33.1%, 2011년 6월은 2.0~18.8%의 범위를 보였다 (그림 3-1-7). 2010년 채집된 바지락의 평균 생식소지수의 범위가 2009년과 2011년에 비해 높게 나타났는데, 이는 채집시기에 따른 결과로 사료되며, 전국적으로 바지락이 완전히 성숙한 시기는 6월보다는 7월이 더 높게 관찰되었다. 이는 조직학적 관찰 결과와도 일치한다.

2009년 6월에 채집된 바지락의 생식소지수가 10%이상을 보인 지역은 총 5지역으로 충남 드르니 (13.3%), 방포 (11.8%), 고남 (11.6%), 전남 완도 (18.9%), 경북 포항 (15.3%)였다. 2010년 7월 채집된 바지락의 생식소지수가 평균 14% 이상 지역은 8지역으로 인천 선재 (23.7%), 인천 중현 (25.7%), 경기 내리 (20.0%), 충남 고남 (33.1%), 경북 마산 (22.8%), 경남 거제 (23.9%), 강원 임원 (28.2%), 제주 성산 (14.5%)이었다. 2011년 6월에 채집된 바지락의 생식소지수가 평균 10%이상인 지역은 12곳으로, 인천 선감 (12.7%), 경기 백미리 (10.9%), 안성 내리 (12.8), 충남 황도 (15.7%), 충남 파도리 (14.1%), 충남 방포 (10.5%), 충남 고남 (12.2%), 충남 보령 (15.2%), 전남 강진 (18.8%), 전남 완도 (14.3%), 전남 여수 (11.9%), 경북 마산 (10.7%)으로 조사되었다. Jasim (2008)은 제주 성산과 경기 백미리에 서식하는 바지락의 생식소 지수를 ELISA 기법을 이용하여 측정시, 두 지역의 바지락 생식소지수는 성산이 0.9~19.7%, 경기 백미리가 4.3~20.6%의 범위를 보였다. 두 지역의 바지락은 최대의 생식소지수 (성산 19.7%, 백미리 20.6%)가 관찰된 이후 산란이 이루어졌다. 이와 같은 결과로 미루어 보아, 바지락은 생식소가 전체 중량의 약 20% 정도에 도달한 이후 산란이 이루어지는 것으로 사료된다.

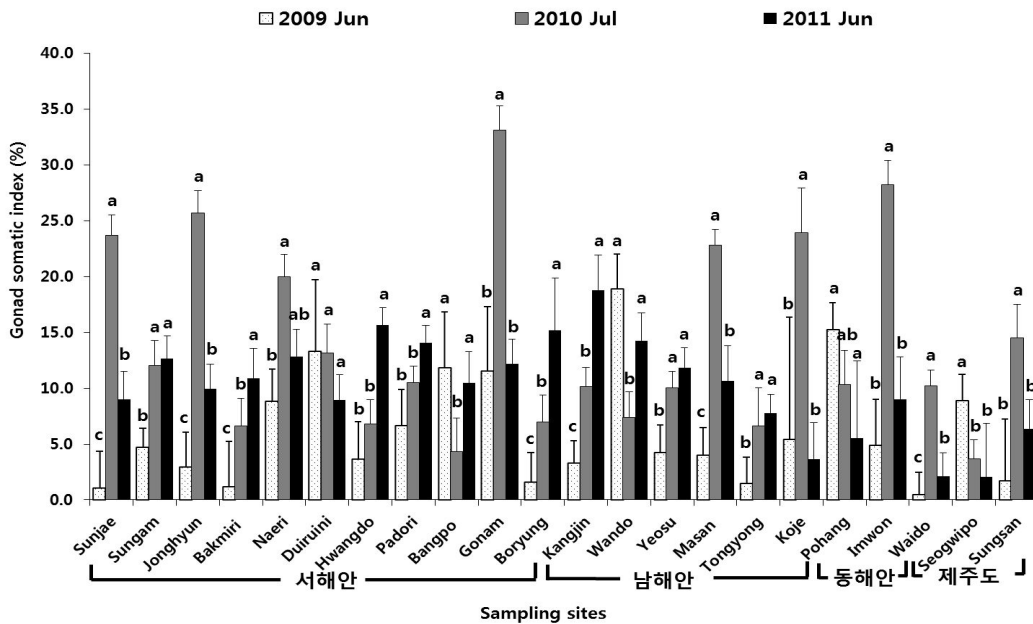


그림 3-1-7. 2009~2011년 실시된 지역별 생식소지수 비교

ELISA 분석으로 측정된 바지락의 생식소 지수를 바탕으로 3년간 채집된 바지락 개체들 중 산란 직전의 완숙한 바지락 개체군의 자료를 이용하여 지역별 바지락 집단의 포란수를 환산하였다 (그림 3-1-8). 2009년 채집된 지역별 바지락의 평균 포란수는 18,432~10,813,952 개, 2010년은 739,007~25,191,748개 그리고 2011년은 186,577~9,057,333개의 범위를 보였다. Park and Choi (2004)는 곰소만에 서식하는 바지락의 평균 포란도는 945,000~11,794,000개, 바지락의 포란수는 123,114~19,239,018개를 갖고 있는 것으로 보고하였으며, 바지락의 포란수는 바지락의 건중량 (meat dry weight)과 밀접한 상관관계가 있음을 설명하였다.

특히, 2010년 7월에 채집된 경남 거제 바지락의 경우 평균 패각의 길이는  $60.4 \pm 4.0$  mm 였고, 바지락 건조 중량은  $2.1 \pm 0.5$  g, 생식소지수는 23.9%로 이들 지수를 이용하여 거제 바지락의 포란도 계산시 다른 지역에 비하여 높게 측정되었다. 그 이유는, 일반적으로 포란도는 생식소 지수값에 총 바지락 건조중량을 나눈 후 바지락 난 중량 0.000000022 ng (Jasim, 2008)를 나누어 환산하여 나타내기 때문이다. 2010년의 경우 경남 거제 바지락의 전장의 길이가 큰 이유는 채집 장소가 일반 노출된 조간대에서 채집한 것이 아니라 형망어업 (桁網漁業)을 통해 채집된 개체를 사용하다보니 다른 지역에 비해 크기가 크며, 포항 바지락도 형망어업을 통해 채집되었다.

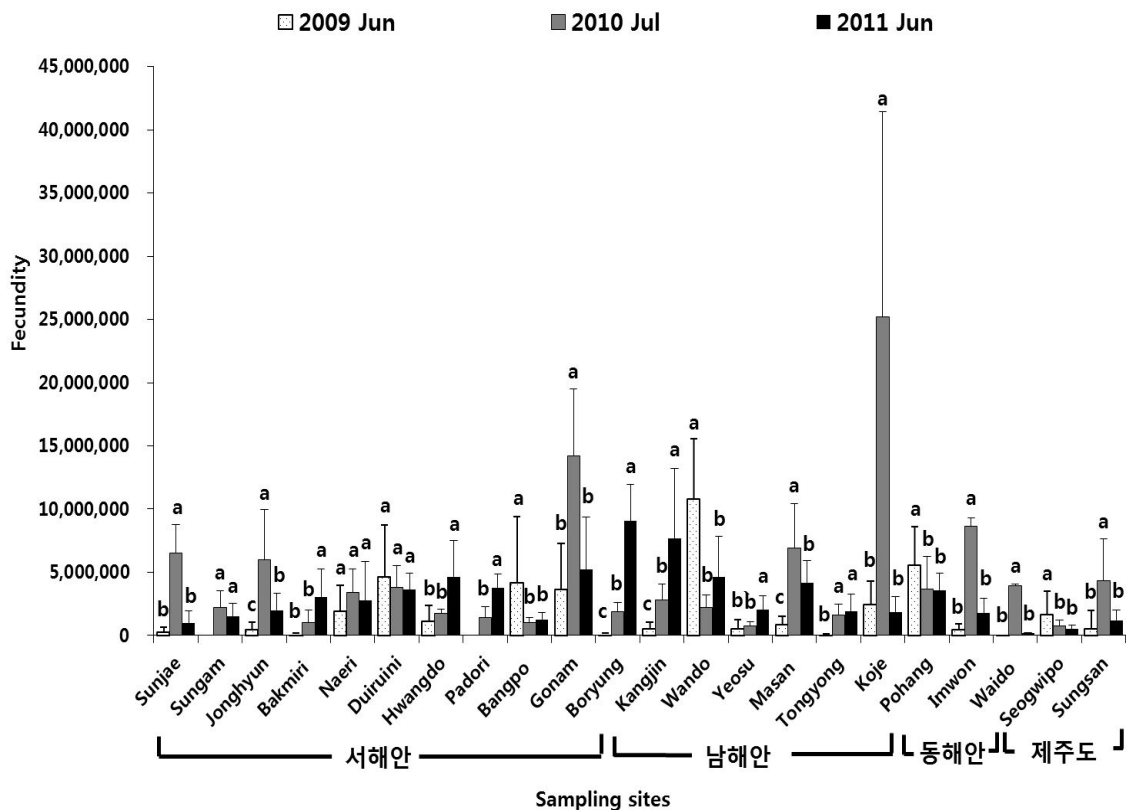


그림 3-1-8. 2009~2011년 지역별 바지락의 포란수 (Fecundity) 비교



#### (4) 2009~2010년 실시된 지역별 바지락포자충 (*P. olsenii*) 감염도 비교

RFTM 배양과 2M NaOH 방법을 이용해 2009~2011년 동·서·남해안 및 제주도에 서식하는 바지락의 아가미에서 관찰된 바지락포자충 감염도 결과를 Park (1999)의 방법에 따라 바지락 각 개체 당 *Perkinsus* 감염도로 환산하였다 ( $Y=3.3667x - 104,612$ ) (그림 3-1-9). 2009년 채집된 지역별 바지락 아가미에서 검출된 바지락 포자충의 범위는 0~1,542,240 converted *Perkinsus* cells/g weight였다. 지역별로 많은 차이를 보였는데 평균적으로 남해안의 바지락에서 감염도가 다른 지역에 비해 높게 나타났으며, 다음으로 서해안, 제주도, 동해안 순으로 조사되었다. 2009년 가장 높은 감염도를 보인 지역은 황도 바지락으로 아가미 1 g당  $1,542,240 \pm 817,697$  converted *Perkinsus* cells/g weight였다. 또한, 동해안의 포항 지역을 비롯하여, 충남 파도리, 제주 서귀포 및 금능 지역은 바지락 포자충의 감염도가 아주 낮거나 발견되지 않았다.

2010년 조사에서는 전국적으로 0~1,176,168 converted *Perkinsus* cells/g weight의 범위를 보였다. 주로 남해안에 위치한 강진, 여수, 목포, 거제와 충남 황도 및 인천 선감에서 높은 바지락 포자충 감염도를 보였다.

남해안 지역의 바지락 포자충 감염도는 2010년에 비해 약 2배가량 증가하는 경향을 보였으며, 동해안 포항, 임원, 제주 외도, 서귀포, 충남 파도리, 충남 방포지역은 바지락 포자충 감염이 아주 적거나 관찰되지 않았다. 따라서, 바지락내에 기생하는 포자충 (*Perkinsus* sp.)은 우리나라 전 연안에 골고루 분포하고 있으며, 그 감염정도는 지역에 따라 다른 특성을 나타내고 있다. 추후, 바지락 인공종묘 생산을 위한 우량 바지락 모패 선정시에 바지락 포자충의 감염도를 고려해야 할 사안이며, 이에 관한 정보가 모패 선정에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

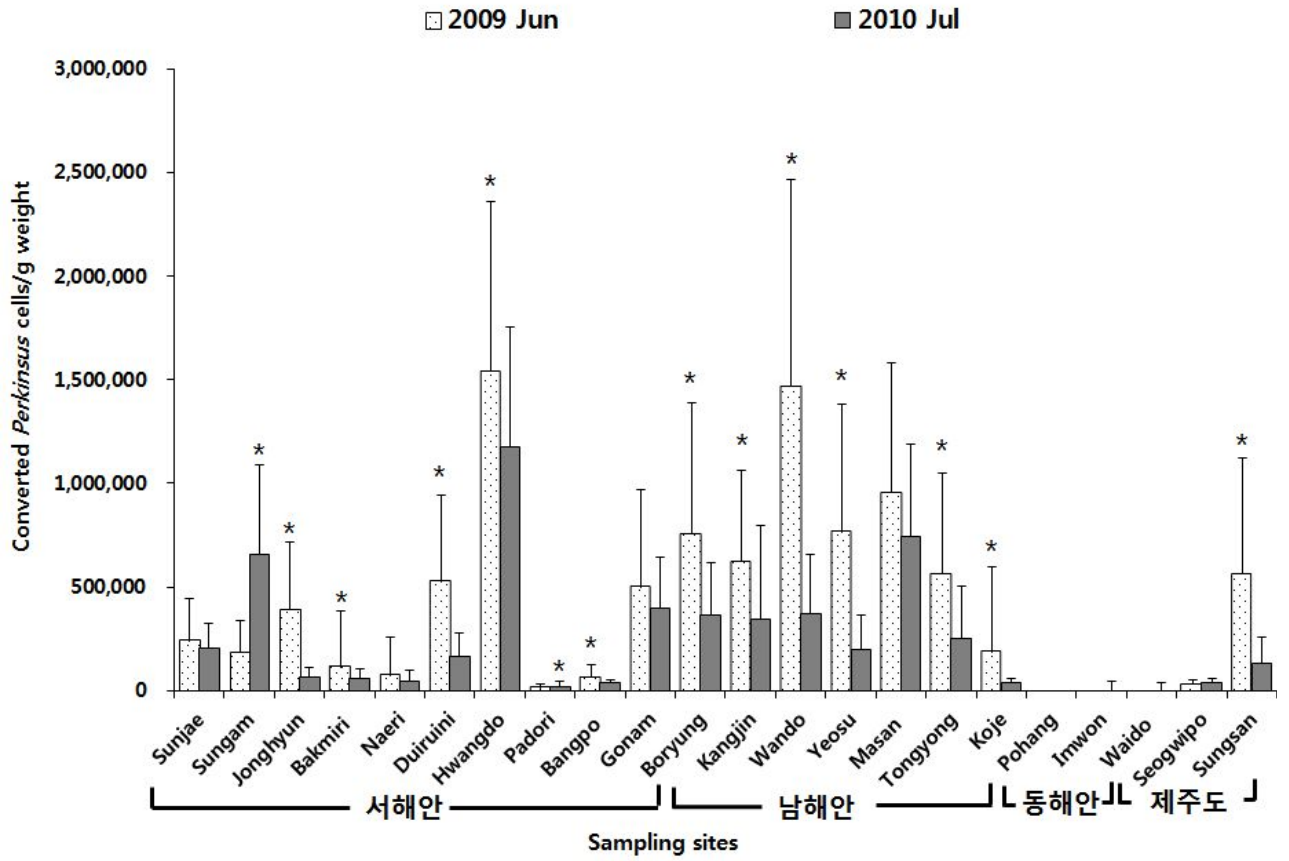


그림 3-1-9. 2009~2010년 실시한 지역별 바지락포자충 감염 비교



## 2. 전국 바지락의 질병 감염 및 면역력에 관한 연구

### 2-1. 우량 모패 확보를 위한 건강도 측정 기술 개발 및 바닥식 양성 바지락의 성장 및 질병 감염 연구

#### 가. 건강도 측정기술 개발

##### (1) 이론적, 실험적 접근방법

해산연체동물은 고착성이라는 생태학적 특징과 오염물질을 잘 농축하며 생리적 반응이 신속하다는 장점으로 환경모니터링에 널리 이용되고 있다 (O'Conner, 2002; Rittschof and McClellan-Green, 2005). 특히 바지락은 양식품종으로서 경제적 가치가 높을 뿐만 아니라 고밀도로 서식하기 때문에 생태학적 가치가 우수하고 환경모니터링에 필요한 다양한 요구 조건을 충족시키기에 우리나라 남·서 해안에서 환경모니터링에 이용하기 적합한 종이다 (Ji *et al.*, 2006).

최근 들어 연체동물의 면역력 측정을 통한 해당 생물의 건강도 측정과 이를 바탕으로 한 해양환경 모니터링이 주목을 받고 있다 (Chu, 2000; Park *et al.*, 2009). 이 방법은 시료의 생리적 반응을 측정한다는 점에서 보다 진화된 척추동물을 이용한 진단 방법과 높은 유사성을 갖고 있어 기존의 방법보다 진보된 기술로 인정받고 있다. 즉 의/약학 분야에서 사용되던 기술들이 대거 적용되어 시료의 생리적 반응을 정량적으로 측정하기 위한 시도가 진행되고 있다. 그 대표적인 방법 중 하나인 유세포 분석법 (flow cytometry)은 신속하고 정확하게 면역세포인 혈구의 형태나 밀도 및 세포내 특정 물질을 정량함으로써 다양한 생리적 변화를 분석할 수 있기 때문에 해산 이매패의 세포성 면역 기작을 측정하는데 매우 유용하다 (Hegaret *et al.* 2003a,b; Goedken and Guise, 2004; Tu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009).

그러나 유세포 분석기의 활용이 실험실 환경에서는 대부분 성공적으로 이루어짐에도 불구하고 실제 해양환경에서 면역력의 변화는 뚜렷한 경향을 나타내지 못하는 경우가 종종 보고되고 있다 (Gagnaire *et al.*, 2006, 2007; Flye-Sainte-Marie *et al.* 2009). Donaghy *et al.*, (2009) 에 의하면 이러한 혈구 기능에 대한 높은 변이가 발생하는 이유를 연구자간 측정 방법의 상이성, 개체간 변이 및 환경변화에 혈구가 민감하게 반응하는지에 대한 의문 등 3가지의 가능성을 제시하였다. 이들 요인 중 Ashton-Alcox and Fiord (1998) 는 대서양 굴 (*Crassostrea virginica*)의 경우 후천성 면역기작 (acquired immunity)이 결여되어 있는 무척추동물임에도 불구하고 신진대사에 따른 개체간 면역기작의 변이가 척추동물과 유사함을 밝힌 바 있다. 즉, 개체간 면역반응의 상이성이 이매패에서 존재하며 이러한 차이는 개체의 신진대사의 차이에 의해 유발되는 것으로 추정되고 있으며, 이러한 개체간 차이는 환경 변화보다 더 효과적으로 면역 반응을 결정하는 것으로 보고된 바 있다 (Ashton-Alcox and

Fiord, 1998). 따라서 현재 보고되고 있는 면역반응의 변이는 상당부분 개체간 변이에 의해 발생되었을 것으로 추정된다.

따라서 해산이매패의 면역력에 대한 보다 명확한 이해를 위해서는 개체간 면역력의 변이를 정확히 측정하는 것이 필수적이다. 이를 위해서는 최적 환경에서 서식할 때 나타나는 가장 안정적인 면역 기저값 (baseline value)의 파악이 선결되어야 할 것이다. 그러나 일반적인 해산 이매패의 면역력 측정은 시료를 실험실로 이동시키고 일정기간 적응 시킨 후 분석하게 되는데 이 과정에서 면역 반응의 변화 (alternation)가 발생할 것으로 추정되며 이 결과 개체간 변이가 증대되었을 것으로 판단된다. 따라서 본 연구는 바지락의 면역반응 기저값을 확인하기 위하여 유세포 분석기 (flow cytometer)를 휴대용으로 개량화한 장비를 이용함으로써 바지락 양식이 실제 이루어지고 있는 현장에서 직접 바지락의 면역력 측정을 시도하였다. 또한 기존의 방법과 같이 시료를 실험실로 이동시킨 후 면역력의 측정을 실시함으로써 시료 채집 후 나타나는 면역력 변이의 증가 유무를 확인하고자 실시되었다.

## (2) 연구내용

### ① 실험 개요

2009년 2월 충남 홍성의 바지락 양식장에 채집된 바지락 20개체를 채집 후 20분 이내에 분석 장치가 구비되어 있는 분석실로 옮겨 1 mL 인슐린 주사기를 이용하여 시료의 후폐 각근 하부의 심장에서 혈림프액을 분리하고 유세포 분석기 (Guava EasyCyte Mini) 를 이용하여 혈구 내 각종 면역력을 측정하였다 (Sample A). 또한 동일지역에서 채집된 시료를 12 시간동안 4°C에서 냉장하여 연구실로 옮긴 후 면역력 (Sample B) 을 측정함으로써 서식지의 면역력과 이후 보관과정에서 발생한 면역력의 변화를 비교하였다. 본 연구에서 측정된 면역력은 Park et al. (2009)의 방법에 의해 수행되었으며, 모든 면역력 측정을 위한 시료는 혈구 응집을 방지하기 위하여 얼음 위에서 실시되었다.

혈구분석이 완료된 시료는 각장 (mm)과 습중량 (g)을 측정하였으며, 비만도 (condition index, CI) 는 패각중량에 대한 습중량의 비로 계산하였다.

### ② DNA 손상도

시료의 혈림프액 200  $\mu$ L를 -20°C에서 냉각된 70% ethanol 500  $\mu$ L와 섞은 후 4°C 에서 1시간 동안 permeabilization시켰으며, 원심분리 (3,000 rpm, 5 min) 하여 상등액을 제거하고 침전물을 PBS 500  $\mu$ L 를 첨가한 후 vortex하여 균질화 하였다. 여기에 200  $\mu$ L의 cell cycle reagent (Guava Cell Cycle Reagent) 와 200  $\mu$ L의 PBS를 첨가하고 30 분간 반응시킨 후, 유세포 분석기 (Guava EasyCyte Mini) 의 Guava Cell Cycle Blue program을 이용하여 DNA 손상도를 측정하였다. DNA 손상도는 FSC/PM2 dot plot을 작성하고 이를 바탕으로 혈구집단만을 선택 (gating) 한 후PM2/Count histogram 을 이용하여 subG0-G1 부분과 그 이외 부분을

정량함으로써 전체 혈구 중 subG0-G1에 속한 혈구의 비를 계산하였다.

### ③ Apoptosis, necrosis, 세포사멸을

바지락 혈구의 apoptosis와 necrosis는 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) 을 이용하여 정량하였다. 이를 위하여 혈림프액 100  $\mu$ L를 채혈하고 동일량의 시약과 희석한 후 유세포 분석기 (Guava EasyCyte Mini) 의 Guava Cell Cycle Blue program 을 이용하여 분석하였다. 이때 5,000개의 세포를 FSC/SSC로 plotting 하고 혈구세포만을 선택 (gating) 하였으며, 이들을 다시 GRN-HLog/Red-HLog plot을 실시하여 FITC와 PI에 2중 염색 된 상태에 따라 구분된 quadrat을 근거로 혈구의 apoptosis와 necrosis의 진행 정도와 비율 을 정량하였다. 즉, 각각의 quadrat은 live cell (FITC negative and PI negative: lower left quadrat), early necrotic cell (PI positive and FITC negative: upper left quadrat), early apoptotic cell (FITC positive and PI negative: lower right quadrat), dead cell (FITC positive and PI positive: upper right quadrat) 등으로 구분하였다.

### ④ 세포내 활성산소

혈구내 ROS의 활성도 측정은 Lambert et al. (2003) 의 방법에 따라 2',7'-dichlorofluoresceine diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe 를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 150  $\mu$ L의 혈림프액을 같은 량의 GF/C filter 로 여과된 해수와 희석하고 여기에 DCFH-DA (Sigma) 를 첨가하여 최종 10  $\mu$ M이 되도록 하였으며, 실온의 암실에서 120분간 방치 후 DCF fluorescence 를 유세포분석기 (Guava EasyCyte Mini) 를 이용하여 측정 하였 고 형광량은 fluorescent arbitrary unit (A.U.) 으로 표시하였다.

### ⑤ 통계분석

Sample A와 B의 면역력 차이를 비교하기 위해 T-test를 실시하였고, 각 면역력간의 상관관계를 조사하였다. 통계분석은 SPSS 10.1 통계프로그램을 이용하여  $p > 0.05$  유의수준에서 실시하였다.

## (3) 연구 결과

본 연구에 사용된 시료의 평균 각장, 습중량 및 CI를 표 3-1-2에 나타내었다. 평균 각 장은 Sample A가 44.09 mm 였으며, Sample B는 39.07 mm로써 두 그룹간 유의적인 차이는 없었으며 ( $p > 0.05$ ), 습중량 역시 Sample A는 5.24 g였으며 Sample B는 5.35 g으로써 두 그룹 간 차이가 없었다 ( $p > 0.05$ ). CI 역시 Sample A는 6.05였으며 Sample B는 5.92로써 통계적 유 의성이 없는 것으로 나타났다 ( $p > 0.05$ ). 이상의 결과를 바탕으로 볼 때 Sample A와 Sample B는 동일한 집단으로써 본 연구는 동일 집단을 대상으로 이들에 대한 면역력의 차이를 비교 했음이 확인되었다.

표 3-1-1. 시료 A와 B의 크기 및 면역력 비교

Immune parameters	Sample A (Immediate)				Sample B (12 hr later)				T-test (Significance)
	N	Mean±SD	Range	coefficient of variation	N	Mean±SD	Range	coefficient of variation	
Shell length (mm)	20	44.09±2.95	39.67-48.73	0.0669	20	44.85±3.48	39.07-51.00	0.0777	<i>p</i> >0.05
Tissue wet weight (g)	20	5.24±1.23	3.73-7.48	0.2355	20	5.35±1.26	3.43-7.43	0.2353	<i>p</i> >0.05
CI	19	6.05±0.96	4.20-7.85	0.1579	19	5.92±0.77	4.03-7.27	0.1303	<i>p</i> >0.05
ROS (AU)	12	41.96±5.63	37.99-58.03	0.1342	12	72.62±5.60	62.10-80.49	0.0771	<i>p</i> <0.001
DNA damage (%)	19	0.45±0.26	0.15-1.04	0.5711	20	3.46±2.30	0.54-7.16	0.6653	<i>p</i> <0.001
Live cell (%)	20	99.80±0.23	99.82-99.96	0.0023	20	94.35±1.18	91.56-95.88	0.0125	<i>p</i> <0.001
Apoptosis (%)	20	0.03±0.04	0.00-0.12	1.3165	20	0.29±0.45	0.00-1.92	1.7527	<i>p</i> <0.001
Necrosis (%)	19	0.10±0.125	0.00-0.48	1.2935	20	4.84±1.56	1.90-8.34	0.3222	<i>p</i> <0.001
Dead cells (%)	20	0.06±0.07	0.00-0.18	1.1861	20	0.52±0.87	0.00-1.60	1.6797	<i>p</i> <0.05

Sample A와 Sample B의 면역력 차이는 표 3-1-2에 나타내었으며, 두 시료의 면역력은 통계적으로 유의미한 차이를 나타내었다. DNA 손상도 (DNA damage)의 경우 Sample A의 평균값은  $0.451 \pm 0.257\%$ 에 불과하였으나 Sample B의 경우  $3.456 \pm 2.299\%$ 에 달하였다 ( $p < 0.001$ ). ROS의 경우도 Sample A의 경우  $41.962 \pm 5.631$  AU 였으나 Sample B는  $72.623 \pm 5.599$  AU로 증가하였다 ( $p < 0.001$ ). 염증세포율의 경우 Sample A는  $0.10 \pm 0.13\%$ 에 불과하였으나, Sample B는  $4.84 \pm 1.56\%$ 로 약 50배 정도 급증하였으며 ( $p < 0.001$ ), 세포 자살률 역시 Sample A가  $0.03 \pm 0.04\%$ 였으나 Sample B는  $0.29 \pm 0.45\%$ 로 약 10배 정도 상승하였다. 사망한 세포의 경우에도 Sample A는  $0.06 \pm 0.07\%$ 였으나 Sample B는  $0.52 \pm 0.87\%$ 로 역시 약 10배의 혈구 사망률이 증가하였다 ( $p < 0.05$ ).

또한 Sample A의 변동계수 (Coefficient of variation)는 각 면역력 조사 항목 중 ROS와 염증세포율을 제외하고 모든 항목에서 Sample B보다 낮았으며, 각 면역력의 표준편차 역시 Sample B에서 급격히 증가되었음이 확인되었다 (표 3-1-2).

각 조사 항목 간 상관관계를 조사한 결과 Sample A에서는 총 8가지 항목에서 유의한 상관관계가 측정되었으나, Sample B의 경우 총 5가지의 유의미한 상관관계가 관측되었다 (표 3-1-3). Sample A의 경우 생존세포 비율은 염증세포, 자살세포, 사망세포 및 DNA damage와 음(-)의 상관관계가 있었으며, 염증세포율은 자살세포율과 양(+)의 상관관계가 관측되었다. 자살세포율은 사망세포 및 DNA 손상도와 양의 상관관계를 갖고 있었으며 DNA 손상도는 사망세포율과 양의 상관관계가 확인되었다. Sample B의 경우 ROS는 CI와 음의 상관관계가 있었으며, 세포자살은 생존세포와 염증세포와 음의 상관관계가 관찰되었다. 사망세포율은 염증세포율과는 양의 관계가, 세포자살율과는 음의 관계가 확인되었다.

#### (4) 고찰

해산연체동물의 혈구는 면역 효과기 (immune effector) 로써 세포성 면역 반응에 주요한 역할을 한다 (Donaghy et al., 2009). 이러한 세포성 면역 반응은 해양환경 즉 수온, 염분, 영양분 및 독성 물질에 반응하며 따라서 시료의 생리적 상태를 대변하는 것으로 알려져 있다 (Chu, 2000). 이에 따라 해양환경변화 및 해산이매패의 건강도를 측정하는데 면역력의 정량화를 이용한 연구가 최근 들어 급격히 증가하고 있는 실정이다. 그러나 현재까지 무척추동물, 특히 해산연체동물의 면역반응에 대한 충분한 이해가 선행되지 못한 실정이기 때문에 다양한 실험이 수행되었음에도 불구하고 면역반응은 통계적 유의성을 갖는 결과를 나타내지 못하고 있다 (Flye-Sainte-Marie et al. 2009). 따라서 보다 일관성 있는 면역력의 변화를 확인하기 위해서는 최적의 안정화된 면역력의 측정, 즉 바지락의 면역 기저값 측정이 필수적이다.

본 연구에 사용된 유세포 분석기는 휴대용으로써 (중량 22.7 kg, 23 cm (h) x 39.4 cm (w) x 45.5 cm (d) 바지락이 양성되고 있는 현장에서 직접 운용이 가능한 기종이었다. 이를



이용해 측정된 바지락의 면역 기저값 (Sample A)은 측정 방법의 차이 등 직접적 비교가 적합하지 않은 점이 있으나 전반적으로 타 연구에서 측정된 대조구의 면역력 (가장 안정된 면역력) 과 비교하여 이들보다 안정된 결과를 나타내고 있다 (Table 3-1-4).

따라서 본 연구에서 채집 후 서식지에서 신속하게 측정된 바지락의 면역력 (Sample A)은 바지락의 면역 기저값을 나타낸 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서 수행된 Sample B의 면역력이 Sample A와 비교하여 급격히 변화함이 확인됨에 따라 바지락의 면역력은 서식지에서 실험실로 옮긴 후 급격히 감소하였음이 확인 되었다. 이 과정에서 Sample B에서 측정된 각 면역력의 표준편차 (standard deviation)와 범위 (range)가 급격히 증가하였으며, 변동계수 (coefficient of variation) 또한 대부분의 면역 인자들에서 상승하였음을 감안할 때 서식지에서 안정화 되었던 바지락의 면역력은 수온 변화에 민감하게 반응함으로써 면역력의 저하뿐만 아니라 면역력의 변이 또한 상승됨이 확인되었다. 면역력 변이의 상승은 각 면역 항목간 상관관계를 조사한 결과에서도 유의미한 상관관계 ( $p < 0.05$ )를 갖는 항목 수가 Sample B에서 감소 (8개에서 5개로 감소) 한 결과에서도 확인되었다. 또한 상관관계 분석에서 채집 지역에서 측정된 면역력 중 자살세포: 염증세포와 사망세포: 세포자살의 관계가 양 (+)의 관계인 것으로 관찰되었으나, 실험실로 옮겨 실험한 시료에서는 이들의 관계가 음 (-)의 관계로 전환됨으로써 바지락의 면역반응을 이해하는데 혼란을 초래하였다.

이와 같은 사실을 살펴볼 때 안정된 서식환경에서 적합하지 않은 환경으로 옮긴 시료의 면역반응은 실제 환경에서 나타내던 초기 면역반응과 상이하며, 개체간 면역반응의 변이가 상승하였음이 확인되었다. 이 같은 개체간 변이 상승의 원인은 확실치 않으나 Ashton-Alcox and Ford (1998)이 언급하였던 바와 같이 개체간 신진대사 또는 불명확한 요인에 의해 면역반응의 변이가 상승하였음이 추정될 수 있다. Flye-Sainte-Marie et al. (2009)은 신진대사의 경우 질병 감염에 의해 변이가 발생함을 보고한 바 있어 다양한 전염성 질병에 쉽게 노출되는 있는 해산 이매패의 특성을 감안하면 면역 반응 검사 시 질병에 의한 면역반응의 교란을 고려해야 할 것이다. 또한 질병감염 등 개체의 신진대사에 영향을 미치는 요인들이 환경변화와 조합되어 이매패의 면역 반응에 어떤 영향을 미치는지에 대한 규명이 선행되어야 이매패의 면역반응을 이용한 시료의 생리활성 측정 및 이를 이용한 해양환경 연구가 보다 높은 신뢰성을 담보할 수 있을 것으로 판단된다.

표 3-1-2. 시료 A와 B의 크기 면 면역력간 상관관계

	ROS	Live cell	Necrosis	Apoptosis	Dead cell	DNA damage	Shell length	Biomass	Shell weight	CI
ROS	-									-0.592
Live cell		-		-0.539						
Necrosis		-0.419	-	-0.615	0.965					
Apoptosis		-0.967	0.473	-	-0.705					
Dead cell		-0.850		0.660	-					
DNA damage						-				
Shell length		-0.598		0.501	0.455		-	0.812	0.834	
Biomass							0.621	-	0.811	0.514
Shell weight							0.798	0.667	-	
CI								0.574		-

표 3-1-3. 현재까지 보고된 면역값 중 최저값 비

Species	Immune parameters					Sources
	Hemocyte mortality (%)	Intra cellular ROS (%)	Apoptotic cell (%)	Necrotic cell (%)	DNA damage (%)	
<i>R. philippinarum</i>	4	-	2	3	5	Park et al. (2009)
<i>R. philippinarum</i>	3.7	-	-	-	-	Hegaret et al. (2007)
<i>Crassostrea gigas</i>	20	-	-	-	-	Gagnaire et al. (2007a)
<i>C. gigas</i>	2.5	-	-	-	-	Duchemin et al. (2007)
<i>C. gigas</i>	-	≠ 100	-	-	-	Labreuche et al. (2009)

## 나. 바닥식 양성 바지락의 연령별 성장, 질병 감염 및 폐사 연구

### (1) 이론적, 실험적 접근방법

현재 우리나라에서 바지락은 일반해면어업과 천해양식어업 두 가지 방식에 의해 생산되고 있다. 일반 해면어업이란 조하대에 서식하고 있는 바지락을 채취 기구를 이용하여 수확하는 방식으로 대부분 종패의 자연 발생에 의한 가입 (recruit)에 전적으로 의존한다. 한편, 천해양식어업의 경우엔 서해안이나 남해안 지역의 발달된 조간대를 이용하여 종패를 인위적으로 살포하고 관리한 후 수확하는 방식으로 우리나라의 경우 대부분의 바지락이 이와 같은 방식에 의해 생산되고 있다. 이렇게 조간대에서 인위적인 관리에 의해 종패가 살포되고 육성되는 방식을 바닥식 양성 방식이라 부르며, 바닥식 양성 바지락은 약 1년생 종패를 구입하여 1년~2년 정도 관리 한 후 수확하여 판매하는 방식이 주를 이루고 있다. 최근 20 여 년간 우리나라에서 나타나는 바지락 생산량 통계를 보면 일반 해면어업에 의한 바지락 생산량의 변화는 크지 않으나 천해양식어업에 의한 바지락 생산량은 해마다 큰 편차를 보이고 있고 현재 바지락 생산량은 과거 1990년 초반에 비해 급격히 감소한 상태임을 알 수 있어 최근 바지락 생산량의 감소는 천해양식어업에 의한 생산량의 감소가 주원인임을 나타내고 있다 (통계청, 2011). 실제로 최근 20 여년 간 조간대 바지락의 대량 폐사와 관련한 다수의 보고가 이루어지고 있는 실정이다 (Park et al., 2005; 박과 박, 2005; 김과 이, 2008).

바지락의 대량 폐사와 관련하여 다양한 원인 조사가 이루어진바 있으며, 환경적인 요인과 전염성 질병에 의한 폐사가 주요 원인으로 지목되고 있으나 현재까지 명확한 원인은 규명되고 있지 못한 상태이다 (최 등, 1998; 국립수산진흥원, 1998, 2001). 특히 연령군에 따른 성장과 사망률을 조사하여 그 차이가 확인된다면 이러한 자료는 바지락 양식 방법을 개선하는데 기초적인 단서를 제공할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구는 바닥식 양식 양식 바지락의 연령에 따른 성장 및 질병 감염 및 폐사율을 조사하고자 치패단계부터 1년, 2년생의 바지락을 조간대 양식장에 살포하고 이들의 성장 및 질병 감염 추세를 확인하고자 하였다. 특히 이러한 조사를 위하여 실험용 바지락의 외부 간섭을 배제하기 위하여 cage를 제작하여 실험에 이용하였으며, 조사 대상 질병은 바지락에 대량 폐사 원인생물로 잘 알려진 *Perkinsus olseni*의 감염율과 감염도를 조사하였다.

### (2) 연구내용

바지락 사육 시설은 2009년 1월 충남 홍성 갈산면 궁리 (그림 3-1-10)에 설치를 하였고, 자연산 바지락 치패 (각장 3~5 mm), 1년생 (평균 각장 29 mm), 2년생 (평균 각장 42 mm) 각각 2,000개체를 1 m<sup>2</sup>의 cage 4 개에 사육하면서 6월까지 매월 30개체씩 채집하여 분석에 이용하였다.

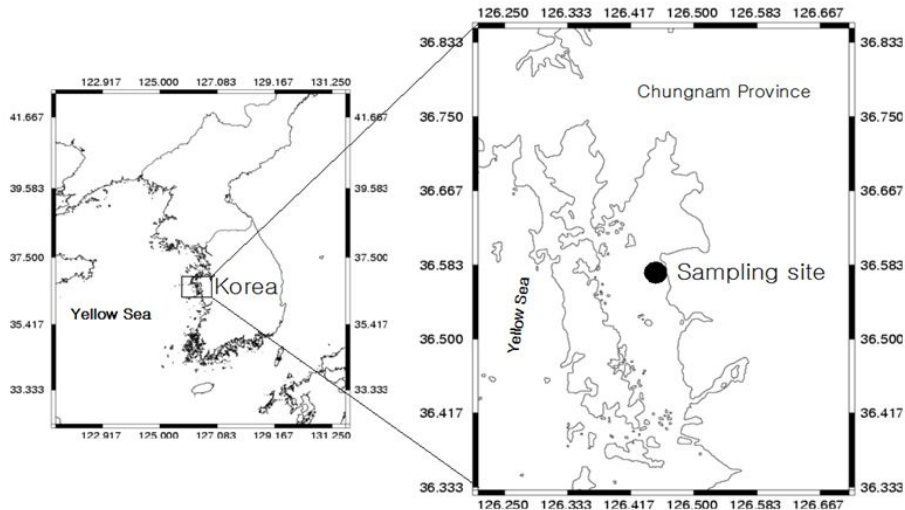


그림 3-1-10. 시료 채집지역

실험실로 옮긴 시료의 성장을 측정하기 위하여 시료의 각장은 버니어캘리퍼스를 이용하여 0.1 mm까지 측정하였고, 질병의 유무는 원충성 기생충인 *P. olseni*의 감염율과 감염도를 조사하였다. 이 때 *Perkinsus*의 진단은 Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM)법을 이용하여 바지락 조직속의 *Perkinsus* 영양체가 휴면포자로 유도되도록 한 후 Lugol's iodine으로 염색하여 확인하였으며, 정량적인 감염도 확인은 휴면포자를 2M NaOH에서 순수분리한 후 혈구계수판을 이용하여 계수하는 방법을 사용하였다. 최종 감염도는 바지락 1개체당 총체 수를 나타내었다. 본 연구에 이용된 치패의 경우 2008년 12월 홍성 궁리 해안에서 채집하였으며, 1년생 (2007년 하계 발생-약 1년 6 개월 경과추정)과 2년생 바지락 (2006년 하계발생-약 2년 6 개월 경과 추정)의 경우에는 인근 바지락 양식장 어민으로부터 바지락을 제공받아 사용하였다.

### (3) 연구 결과 및 고찰

바지락의 성장은 연령에 따라 다른 경향을 나타내었다 (그림 3-1-11A). 2년생의 경우 겨울과 봄철에는 성장이 정체되어 있었으며 6월이 되었을 때 성장하는 것이 관찰되었다. 즉 12월의 평균 각장이 42 mm 였으나 이 각장은 이듬해 5월까지 큰 변동이 없었으며 6월이 돼서야 48 mm까지 성장하였다. 그러나 1년생의 경우엔 겨울철엔 각장이 30 mm전후로 성장이 정체되어 있었으나 3월부터 지속적으로 성장하여 6월엔 35 mm까지 성장 하는 것으로 나타났다. 치패의 경우에도 1년생과 비슷한 성장 패턴을 나타내 겨울철에는 각장이 5 mm 미만 였으나 4월부터 급격히 성장하여 6월엔 15 mm까지 성장하였다. 본 연구에서 조사된 3개의 연령군 중 동일 기간 내 치패의 성장이 가장 급격이 일어남이 확인되었다. 본 조사 결과 연구 종료시기인 8월에 1년생과 2년생의 성장이 감소한 이유는 이 당시 많은 개체가 사망하였

으며 특히 대형 개체들에서 사망률이 높았기 때문에 사료된다.

바지락의 폐사 원인 기생충으로 알려진 *P. olseni*는 바지락의 연령에 따라 다른 감염 패턴을 나타냈다 (그림 3-1-11B). 즉 연령이 높을수록 감염도가 증가하는 것이 관찰되었다. 1년생의 경우 겨울철과 봄철에는 바지락 1 개체 당 약 100만~500개의 충체가 검출되었으며 6월에는 800만 개체까지 증가하였다. 2년생의 경우엔 1년생에 비해 감염도가 더욱 증가하여 봄철에 1000만 개체 이상의 충체가 검출되었고 5월과 6월에는 더욱 증가하는 경향을 나타냈다. 그러나 치패의 경우 각장이 13 mm 이상 되었을 때 (6월)부터 검출되었으며 이때 감염도는 평균 8만 개체정도 였다. 즉 본 연구에서는 숙주의 연령이 증가할수록 *P. olseni* 감염도 역시 증가하는 것이 확인되었으며, 이 결과는 *P. olseni* 감염에 대한 바지락의 생물학적 최소 형이 약 10 mm 전후임을 나타내는 중요한 정보를 제공하고 있다고 할 수 있다.

바지락의 대량폐사는 연령에 따라 상이한 경향을 나타내는 것이 관찰되었다 (그림 3-1-11C). 1년생과 2년생은 겨울철과 이른 봄에는 폐사가 거의 일어나지 않았으나 5월부터 폐사가 발생하여 6월에는 누적 폐사율이 20% 이상 이었으며 연구종료시점인 8월에는 50%까지 육박하였다. 이러한 폐사율 추세는 1년생과 2년생이 매우 유사한 경향을 나타내었다. 치패의 경우에도 겨울철과 봄철엔 폐사가 매우 미미하여 4월까지의 누적 폐사율은 3%미만 이었으나 5월엔 약 7%로 증가하였고 8월엔 23%까지 증가하였다. 그러나 이와 같은 폐사율은 1년생과 2년생에 비해서는 매우 낮은 결과로 같은 환경이라 할지라도 치패의 사망률이 낮음을 나타내었다.

결론적으로 본 연구결과 바지락의 성장과 질병 감염 및 폐사는 연령에 따라 다르게 나타남이 확인되었으며, 치패의 성장이 빠르고 질병 감염은 낮으며 폐사율 또한 낮은 것으로 나타났다. 반면 연령이 높아질수록 성장이 늦어지며 기생충 감염도가 높아졌으며 폐사율은 1년생이나 2년생에 관계없이 치패에 비해 높게 나타나는 것으로 조사되었다. 따라서 바지락 양성은 수확시 까지 성장률을 높여 조기에 수확할 수 있는 효과적인 양성 방법의 개발이 강구되어야 할 것으로 판단된다.

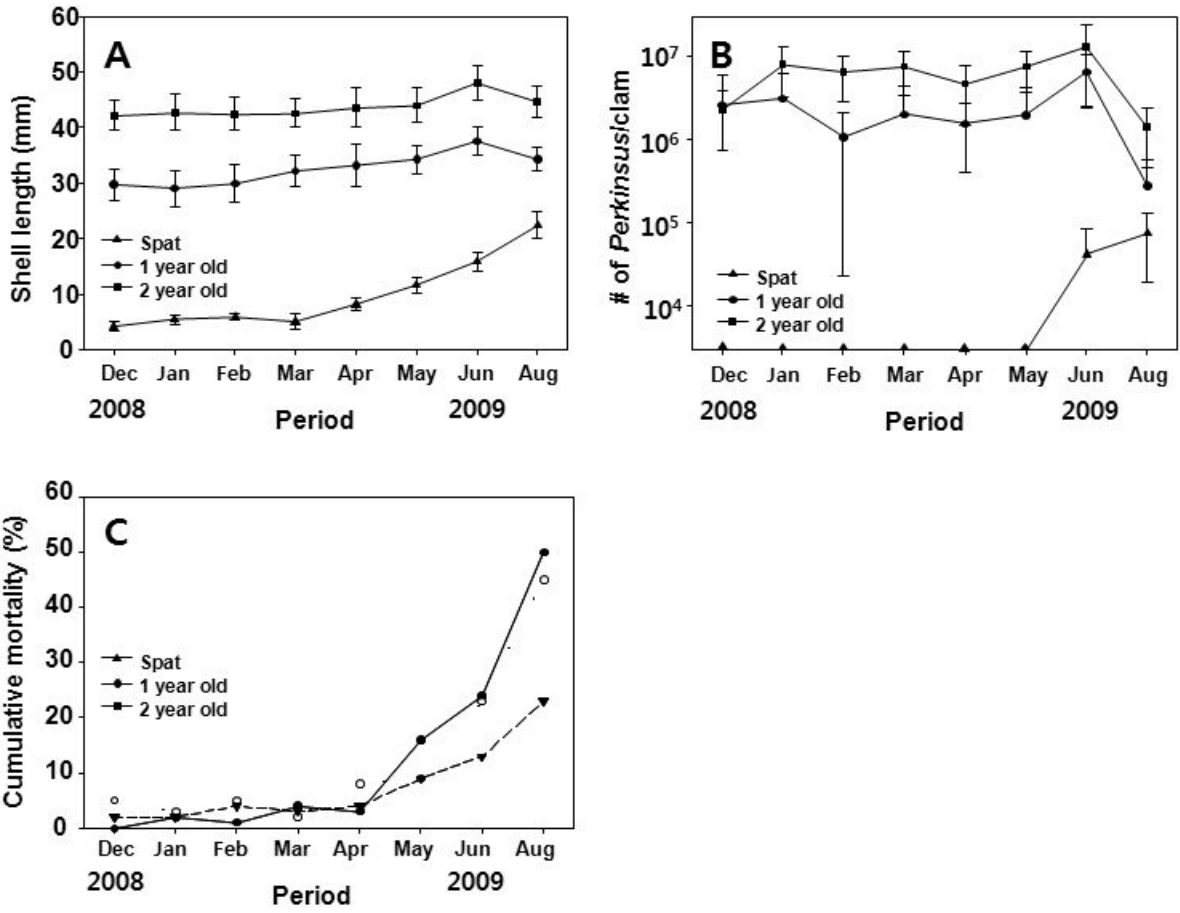


그림 3-1-11. 각 연령 그룹간 계절에 따른 패각성장 (A), 기생충 감염율 (B), 폐사율 (C)

## 2-2. 바지락 모패 및 치패의 건강관리 기술 개발

### 가. 지역별 바지락 개체군의 질병 감염에 대한 생리적 반응 비교

#### (1) 이론적, 실험적 접근방법

무척추동물인 이매패는 척추동물에 비해 상대적으로 미발달된 면역학적 특성을 보유하고 있으며 (McKay and Jenkin, 1969; Mendoza and Faye, 1999; Johansson, 1999; Donaghy *et al.*, 2009), 부가가치가 낮기 때문에 서식지 환경 개선을 통한 선천 면역력의 증강을 유도하거나 품종 개량을 이용해 질병에 대한 저항성이 높은 개체를 생산하는 방법이 권장되고 있다 (Gagne *et al.*, 2008; Flye-Sainte-Marie *et al.*, 2009). 이러한 방법 중 특히 선발 육종을 통한 내병성을 가진 품종의 개발이 프랑스와 미국 등 일부 선진국을 중심으로 시도되고 있으며 가시적 성과를 거두고 있다 (Barber *et al.*, 1991; Degremont *et al.*, 2003; Ragone Calvo *et al.*, 2003). 따라서 바지락과 같은 산업적 중요성이 높은 생물의 경우 우수한 유전형질의 개발을 통한 생산량 증대가 시도되어야 하나 이러한 방법을 이용한 신품종의 개발은 막대한 비용과 장기적 프로젝트의 결과로만 성공 할 수 있어 패류 연구 선진국에서도 극히 제한적인 경우에만 시도되고 있는 실정이다.

이러한 선발육종의 전제는 패류의 가계 (family)를 기반으로 유전형질의 차이에 의해 성장과 특정 질병에 대한 저항성이 다르게 나타날 수 있다는 사실이다 (Beattie *et al.*, 1980; Perdue *et al.*, 1981; Langdon *et al.*, 2003; Ernande *et al.*, 2004; Degremont *et al.*, 2005). 이러한 가계별 유전형질은 지리적 차이에 의해 나타나는 경우가 빈번하다 (Degremont *et al.*, 2005). 즉, 같은 종이라 할지라도 지리적 차이에 의해 패류의 성장이나 질병 저항성이 다르게 나타날 수 있다는 사실이다. 실례로 다수의 선발육종 연구에서 연구 초기 생리적 또는 병리적 반응의 차이를 근거로 선발육종의 주요 가계가 선택되어 이용되고 있다.

우리나라 서해안은 발달된 조간대를 이용한 대규모 바지락 양성이 실행되고 있는 지역이며 이에 따라 바지락 양식은 이 지역 어업인의 소득과 직결된 매우 중요한 산업이다. 그러나 최근 10여년 동안 대규모 바지락 폐사가 발생하고 있다. 그러나 현재까지 명확한 폐사 원인은 규명되지 못하고 있는 실정으로 급격한 환경 변화나 전염성 질병에 의해 유발 되었을 것으로 추정되고 있다. 이들 원인 중 전염성 질병은 OIE (Office international des epizooties) 에서도 중요하게 취급되는 분야로써 최근 전염성 질병의 특징은 빠른 전염성과 강한 병원성을 나타내며 높은 폐사율을 유발한다는 점이다. 따라서 특정 질병에 대한 저항성이 높은 계군의 개발은 산업적으로 매우 중요한 의의를 갖는다. 특히 우리나라 서해안은 *Perkinsus olseni*의 감염율과 감염도가 매우 높은 지역으로써 이 기생충은 우리나라 패류 폐사에 중요한 영향을 미치는 것으로 보고되고 있기 때문에 원충성 질병에 대한 저항성 높은 계군의 개발은 매우 시급한 실정이다.



일반적으로 특정 질병에 대한 저항성이 높은 개체군은 그 질병에 대하여 우수한 생리적 반응 즉, 면역학적 반응을 나타낸다. 따라서 패류에서 면역 반응의 정량은 패류의 생리적 반응을 측정하는 매우 유용한 도구이다. 패류의 면역 반응은 세포성 면역과 체액성 면역으로 나뉘며 현재 다양한 기술이 개발되어 이용되고 있다. 특히 유세포 분석기 (flow cytometer)를 이용한 방법은 측정하려는 면역세포 (혈구) 개개의 특성이나 세포집단의 형태적 특성과 생화학적 특성을 정확하고 신속하게 정량할 수 있다는 장점이 있어 바지락과 같은 해산 이매패의 세포성 면역 기작을 측정하는데 매우 유용하다 (Goedken and Guise, 2004).

따라서 본 연구는 우리나라 해역 중 물리학적/생태학적 특성이 다르게 나타나는 전남 강진 (남해), 충남 홍성 (서해), 제주 (제주) 산 바지락 개체군을 대상으로 이들이 원충성 질병에 감염되었을 때 나타나는 면역학적 반응과 폐사율을 비교함으로써 지역에 따른 바지락의 질병 감염에 대한 저항성의 유무를 조사하고 향후 생존력이 우수한 바지락 모패 집단을 개발하는데 목적이 있다.

## (2) 연구내용

### (가) 시료채집

우리나라는 3면의 해양 환경이 뚜렷하게 구분되는 해역을 갖고 있으며, 본 연구에 사용된 바지락은 이러한 해역의 특성을 고려하여 충남 홍성 (서해안), 전남 강진 (남해안) 및 제주 외도 (제주)에서 채집되었다 (그림 3-1-12).

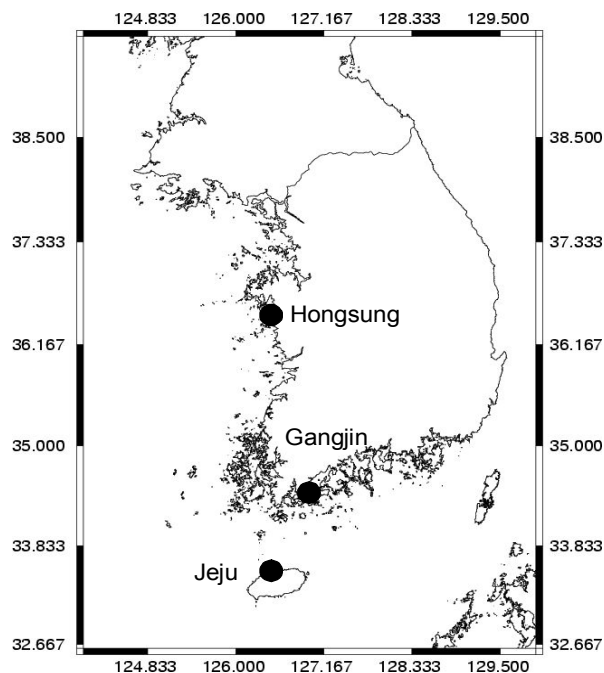


그림 3-1-12. 시료채집 지역 (충남 홍성, 전남 강진, 제주 외도)

(나) 바지락 실내 사육

본 연구에 사용된 바지락은 실험실의 폐쇄된 환경에서 장기간 사육됨으로써 다른 개체군이라 할 지라도 물리적/생물학적으로 동일한 환경하에서 적응토록 유도되었다. 모든 바지락은 최소 2개월 이상 실험실에서 사육되었으며, 수조의 크기는 50 cm x 30 cm x 30 cm 로 각 수조마다 100 마리씩의 바지락이 수용되었다. 먹이는 Shellfish diet 1800을 2억 cell/1L의 농도로 매일 공급되었다. 수온은 24~26°C, 30 psu를 유지하였다. 바지락 양성수조는 동일한 크기의 사육조와 여과조로 구성되었다. 사육 수조는 직경 1 mm 내외의 가는 모래로 15 cm의 높이로 채워졌고, 수조 밑바닥엔 저면여과기가 설치되었으며 시료가 잠입하여 생존할 수 있도록 환경을 조성하였다. 여과조는 직경 5 mm 내외의 모래로 20 cm로 채워 사용하였다.

(다) 공격 미생물 배양

공격 미생물로 선택된 종은 바지락이 대표적 세균성 질병인 *Vibrio tapetis*와 충남 태안산 바지락에서 분리된 미동정 원생동물 (Unidentified Manila clam Parasite, MPX) 을 사용하였다. *Vibrio tapetis* 는 TCBS agarose 배지에서 배양된 후 marine broth에서 대량 수확되었다. 이 때 배양 온도는 18°C였다. 원생동물의 경우 DMEM:Ham's F-12 (1:2)와 HEPES 50 mM, 3.5 mM sodium bicarbonate, 100 I.U./mL penicillin-streptomycin을 이용하여 제조하였다. 26°C에서 배양된 MPX의 직경은 약 2~3  $\mu\text{m}$ 로 구형의 영양체였다 (그림 3-1-13).

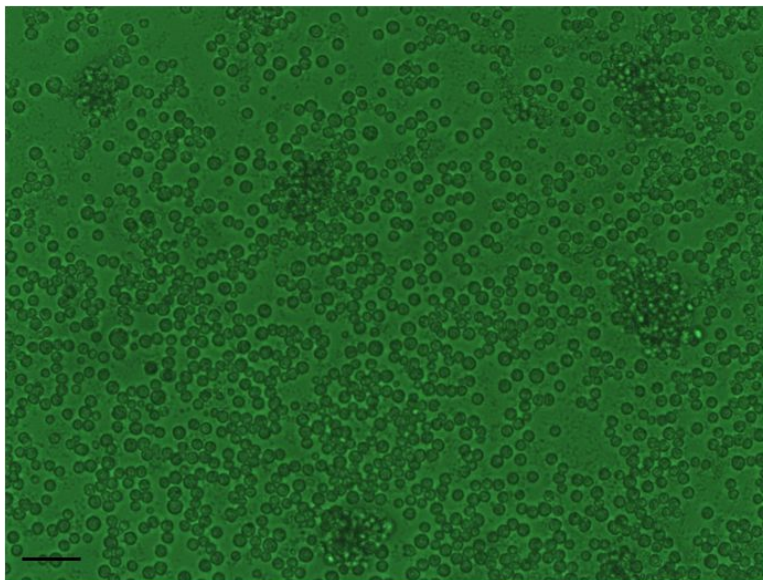


그림 3-1-13. 충남 태안 바지락에서 분리된 미동정 원생동물 영양체 (scale bar=10 $\mu\text{m}$ )

#### (라) 공격 미생물의 접종

*V. tapetis*는 OD 600 nm에서 0.1의 OD 값을 가질 때까지 여과 해수에 희석하였으며, 원생동물 (MPX)은 혈구계수판을 이용하여 100,000 cell/mL의 농도로 희석되었다. 공격 실험은 각 지역별 바지락마다 *V. tapetis* 감염구, 원생동물 감염구, 대조구로 나뉘었으며 대조구의 경우 아무런 조치를 하지 않았다. 실험에 이용된 바지락은 각 수조 당 20개체의 밀도로 조절되었으며, *V. tapetis*와 원생동물은 각각 100  $\mu$ L씩 바지락의 각정부를 주사기로 관통시켜 후폐각근에 주사하였다. 접종 후 5일간 사육하면서 폐사율을 조사하였다.

#### (마) DNA 손상도 정량

바지락을 각 지역으로부터 실험실로 옮겨 사육 후 2개월이 경과하였을 때 시료의 혈림프액을 1 mL 인슐린 주사기를 이용하여 각정부를 관통하여 추출하고 림프액 200  $\mu$ L를  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉각된 70% ethanol 500  $\mu$ L와 섞은 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 permeabilization시켰으며, 원심분리 (3,000 rpm, 5 min) 하여 상등액을 제거하고 침전물을 PBS 500  $\mu$ L를 첨가한 후 vortex하여 균질화 하였다. 여기에 200  $\mu$ L의 cell cycle reagent (Guava Cell Cycle Reagent)와 200  $\mu$ L의 PBS를 첨가하고 30분간 반응시킨 후, 유세포 분석기 (Guava EasyCyte Mini)의 Guava Cell Cycle Blue program을 이용하여 DNA 손상도를 측정하였다. DNA 손상도는 FSC/PM2 dot plot을 작성하고 이를 바탕으로 혈구집단만을 선택 (gating) 한 후 PM2/Count histogram을 이용하여 sub G0/G1 부분과 그 이외 부분을 정량함으로써 전체 혈구 중 sub G0/G1에 속한 혈구의 비를 계산하였다.

#### (바) Apoptosis, necrosis, 세포사망을 및 생존세포 정량

바지락 혈구의 apoptosis와 necrosis는 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen)을 이용하여 정량하였다. 이를 위하여 림프액 100  $\mu$ L를 채혈하고 동일량의 시약과 희석한 후 유세포 분석기 (Guava EasyCyte Mini)의 Guava Cell Cycle Blue program을 이용하여 분석하였다. 이때 5,000개의 세포를 FSC/SSC로 plotting 하고 혈구세포만을 선택 (gating) 하였으며, 이들을 다시 GRN-HLog/Red-HLog plot을 실시하여 FITC와 PI에 2중 염색된 상태에 따라 구분된 quadrat을 근거로 혈구의 apoptosis와 necrosis의 진행 정도와 비율을 정량하였다. 즉, 각각의 quadrat은 live cell (FITC negative and PI negative: lower left quadrat), early necrotic cell (PI positive and FITC negative: upper left quadrat), early apoptotic cell (FITC positive and PI negative: lower right quadrat), dead cell (FITC positive and PI positive: upper right quadrat) 등으로 구분하였다.

### (3) 연구 결과

#### (가) 패각 크기 및 습중량

본 연구에 사용된 바지락의 평균 각장, 각고, 각폭 및 습중량은 표 3-1-5에 나타내었다. 실험 대상 바지락 중 충남 홍성 바지락이 가장 대형으로 각장이 평균 37 mm였으며, 제주와 강진 바지락은 서로 유사한 크기로 32 mm 내외였다 (표 3-1-5). 습중량은 지역별 편차가 매우 커 홍성 바지락이 2.29 g 이었으며, 강진 바지락은 1.3 g, 제주 바지락은 0.98 g이었다.

표 3-1-4. 면역력 측정과 감염 실험에 사용된 바지락

Location	Shell Length (mm)	Shell width (mm)	Shell thickness (mm)	Tissue wet weight (g)
Jeju	31.94	22.23	13.15	0.98
Hongsung	37.17	26.44	17.75	2.29
Gangjin	32.81	23.56	15.44	1.30

#### (나) DNA 손상도

각 지역별 바지락의 DNA 손상도를 비교한 결과 제주>홍성>강진 바지락의 순서로 DNA 손상의 지역별 차이가 존재하는 것으로 나타났다 ( $p<0.05$ ). 제주 바지락의 경우 약 17% 내외의 DNA 손상도를 보였고, 홍성 바지락의 경우 약 14%의 손상도를 나타냈으나, 강진 바지락의 경우 DNA 손상도가 약 4%에 불과하였다 (그림 3-1-14). 이러한 결과는 강진 바지락이 유전독성에 의한 DNA 손상에 가장 안정적인 반응을 보임을 암시하였다.

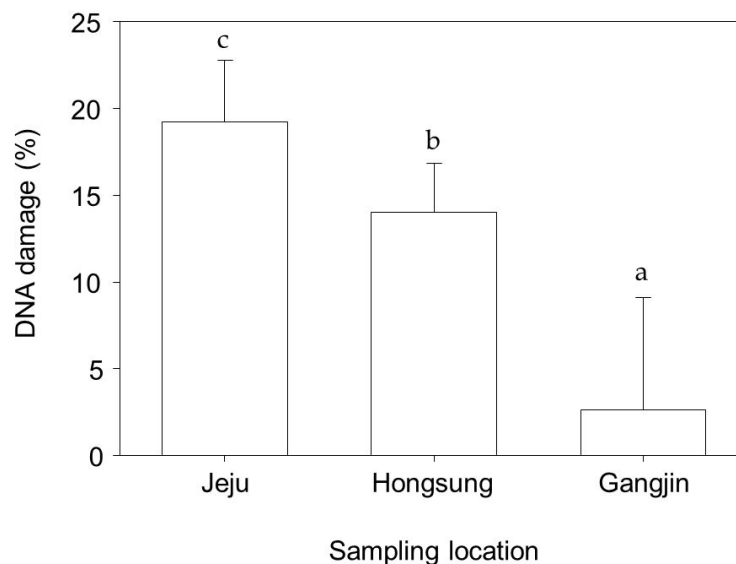


그림 3-1-14. 연구실에서 2개월 이상 적응된 제주, 홍성, 강진 바지락 혈구의 DNA 손상비교

(다) 세포자살(apoptosis)과 괴사(necrosis)

지역별 바지락 혈구세포의 자살세포와 괴사세포를 확인하기 위하여 FITC와 PI로 이중 염색한 결과 세포자살의 경우 지역별 차이가 확인되지 않았으나 염증세포의 비율은 제주 바지락에서 유의하게 높음이 확인되었고 강진 바지락이 가장 낮게 나타났다. 또한 세포자살이나 염증에 의해 사망한 혈구세포의 비율도 제주 바지락이 홍성이나 강진 바지락에 비하여 유의하게 높은 것으로 조사되었다 (그림 3-1-15). 따라서 본 연구결과 강진 바지락이 생존혈구세포의 비율이 제주나 홍성 바지락에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났다.

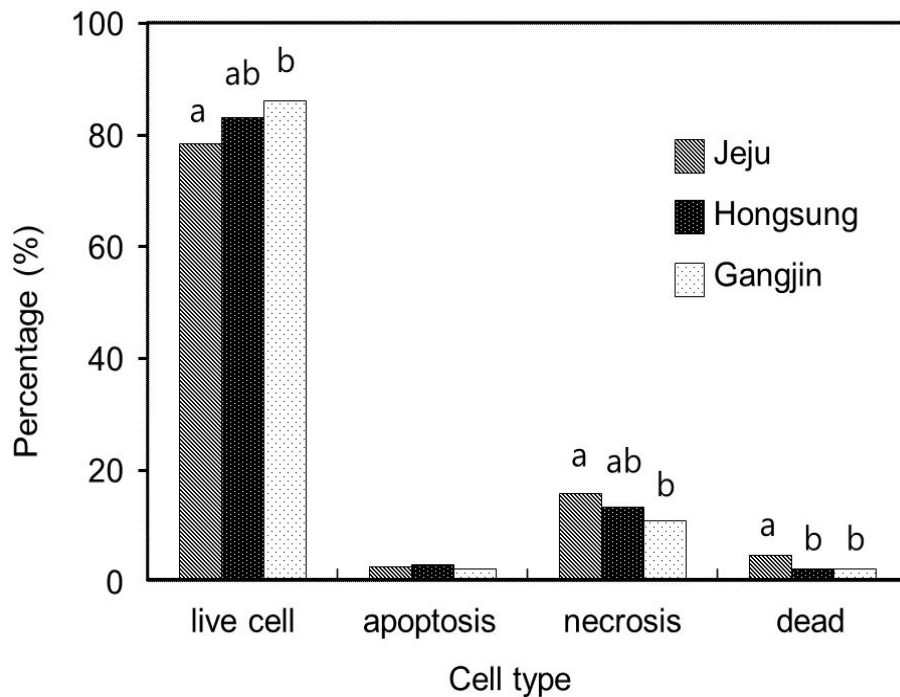


그림 3-1-15. 연구실에서 2개월 이상 적응된 제주, 홍성, 강진 바지락 혈구의 세포자살율과 세포괴사율 비교

(라) 폐사율 (mortality rate)

제주와 홍성, 강진 바지락 각각 10개체에 *V. tapetis*와 MPX를 각각 접종하고 5일 동안 사망률을 관찰한 결과 제주바지락은 각각 50%를 나타내었으나 홍성 바지락은 20%를 나타내었다. 그러나 강진 바지락의 경우엔 조사기간 중 폐사한 개체가 전혀 나타나지 않았다 (그림 3-1-16).

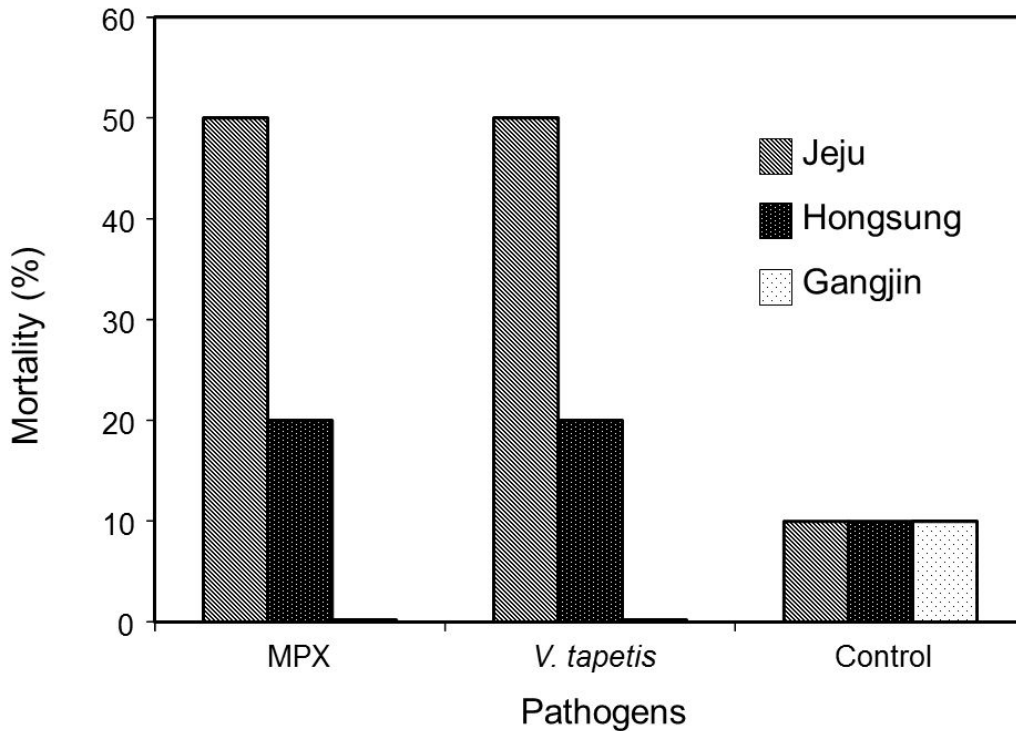


그림 3-1-16. MPX 와 *V. tapetis*에 접종된 바지락의 폐사율 비교

(4) 결론

충남 홍성, 전남 강진 및 제주 외도에서 채집된 바지락을 실험실로 옮겨 2개월 이상 순치시킨 후 이들의 면역력과 공격실험을 실시한 결과 강진 바지락이 면역력이 높았고 폐사율이 낮게 나타났다. 이러한 결과는 강진 바지락이 타 지역 바지락에 비해 생리적으로 우수한 형질을 갖추고 있다고 판단된다. 따라서 보다 집중적인 바지락 유전형질에 대한 조사와 이를 바탕으로 한 바지락의 각종 생리적 반응 비교 연구를 통하여 성장이 빠르고 질병에 우수한 형질을 갖춘 바지락 집단의 개발이 필요할 것으로 사료된다. 그러나 최근 10 여 년 전부터 자연산 치패 발생이 전국적으로 극히 저조한 상황이 이어지고 있으며 이에 따라 일부 지역에서 생산되는 치패가 전국적으로 유통되거나 또는 중국산 치패의 대량 유입으로 우리나라 바지락 유전자원의 단순화와 오염이 가시화 되고 있는 현실이다. 따라서 생물종 보존 차원에서 이를 해소할 다양한 시도가 필요할 것으로 판단된다.



### 3. 건강한 바지락 모패 확보를 위한 바지락의 유전학적 특성 분석

#### 3-1. 바지락 집단 구별을 위한 microsatellite marker 개발

##### 가. 연구목적

Microsatellite는 nuclear genome상에 1-6개의 염기서열이 반복적으로 높은 빈도수로 존재한다. 이 서열을 이용한 molecular marker는 높은 재연성, 공우성 유전, 높은 다양성, PCR 방법을 이용한 간단한 검출법으로 생물체의 집단 유전학, 친자감별과 유전자 지도작성에 이용되고 있다. 분자 marker의 하나인 microsatellite marker는 enriched genomic DNA library로부터 발굴되어지고 있으나, 최근에는 genomic DNA library외에도 핵내 단백질로 발현되는 유전자의 주형인 RNA를 이용하여 제작된 cDNA library로부터 대량의 염기서열 분석을 통해 획득된 ESTs (Expressed sequence tags)에서도 새로운 EST-유래 microsatellite marker가 일부 해산 이매패류인 참굴 *Crassostrea gigas* (Yu and Li, 2008; Yu et al., 2010), 버지니아 굴 *Crassostrea virginia* (Carlsson and Reece, 2007), 날개조개 *Hyriopsis cumingii* (Bai et al., 2009), 홍합 *Mytilus coruscus* (Xu et al., 2010)과 해만가리비 *Argopecten irradians* (Zhan et al., 2005)에서 개발되어지고 있다. 따라서, 우리나라 바지락 집단의 유전학적 특성을 효율적으로 규명하기 위해 이번 연구에서는 바지락 혈구 EST data에서 유래된 microsatellite marker를 개발하고, 이를 이용한 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 집단 및 개체 구별을 위한 molecular marker로서의 이용가능성을 분석하였다.

##### 나. 실험방법

Microsatellite screening, primer 제작 및 PCR 반응: Microsatellite marker를 개발하기 위하여 2006년 *Perkinsus olseni* (바지락포자충)을 감염시킨 우리나라 바지락의 혈구 (hemocyte) cDNA library에서 대량염기서열 결정된 1872개의 EST (Expressed sequence tag) 데이터를 이용하였다 (Kang et al., 2006). Microsatellite motif를 검색하기 위하여 염기서열이 결정된 EST clone을 이용하여 trimming과 assembly 과정을 실시하였다. Assembly가 끝난 1128개의 unique gene을 websat, SSRIT와 TRF 소프트웨어를 이용하여 microsatellite motif를 검색하였다. Microsatellite motif는 5개 이상의 반복서열을 갖고 있는 19개의 EST clone에 대한 microsatellite primer를 제작하고, 제작된 primer의 민감도는 4개체의 바지락 adductor muscle로부터 추출한 genomic DNA를 이용하여 gradient PCR (45-55°C)반응을 실시하고 증폭된 산물을 2% agarose gel 전기영동을 수행하여 제작된 microsatellite marker의 최적 annealing temperature와 증폭산물을 확인하였다 (그림 3-1-17).



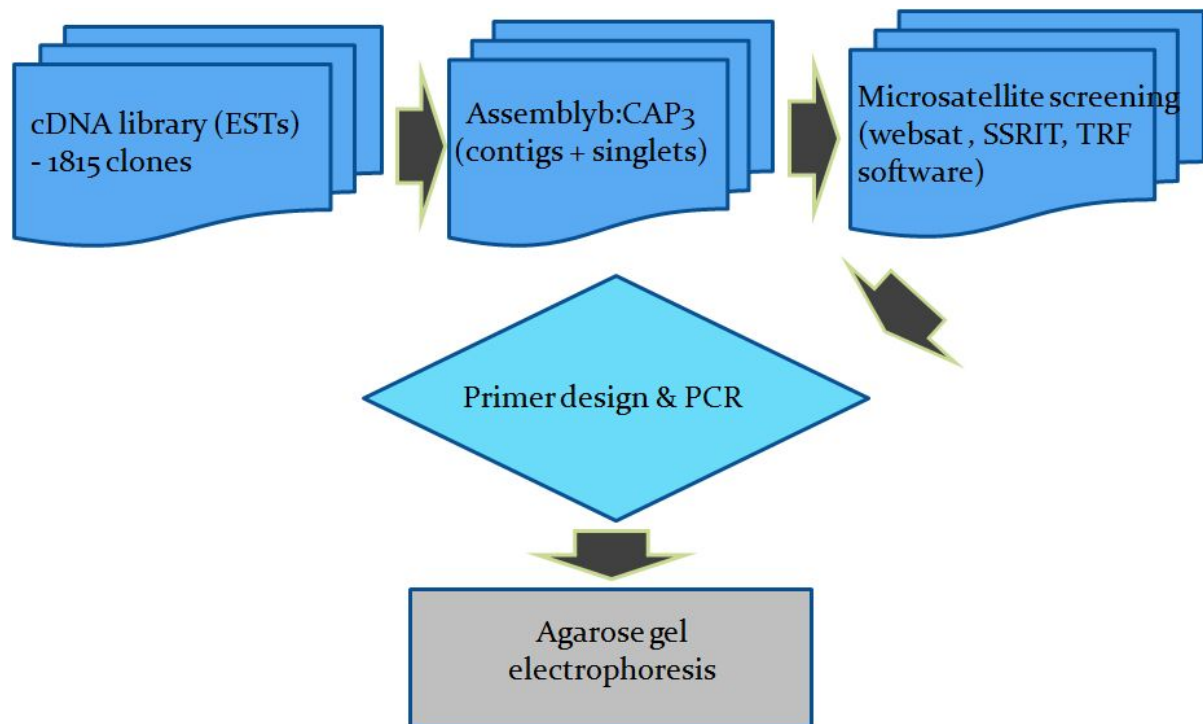


그림 3-1-17. cDNA library data를 이용한 microsatellite marker screening, primer 제작 및 PCR 반응

Microsatellite marker를 이용한 바지락 개체군내 allele의 다양성 확인: 제주도 (성산, 서귀)와 서해안 (황도)에서 채집한 15개체 바지락의 adductor muscle로부터 DNeasy tissue kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 total DNA를 분리하고 spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정하고 genotyping을 위한 주형으로 사용하였다. Microsatellite marker는 19개중 PCR 증폭이 확인된 11개의 primer sets를 사용하였고, forward primer는 5'-end에 FAM으로 표지하였다. PCR 반응액 총 20  $\mu$ L에 100 ng/ $\mu$ L 또는 50 ng/ $\mu$ L의 total genomic DNA, 10  $\mu$ M의 forward (5'-FAM 표지)와 reverse primer, 2.5 mM dNTP, 10X buffer, 1U의 FR-Tag (Biomedic Inc.)을 준비하였다. 준비된 반응액은 다음과 같은 반응조건으로 PCR 반응을 실시하였다. Pre-denaturation은 95°C에서 5분, denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 54 또는 52°C에서 30초, extension은 72°C에서 25초를 35회 반복하고, final extension은 72°C에서 5분간 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 3% Metaphore agarose gel 전기영동을 수행하여 증폭된 산물의 크기를 확인하였고, 각 marker별 바지락 개체내 microsatellite loci의 polymorphism은 ABI PRISM 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems)의 microsatellite genotyping mode에서 size marker인 GeneScan™ 500 LIZ-Size Standard (Applied Biosystems)를 사용하였다. 증폭된 microsatellite marker별 대립유전자의 크기와 수는 Genescan과 genepop (Applied Biosystems)으로 분석하였다. 분석된 marker의 바지락의 개체별 또는 집단별의 대립유전자를 정리하여  $H_o$  (observed heterozygosity),  $H_E$  (expected heterozygosity)을

계산하였다.

## 다. 결과

본 연구팀은 2006년 *Perkinsus olseni*을 감염시킨 우리나라 바지락 혈구 cDNA library를 제작하였으며, 무작위로 선택한 약 2000개의 clone중 1872개 clone에 염기서열을 결정하고 벡터 서열 및 애매모호한 염기서열을 포함하고 있는 clone들을 제거하여 총 1815개의 clone을 획득하였다. 상기의 EST data를 이용하여 유전자 상동성 검색 및 microsatellite 검색을 위하여 염기서열내 overlapping fragment sequence를 assembly 과정을 거쳐 1128개의 unique gene (251개의 contig와 877개의 singleton)을 확보하였다 (표 3-1-6).

표 3-1-5. 바지락 (*R. philippinarum*) hemocyte cDNA library 클론 분석

No. EST clones (sequencing completed)	1872
No. EST clones (after trimming process)	1815
Assembly contigs	251 (938 ESTs)
singlets	877
Redundancy*	51.6%

\* Redundancy= No. of ESTs in contigs/Total EST clones

1128개의 unique gene내 microsatellite repeat motif를 websat, SSRIT와 TRF 소프트웨어를 이용하여 repeat motif가 5개 이상 반복되어있는 후보 gene을 검색시 SSRIT 프로그램을 제외하고 websat에서 90.1% (228/253), TRF에서는 61.5% (24/39)가 mononucleotide repeats (A/T/G/C)가 가장 높은 비율을 차지하며, dinucleotide repeats (CA/CT/TG/TA/AT/CG)는 websat에서는 0.05% (13/253), SSRIT에서는 54.2% (19/35)를 나타내었다. 이외에도 trinucleotide (ACT/TAT/TCA/TGT/AAT/AGA/TTG), tetranucleotide (CAAT/AAAT/TCAA/TGTT), decanucleotide ( $T_3CTAT_3CGTA_2/TGT_3CTATGA/CA_3T_2GT_2C_3TAT_2$ )와 compound repeat ( $CCA_2GCT_2G_4$ )가 확인되었다 (표 3-1-7).

Microsatellite 검색 프로그램을 이용하여 예측된 다양한 microsatellite repeate를 갖는 유전자중 mononucleotide를 제외한 반복염기서열 motif가 5번 이상 반복되는 19개의 EST clone에서 반복 서열이 포함되도록 PCR primer pair (forward and reverse primer)을 디자인 하여 (주)바이오니아에 의뢰하여 제작하였다. 제작된 19개의 EST- microsatellite marker set를

바지락 adductor muscle로부터 추출한 total genomic DNA를 이용하여 PCR 반응을 수행하여 primer의 최적 증폭온도 (annealing temperature)와 증폭산물의 크기를 확인하였다. 그 결과, 19개의 primer set중 11개의 marker set가 최적 증폭온도 52 또는 54°C에서 예상되는 산물의 크기가 증폭됨을 확인하였으며, 나머지 8개의 microsatellite marker set에서는 증폭이 일어나지 않거나 비특이적 증폭산물이 관찰되었다 (표 3-1-8). 따라서, PCR 증폭 산물이 확인된 11개의 microsatellite marker를 바지락 집단의 유전학적 특성 분석에 사용하기로 결정하였다.

11개의 EST-marker sets를 이용하여 15개체의 바지락 (성산, 서귀, 황해)에서 추출한 total genomic DNA를 이용하여 각 marker별 genotyping을 실시하였다. 각각의 marker는 agarose gel 전기영동시 single 또는 multiple band가 관찰되며 (그림 3-1-18), allele의 수는 3-11개로 다양하게 나타나며 locus당 평균 6.5개의 allele를 갖고 있으며, observed heterozygosity와 expected heterozygosity는 각각 0.0667~0.7692와 0.3571~0.8843로 나타났다 (표 3-1-9). 또한, KR1, KR6, KR11, KR12, KR14, KR17 과 KR 19 marker의 경우 PCR 산물이 증폭되지 않는 null allele이 관찰되었다. Null allele의 생성은 이미 다른 해산 이매패류의 microsatellite marker에서 빈번하게 관찰되는 현상이다 (Carlsson and Reece, 2007; Xu et al., 2010; Yu and Li, 2008). 따라서, 이번 연구로 바지락 혈구의 발현 유전자에서 유래된 microsatellite marker를 최초로 개발하였으며, 이들 marker는 바지락 개체내 높은 이형성이 관찰됨으로 앞으로 우리나라 바지락 집단의 유전적 다양성 평가 또는 유전 육종 프로그램에 유용한 도구로 사용될 것이다.

표 3-1-6. Microsatellite 검색 프로그램을 이용하여 검색된 바지락 (*R. philippinarum*) EST clone내 repeat motif 형태

Tool	Type	Mono	Di	Tri	Tetra	Penta	<Deca	Compound
Websat	Contigs	77	3	4	1	-	-	-
	Singlets	151	10	4	3	-	-	-
SSRIT	Contigs	-	10	6	2	-	-	-
	Singlets	-	9	4	4	-	-	-
TRF	Contigs	12	-	-	2	-	2	2
	Singlets	12	-	2	5	-	1	-

표 3-1-7. Microsatellite 분석에 사용된 EST clones, repeat motif, PCR 예상 크기 및 증폭결과

Primers	clones	Repeat motif	Expected amplicon size(bp)	PCR amplified (yes/no)
KMC1	Contig62	(CA)6	310	Yes
KMC2	Contig167	(AGA)6	340	Yes
KMC3	Contig221	(TTG)7	367	No
KMC4	Contig106	(TGTT)10	338	No
KMC5	Contig3	(CCA)2(GCT)2(G)4	282	No
KMC6	Contig165	(CA)6	206	Yes
KMC7	Contig82	(TTTC)1A(TTTC)G(TA)2	347	Yes
KMC8	Contig161	(CGCCCATC)6	263	No
KMC9	04-R-C19	(CA)6	119	Yes
KMC10	04-R-N02	(TG)6	393	No
KMC11	02-R-C01	(TA)6	108	Yes
KMC12	05-R-H16	(CA)7	217	Yes
KMC13	06-R-H06	(CA)5	336	No
KMC14	02-R-L07	(ACT)6	318	Yes
KMC15	05-R-C15	(TCA)7	343	Yes
KMC16	05-R-A09	(CTTT)5	226	No
KMC17	06-R-M24	(TCA)6	296	Yes
KMC18	02-RH21	(CAAT)6	206	No
KMC19	02-RO24	(TCAA)8	177	Yes

표 3-1-8. EST-microsatellite marker를 이용한 바지락 (*R. philippinarum*)의 microsatellite locus의 다형성 분석

Locus	motif	Primer(5'-3')	Tm (°C)	No. of alleles	Size range (bp)	H <sub>o</sub>	H <sub>E</sub>
KCM1	(CA)6	F:TAGCAACGGATTTTCCTAATGC R:TTTCACGTAAGTAAGCAAACGC	54	3	307-311	0.2857	0.3571
KCM2	(AGA)6	F:TTCAATCGGGAAGGTTCTG R:TATCGGGTTATCGTACCCAAA	54	10	310-340	0.7692	0.8333
KCM6	(CA)6	F:ACGGATCTTCCCGAATCGCAGTTA R:GGCAATTGTGCATGTTTCCTAAACC	54	7	188-239	0.4667	0.7756
KCM7	(TTTC)1A(TTTC)G(TA)2	F:GCTTAGGCTCGGAGATTTGCTAAG R:ACGACCAGAATCATAGACGC	52	4	338-350	0.4667	0.6067
KCM9	(CA)6	F:CAAAACAAAACACACTAGCGCA R:TTAAAACCTGGGGTAAATCTCGC	54	6	95-119	0.5333	0.7556
KCM11	(TA)6	F:CCATTTTCGTTGCTTTGTCACT R:TTAAATATGTCTCGCGTTGTG	54	6	100-121	0.2667	0.5511
KCM12	(CA)7	F:AACACACACACAAAACACCTCTG R:TGCACTAAACGACCATACACG	54	4	211-257	0.0667	0.3889
KCM14	(ACT)6	F:GCACGAGGATCATTACAGG R:CAAATGTCTGTTTCATCACTCACAG	54	7	292-317	0.4000	0.7444
KCM15	(TCA)7	F:AATTATCCTATCAAGGCACCCA R:GGAACAACCTTTGTATGGAGAC	54	5	332-344	0.6667	0.7044
KCM17	(TCA)6	F:GCACGAGGCTTCATCATCATC R:ACCCAAAACCTTACAATAGCCATCATT	52	11	276-316	0.2727	0.8843
KCM19	(TCAA)8	F:GCATTCGTTACGACAGCAT R:GGTTGAAATTCGTTGTTTGGTTGG	54	8	163-211	0.7692	0.7456

Tm: annealing temperature of primers for PCR, H<sub>o</sub>: observed heterozygosity, H<sub>E</sub>: expected heterozygosity



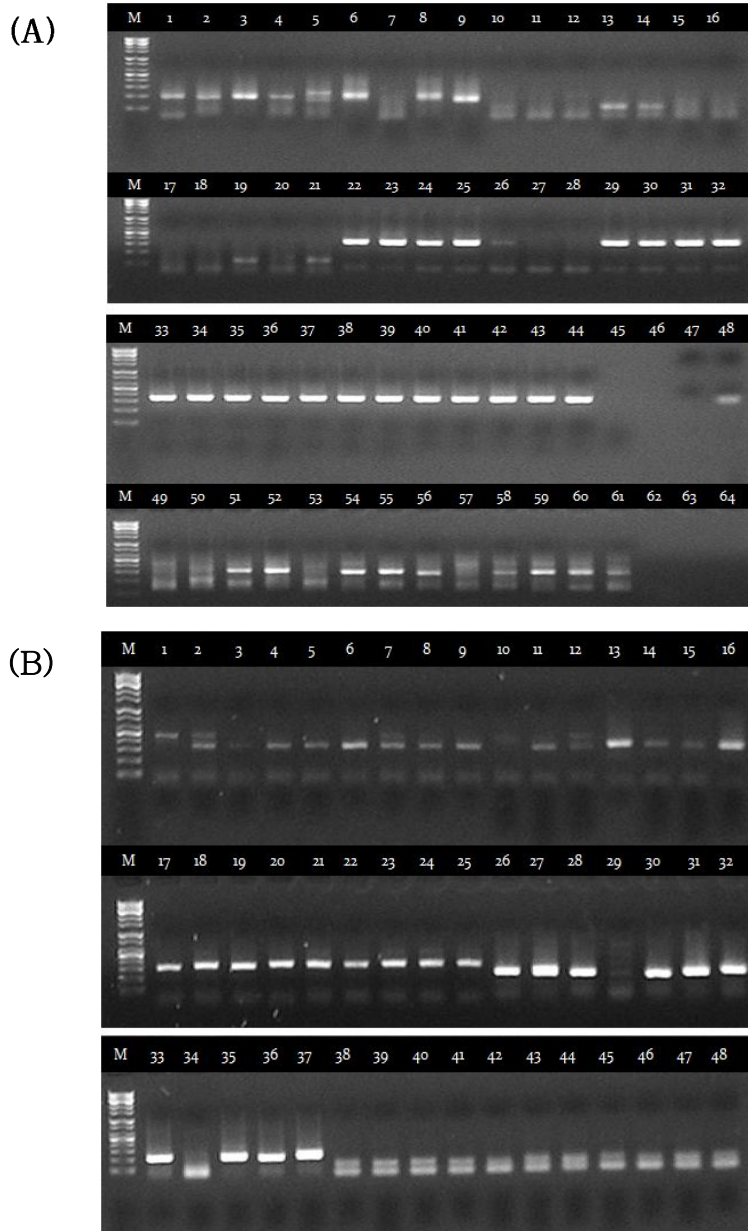


그림 3-1-18. EST-microsatellite primer set을 이용하여 증폭된 바지락 15개체의 PCR 산물의 3% Metaphore agarose gel 전기영동. (A)1~9; KCM12, 10~21; KCM19, 22~32; KCM15, 33~44; KCM7, 45~56; KCM17, (B)1~12; KCM1, 13~25; KCM2, 26~37; KCM6, 38~48; KCM9, M: 100bp marker

### 3-2. Microsatellite marker를 이용한 우리나라 바지락과 외국 바지락 집단과의 유전학적 특성 규명

#### 가. 연구목적

Microsatellite는 세대 당  $10^{-4}$  이상의 높은 돌연변이율을 갖고 있어 집단에 따라 높은 이형성을 가지고 있다. 이런 특성은 집단내에서 뿐만 아니라 개체수준에서 다형성과 공유성을 나타내게 되어 인간을 비롯한 동물, 식물, 박테리아 등의 유전적 다양성 정보 및 유전자 지도 작성에 유용하게 사용되어지고 있다. 이에 2차년도에 개발된 발현유전체 유래 microsatellite marker를 이용하여 국내 바지락 집단과 외국 바지락 집단 간의 유전적 특성 분석을 분석하고, 유연관계를 분석하여 우리나라 바지락의 종 보존과 종묘 생산에 있어 기초자료로 활용하기 위하여 실시하였다.

#### 나. 실험방법

Microsatellite marker를 이용한 우리나라 바지락과 외국바지락 집단과의 유전학적 다양성 분석: 2009년 우리나라 바지락과 외국 바지락 집단과의 유전학적 특성 분석을 위해 우리나라 8지역 (황도, 보령, 곰소, 거제, 임원, 성산, 서귀, 외도), 중국 2지역 (Xiamen, Yentai), 일본 (Kanazawa-ku)과 홍콩에서 채집된 각 10개체의 바지락 패각근으로부터 total DNA를 추출하여 microsatellite genotyping을 위한 주형으로 사용하였다. Microsatellite marker는 11개의 marker중 이형성 (polymorphism)이 높게 관찰된 KCM2, KCM6, KCM14, KCM17, KCM19 primer set을 사용하였다. Forward primer는 5'-end에 FAM으로 표지하였다. PCR 반응액은 총 20  $\mu$ L에 100 ng/ $\mu$ L 또는 50 ng/ $\mu$ L의 total genomic DNA, 10  $\mu$ M의 forward (5'-FAM 표지)와 reverse primer, 2.5 mM dNTP, 10X buffer, 1U의 FR-Tag (Biomedic Inc.)을 준비하였다. 준비된 반응액은 다음과 같은 반응조건으로 PCR 반응을 실시하였다. Pre-denaturation은 95°C에서 5분, denaturation은 95°C에서 30초, annealing은 54 또는 52°C에서 30초, extension은 72°C에서 25초의 조건을 35회 반복하고, final extension은 72°C에서 5분간 실시하여 반응을 종결하였다. 증폭된 산물은 3% Metaphore agarose gel 전기영동과 각 marker 별 microsatellite loci의 polymorphism은 ABI PRISM 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems)의 microsatellite genotyping mode에서 size marker인 GeneScan™ 500 LIZ-Size Standard (Applied Biosystems)를 사용하였다. 증폭된 microsatellite marker별 대립유전자의 크기와 수는 Genescan과 genepop (Applied Biosystems)으로 분석하였다. 분석된 marker의 바지락의 개체별 또는 집단별의 대립유전자를 정리하여  $H_o$  (observed heterozygosity),  $H_E$  (expected heterozygosity)와 PIC (polymorphism informative content)를 관찰하고, 이들의 정보를 이용한 집단간의 유전학적 거리를 분석하였다.

## 다. 결과

우리나라 바지락 집단과 외국바지락 집단간의 유전학적 특성을 이형성이 높게 관찰된 5개의 marker를 이용하여 분석하였다. 그 결과, allele의 수는 21~31개, 관찰되는 이형접합체 (observed heterozygosity)는 0.4483~0.7609, 예측되는 이형접합체 (expected heterozygosity)가 0.8171~0.9366의 범위로 관찰되었다 (표 3-1-10). 또한, 다형성정보량 (PIC)은 5개의 locus중 KR17 marker가 0.9429로 가장 높게 관찰되었다. 우리나라 바지락과 외국바지락 집단 간의 유전적 유연관계를 알아보기 위하여 각 marker의 대립유전자 빈도를 산출하여 유전적 거리를 분석하였다 (그림 3-1-19). 그 결과, 제주도 바지락 집단인 성산 (SS)과 서귀 (SG)의 경우 유전적으로 가장 가까운 단계통군 (0.1259)을 형성하였고, 우리나라 보령지역의 바지락 집단과 중국의 서먼 지역 바지락 집단이 유전적으로 가까운 유연관계를 나타냈다. 또한, 제주도 지역의 외도 바지락과 홍콩 바지락이 유전적으로 가까운 유연관계 (0.0326)를 보였다. 특히, 외도 바지락은 이번 과제에서 실시한 바지락과 아기바지락의 형태와 유전학적 분석시에 이용된 시료로 바지락과는 구별되는 *Ruditapes*속의 다른 종임을 확인하였다. 또한, 홍콩바지락의 패각 내부내 외투막 만입정도를 비교시 만입정도가 바지락보다 작은 아기바지락의 특징을 갖고 있음이 확인되어 이번 연구에 이용된 5개의 microsatellite marker는 cross-species amplification을 통한 종 구별에도 유용함을 확인할 수 있었다. 따라서, 이형성이 높게 관찰된 5개의 EST-유래 microsatellite marker를 이용한 바지락 집단간의 유전학적 특성 분석은 우리나라 바지락과 중국바지락 집단내의 유전적 유연관계 및 *Ruditapes*속의 아기바지락과의 집단 구별에도 유용하게 이용될 것이다.

표 3-1-9. 우리나라 바지락과 외국바지락 집단간의 5 microsatellite marker의 특성 비교

Markers	Size range (bp)	No. of alleles	Ho	He	PIC
KR2	309-346	23	0.4719	0.9366	0.93331
KR6	184-255	31	0.4906	0.8171	0.8095
KR14	282-324	21	0.4483	0.8862	0.8768
KR17	267-329	31	0.4800	0.9454	0.9429
KR19	152-227	31	0.7609	0.9409	0.9000

Ho: observed heterozygosity, He: expected heterozygosity, PIC: polymorphic information content

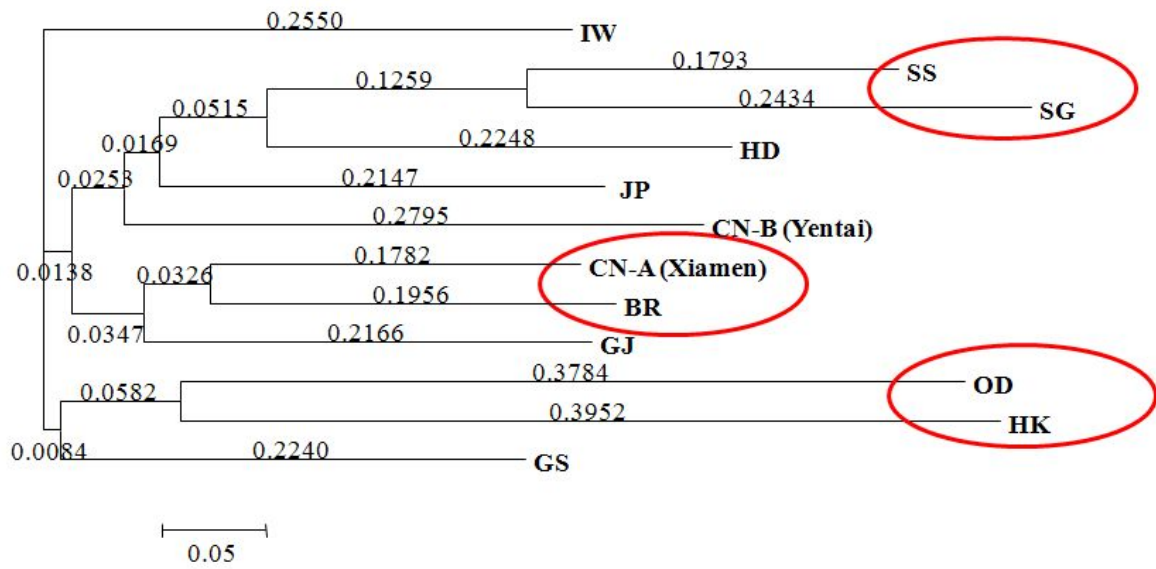


그림 3-1-19. 우리나라바지락과 외국 바지락 집단과의 유전학적 거리 분석



### 3-3. 바지락과 아기바지락의 형태 및 유전학적 특성 비교

#### 가. 연구목적

우리나라 바지락의 번식량, 산란 주기 및 질병 감염에 대한 연구를 실시한 결과, 제주도 연안에 서식하는 바지락 집단이 두 종의 바지락인 바지락 (*R. philippinarum*)과 아기바지락 (*R. variegatus*)이 서식하는 것으로 확인되었다. 현재까지 아기바지락과 바지락에 관한 연구는 외형적인 형태에 관한 일부의 문헌보고가 이루어져있고, 이들의 유전적 특성 분석에 관한 연구는 보고되어 있지 않다. 또한, 이매패류는 서식지, 먹이, 물리적 인자들에 따라 형태학적 특성이 매우 다양하게 보고되고 있어 동종임에도 불구하고 여러개의 이명 (synonym)으로 보고되고 있다 (Keen 1969; fisher-Piette and Vukadinovic 1977). 따라서, 제주도 연안에 서식하는 바지락과 아기바지락의 높은 유전학적 보존성과 유전적 다양성을 보이는 3종의 nuclear gene (small subunit ribosomal DNA; 18S rDNA, histone 3; H3, internal transcribed spacer: ITS)과 모계유전을 통해 전달되는 미토콘드리아는 nuclear DNA보다 빠른 진화속도와 높은 염기서열 변이가 관찰되는 mitochondrial gene (cytochrome oxidase I; COI)을 클로닝하여 염기서열을 밝히고, 밝혀진 유전자의 염기서열내 계통분류학적 유연관계를 Veneroid family의 이매패류들의 유전자들과 비교·분석하였다.

#### 나. 실험방법

제주도 연안에 서식하는 바지락 개체군인 바지락과 아기바지락의 유전학적 특성을 규명하기 위하여 2009년 6월 2일부터 6월 29일 사이에 성산과 서귀 (바지락), 외도와 금능 (아기바지락)에서 채집을 실시하였다. 성산과 서귀 바지락은 사질의 바닥에 서식하고 있는 반면, 외도와 금능의 바지락은 자갈밭 아래에 서식하고 있다. 각 지역별로 30마리의 바지락 채집 후, 신선하게 보존하여 실험실로 옮겨와 패각의 길이, 무게를 측정하고 육질을 패각으로 제거하여 유전학적 특성분석에 이용하고, 패각은 건조하여 형태학적 특성 분석에 사용하였다.

실험에 쓰인 바지락과 아기바지락은 20 mg의 패각근으로부터 total genomic DNA를 DNeasy tissue kit의 방법에 따라 추출하였다. PCR 분석에 사용된 3종의 nuclear gene과 1종의 mitochondrial gene에 대한 primer는 GenBank에 등록되어있는 이매패류의 18S rDNA, ITS, H3와 COI 유전자를 이용하여 multiple alignment를 수행하여 잘 보존되어 있는 영역의 염기서열을 이용하여 표 3-1-11과 같이 제작하였다.

Thermal cycler TP 600 (Takarka Co.)를 이용하여 다음의 반응조건으로 PCR 반응을 실행하였다. Early denaturation은 94°C에서 5분, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 48~55°C (표 3-1-11 참조)에서 30초, extension은 72°C에서 25초~1분 50초 30회 반복하고, 최

중 DNA extension은 72°C에서 5분간 시행하였다. PCR 산물은 ethidium bromide가 첨가된 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 증폭된 band를 확인하였다. 증폭된 산물은 pGEM T-easy system kit를 사용하여 클로닝을 수행하여 plasmid DNA를 분리하였다. 클로닝된 유전자의 염기서열은 ABI PRISM Big dye terminator cycle sequencing ready reaction kit와 ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다. 염기서열 분석된 각 유전자는 GenBank의 BLAST 프로그램을 이용하여 유전자 상동성을 검색하고, CLUSTAL W 또는 X 프로그램을 통해 염기서열을 현재까지 보고되어 있는 이매패류의 유전자들과 multiple alignment를 수행하였다. 이를 MEGA software를 이용하여 sequence divergence 측정을 위해 dataset를 구축하고, kimura 2 parameter에 의한 sequence similarity와 neighbor joining method를 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

표 3-1-10. PCR 반응에 사용한 각 유전자 primer 목록 및 annealing temperature

Gene	Oligonucleotides (5'-3')	Annealing temp. (°C)/size
18S rDNA	F: 5'-CCTACCTGGTTGARCCTGCCAGTA-3' R:5'-TAATGATCCTTCCGCAGGTTCCACC-3'	55/1800bp
ITS	F:5'-GTCGTAACAAGGTATCCGTAGGTG-3' R:5'-GTTTCTTTTCCCTCCGCTTACTGA-3'	52/1200bp
H3	F:5'-ATGGCTCGTACMAAGCAGACYGC-3' R:5'-TTAAGCMCGTTCTCCACGGATTC-3'	55/410bp
COI	F:5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' R:5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	48 or 50/700bp

#### 다. 결과

제주도에 서식하는 바지락과 아기바지락의 서식지를 관찰한 결과 서귀와 성산에 서식하는 바지락은 사질 또는 굽은 자갈이 혼합되어 있는 저질의 조간대에 서식하는 반면, 외도와 금능에 서식하는 아기바지락은 사질이 거의 없는 굽은 자갈 또는 암반성 조간대에 서식하고 있었다 (그림 3-1-20). 채집된 두 바지락 개체군의 형태학적 특징을 분석한 결과, 패각의 외부와 내부의 색과 패각의 무늬 형태는 매우 다양하게 관찰되었다. 패각의 전장 (shell length, SL), 패각의 높이 (shell height, SH)와 패각의 두께 (Shell thickness, ST), 패각의 전장에 대한 패각의 높이와 두께의 비 (SH/SL, ST/SL)에서는 바지락과 아기바지락 사이에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았으나, 바지락과 아기바지락의 외투막 만입의 길이 (distance of pallial sinus, PD), 전장에 대한 외투막 만입의 비 (PD/SL)가 바지락이 아기바지락보다 유의하게 길게 만입되었음이 관찰되었다 (표 3-1-12,  $p < 0.05$ ). 따라서, 외투막 만입 정도가 바지락과 아기바지락을 구별하는 중요한 형태 분류 key로 이용될 것이다.

형태학적 특징 분석과 더불어 두 종의 바지락으로부터 4종의 유전자 (18S rDNA, ITS, H3, COI)의 완전한 염기서열을 클로닝 과정을 거쳐 분석하고, 이들로부터 결정된 48개의 유전자 서열을 유전자는 행 (GenBank)에 상기의 코드번호 JN807338~JN807385로 등록하였다. 바지락과 아기바지락에서 분석된

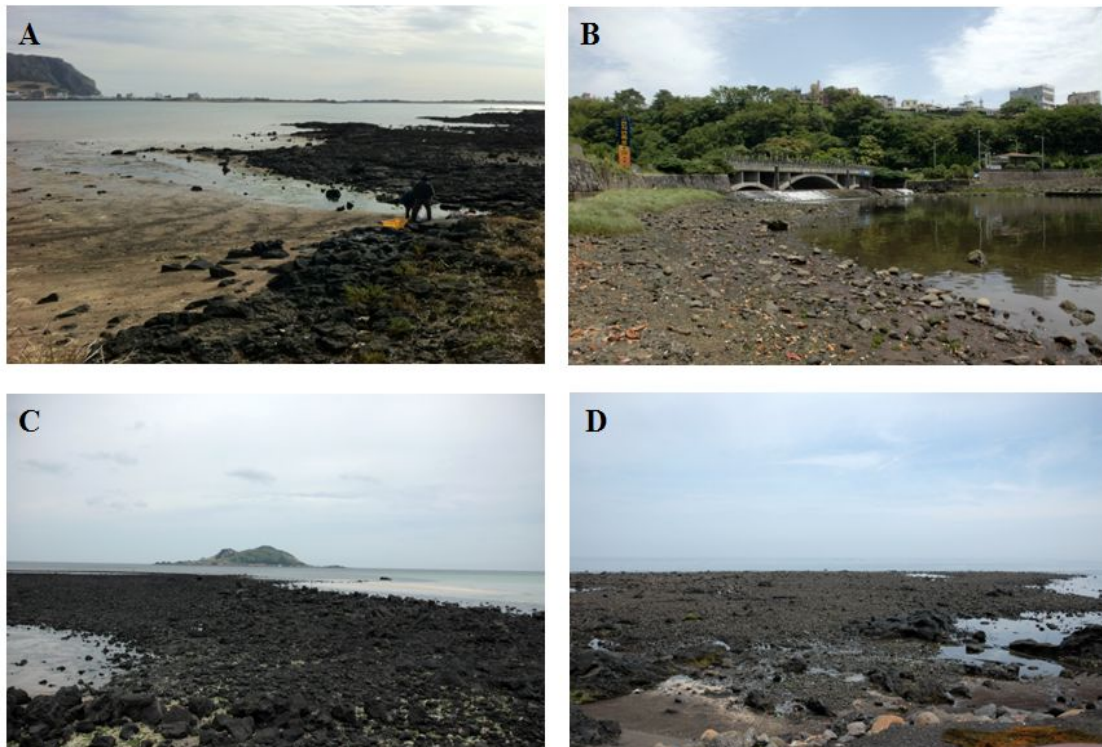


그림 3-1-20. 바지락과 아기바지락의 서식지 (A) 성산, (B) 서귀, (C) 금능, (D) 외도

표 3-1-11. 바지락 (*R. philippinarum*)과 아기바지락 (*R. variegatus*)의 형태학적 특성 비교

Location	Sample size	SL (mm)	SH (mm)	ST (mm)	SH/SL	ST/SL	PD (mm)	PD/SL
<b><i>R. philippinarum</i></b>								
Sungsan	30	37.9 (29.8-50)	26.9 (20.1-35.4)	18.6 (14-24.5)	0.7 (0.7-0.8)	0.5 (0.5-0.6)	2 (1.5-2.5)	0.48 (0.43-0.51)
	<i>P</i> -value	<0.05 <sup>a</sup>	<0.05 <sup>a</sup>	<0.05 <sup>a</sup>	<0.05 <sup>a</sup>	<0.05 <sup>a</sup>	<0.05 <sup>a</sup>	<0.05 <sup>a</sup>
Seogwipo	30	33.3 (29.7-40.2)	22.7 (19.9-27.4)	15 (12.3-18.6)	0.7 (0.6-0.8)	0.5 (0.4-0.5)	1.8 (1.5-2.2)	0.48 (0.47-0.54)
	<i>P</i> -value	<0.05 <sup>b</sup>	<0.05 <sup>b</sup>	<0.05 <sup>b</sup>	<0.05 <sup>b</sup>	<0.05 <sup>b</sup>	<0.05 <sup>a</sup>	<0.05 <sup>a</sup>
<b><i>R. variegatus</i></b>								
Oeido	28	22.5 (19-26.4)	14.6 (12.4-16.5)	8.3 (6.5-10.3)	0.6 (0.6-0.7)	0.4 (0.3-0.4)	0.9 (0.7-1.1)	0.39 (0.35-0.42)
	<i>P</i> -value	<0.05 <sup>c</sup>	<0.05 <sup>c</sup>	<0.05 <sup>c</sup>	<0.05 <sup>c</sup>	<0.05 <sup>c</sup>	<0.05 <sup>b</sup>	<0.05 <sup>b</sup>
Geumneung	30	26.1 (20.5-31.8)	17.1 (14-21.4)	10.1 (7.4-12.2)	0.7 (0.6-0.7)	0.4 (0.3-0.4)	1.1 (0.8-1.3)	0.40 (0.37-0.43)
	<i>P</i> -value	<0.05 <sup>d</sup>	<0.05 <sup>d</sup>	<0.05 <sup>d</sup>	<0.05 <sup>d</sup>	<0.05 <sup>d</sup>	<0.05 <sup>b</sup>	<0.05 <sup>b</sup>

18S rDNA의 길이는 각각 1833 bp와 1832 bp, 염기서열내 GC의 비율은 51% 와 51~52%로 관찰되었다.

이들 유전자의 상동성을 BLAST 프로그램을 이용하여 분석한 결과, 바지락과 아기바지락 모두 중국에서 보고된 바지락의 18S rDNA (EF426293)에 99%의 염기서열 상동성을 나타냈다 (표 3-1-13). 이들 서열을 이용하여 계통분류학적 위치를 백합과속내 여러 패류의 18S rDNA 유전자들과 비교시, 바지락과 아기바지락은 백합과내 *Ruditapes* 속의 단계통군 (single clade)을 형성하였다 (그림 3-1-21). 핵내 nucleosome 형성에 관여하는 H3 유전자는 아기바지락과 바지락 모두 411 bp로 그 길이가 동일하며, 136개의 아미노산을 암호화하고 있다. H3 유전자를 암호화하는 코돈의 세 번째 위치의 염기서열상에서는 바지락과 아기바지락간의 염기서열의 차이가 관찰되었으나, 아미노산 서열 내 두 종간의 차이는 관찰되지 않았다 (표 3-1-14). H3 유전자의 염기서열을 이용하여 계통학적 유연관계 분석 시, 18S rDNA 결과와 마찬가지로 바지락과 아기바지락이 각각 하나의 단계통군을 형성하고 있다 (그림 3-1-22). 일반적으로 H3는 nucleosome assembly에 관여하는데 기능에 따라 두 개의 이형질체가 존재하는데 (RI: replication-independent form과 RC: replication-coupled form)가 존재한다. 이번 연구에서 분석된 H3 유전자는 RI form 유전자로 RC form의 추가적인 유전자 분석이 필요하다.

미토콘드리아의 핵내에 존재하는 세포호흡과 관련된 cytochrome oxidase I 유전자는 바지락과 아기바지락 모두 711 bp, 235개의 아미노산을 암호화하는 유전자로 구성되어 있다 (표 3-1-15). 두 바지락의 COI 유전자는 중국바지락 (ABD60304)에서 보고된 COI 유전자에 99~100%의 상동성을 보였다. 이들 유전자를 이용한 유전학적 유연관계 분석시, 아기바지락은 중국 (GQ855271, GQ855268, GQ855269)과 일본 (DQ184829)에서 보고된 바지락의 COI 유전자들과 single clade를 형성하고, 바지락은 중국에서 보고된 (EF066720, DQ39394) 바지락과 가장 가까운 유연관계를 형성하면서 아기바지락과 분지된 단계통군을 형성하고 있다 (그림 3-1-23). 앞의 18S rDNA, H3와 COI 유전자와 달리, ITS 유전자는 바지락 또는 아기바지락 내에서 그 서열의 크기가 다양하였다 (표 3-1-16). ITS 유전자 서열내 18S rDNA, 5.8S rDNA와 28S rDNA의 서열의 길이는 바지락과 아기바지락 모두 44, 157과 67 bp로 잘 보존되어 있는 반면, 5.8S rDNA 유전자 사이의 ITS1과 ITS 2 서열의 길이는 바지락은 614~633 bp와 367~377 bp, 아기바지락은 624~630 bp와 367~375 bp로 같은 바지락 종내에서도 ITS1과 ITS2 유전자 서열의 길이 변이가 높았다. 이들 서열 내 염기서열 길이의 높은 변이는 계통학적 유연관계 분석에도 영향을 미쳐 단계통군이 아닌 다계통군을 형성하였다 (그림 3-1-24). 따라서, 이들 유전자를 이용한 종 분류의 key로써 적합하지 않은 것으로 사료된다 .

일반적으로 바지락종의 형태학적 분류는 서식지에 따라 크기, shell의 형태, 패각의 다양한 무늬 패턴들이 존재하여 동일종 또는 이종으로 분류되는 경우가 종종 보고되고 있다. 그러나, 이번 연구는 국내에서 서식하는 특히 제주도에 서식하는 바지락은 두 종이 서로 다른 서식지에 존재하고 있음을 형태 및 유전학적 특성을 이용하여 최초로 규명하였다. 또한, 해산이매패류의 유전학적 분석에 일반적으로 단일 유전자 (18S rDNA, ITS, 또는 COI)를 이용하여 분석하는 경우가 많으나, 3종의 핵내와 1종의 미토콘드리아에 존재하는 유전자를 동시에 비교함으로써 바지락종의 형태학적 분류의 난점을 분자생물학적 기법의 응용을 응용함으로써 해산 이매패류의 분류에 기초적인 자료로 활용될 것으로 생각된다.

표 3-1-12. 바지락과 아기바지락 SSU rDNAs (18S rDNA)의 염기서열과 BLAST similarity 비교 (SG: 서귀포, SS: 성산, WD: 외도, GN: 김녕)

Species (Individual per population)	Nucleotides (bp) /GC ratio (%)	BLAST search (Identity)
<i>Ruditapes philippinarum</i>		
SG1	1833/51	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (100%)
SG2	1833/51	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (100%)
SG3	1833/51	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (100%)
SS1	1833/51	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (99%)
SS2	1833/51	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (99%)
SS3	1833/51	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (100%)
<i>Ruditapes variegatus</i>		
WD1	1832/51	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (99%)
WD2	1832/52	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (99%)
WD3	1832/52	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (99%)
GN1	1832/51	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (99%)
GN2	1832/51	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (99%)
GN3	1832/51	EF426293 <i>R. philippinarum</i> (99%)

표 3-1-13. 바지락과 아기바지락의 H3 유전자의 염기서열 분석 (SG: 서귀포, SS: 성산, WD: 외도, GN: 김녕)

Species (Individual per population)	Nucleotides (bp)/amino acid(aa)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	
SG1	411/136
SG2	411/136
SG3	411/136
SS1	411/136
SS2	411/136
SS3	411/136
<i>Ruditapes variegatus</i>	
WD1	411/136
WD2	411/136
WD3	411/136
GN1	411/136
GN2	411/136
GN3	411/136



표 3-1-14. 바지락과 아기바지락의 COI 유전자 염기서열과 BLAST similarity 비교 (SG: 서귀포, SS: 성산, WD: 외도, GN: 김녕)

Species (Individual per population)	Nucleotides (bp) /amino acid	BLAST search (Identity)
<i>Ruditapes philippinarum</i>		
SG1	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (100%)
SG2	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (100%)
SG3	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (100%)
SS1	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (100%)
SS2	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (99%)
SS3	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (100%)
<i>Ruditapes variegatus</i>		
WD1	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (99%)
WD2	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (99%)
WD3	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (99%)
GN1	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (99%)
GN2	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (99%)
GN3	709/235	ABD60304 <i>R. philippinarum</i> (99%)

표 3-1-15. 바지락과 아기바지락의 ITS 유전자 염기서열과 BLAST similarity 비교 (SG: 서귀포, SS: 성산, WD: 외도, GN: 김녕)

Species (Individual per population)	18S/ITS1/5.8S/ITS2/28S (Total;bp)	BLAST (identity%)
<i>Ruditapes philippinarum</i>		
SG1	44/627/157/368/67 (1263)	DQ399404 <i>R. philippinarum</i> (98%)
SG2	44/614/157/367/67 (1250)	EF035087 <i>R. philippinarum</i> (99%)
SG3	44/624/157/367/67 (1259)	DQ399404 <i>R. philippinarum</i> (97%)
SS1	44/618/157/373/67 (1259)	EF035087 <i>R. philippinarum</i> (98%)
SS2	44/633/157/375/67 (1277)	DQ399404 <i>R. philippinarum</i> (99%)
SS3	44/633/157/377/67 (1278)	DQ399404 <i>R. philippinarum</i> (99%)
<i>Ruditapes variegatus</i>		
WD1	44/629/157/370/67 (1267)	DQ399404 <i>R. philippinarum</i> (98%)
WD2	44/630/157/367/67 (1265)	DQ399404 <i>R. philippinarum</i> (97%)
WD3	44/629/157/370/67 (1267)	DQ399404 <i>R. philippinarum</i> (98%)
GN1	44/624/157/375/67 (1267)	DQ399404 <i>R. philippinarum</i> (98%)
GN2	44/624/157/369/67 (1261)	EF035087 <i>R. philippinarum</i> (98%)
GN3	44/628/157/373/67 (1269)	DQ399404 <i>R. philippinarum</i> (98%)

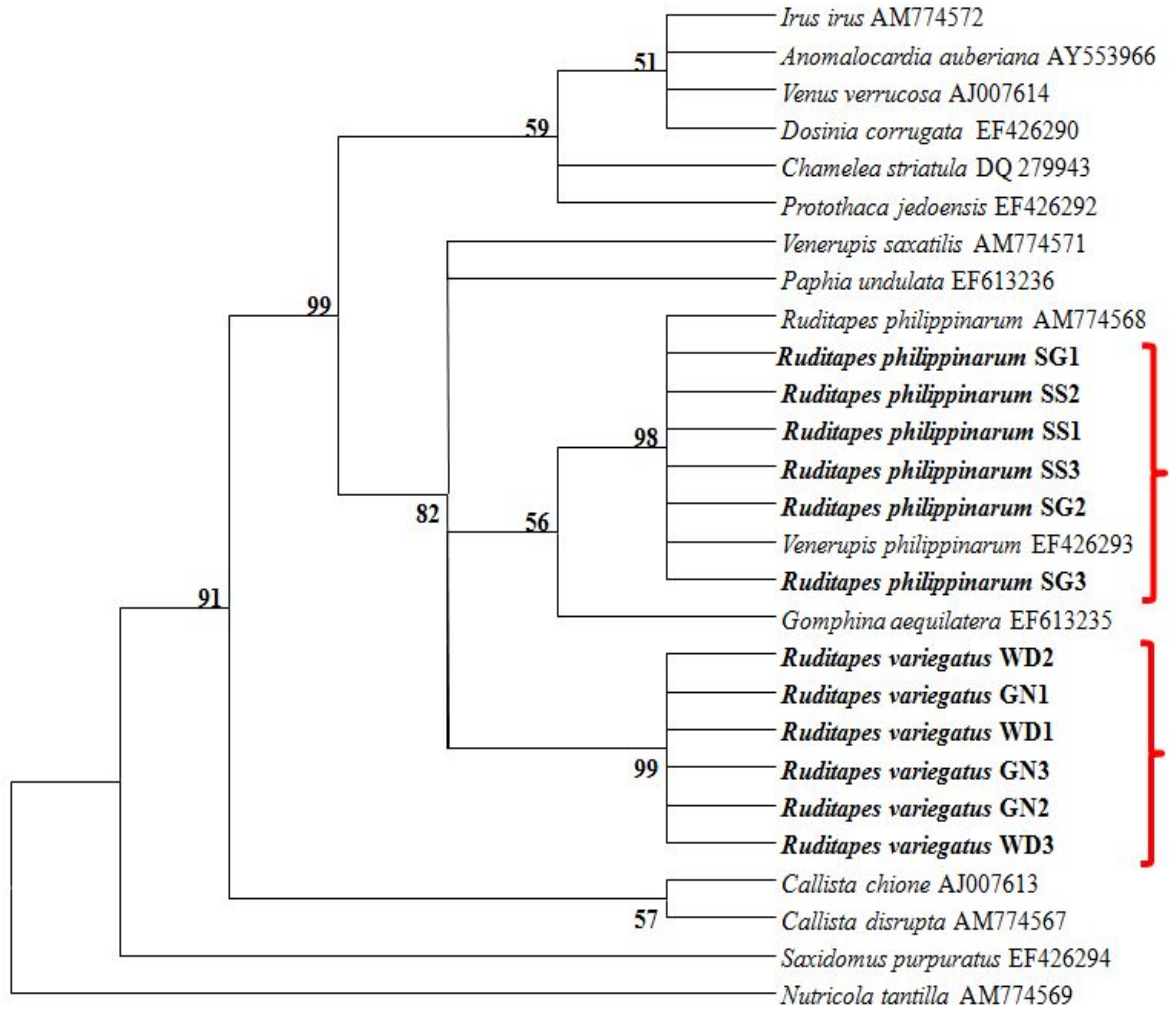


그림 3-1-21. 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 아기바지락 (*Ruditapes variegatus*)과 백합과 이매패류의 SSU rDNAs (18S rDNA)를 이용하여 MEGA 4.0 program의 Neighbor-Joining 방법에 의해 분석된 SSU rDNA의 계통도

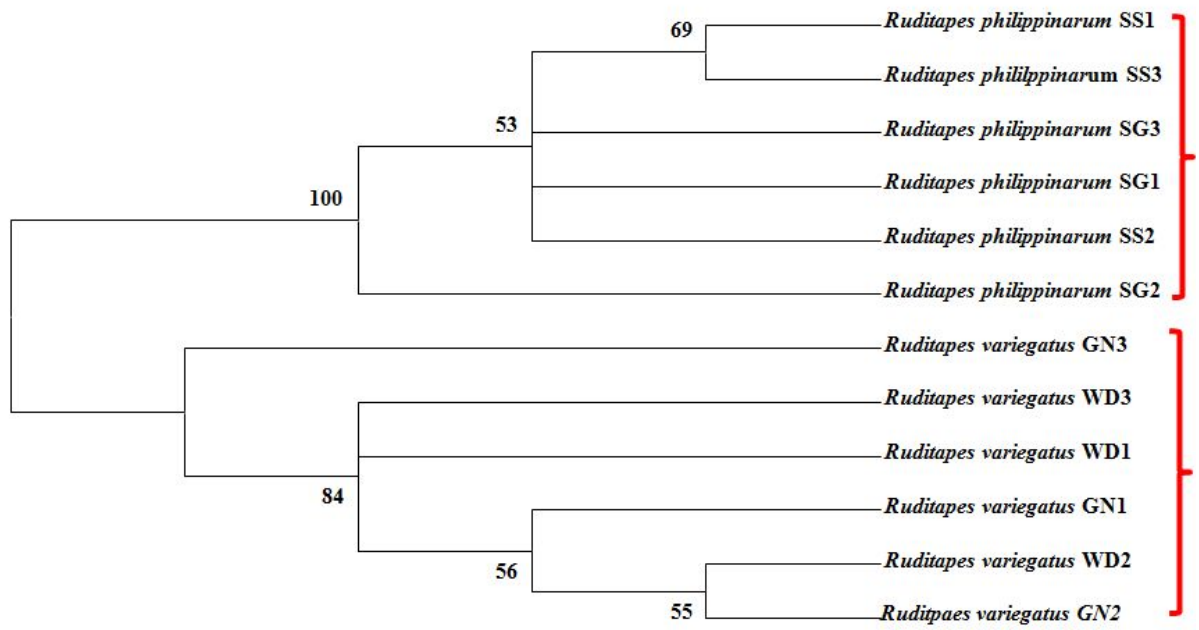


그림 3-1-22. 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 아기 바지락 (*Ruditapes variegatus*)의 histone 3 뉴클레오타이드 염기서열을 이용하여 MEGA 4.0 program의 Neighbor-Joining 방법에 의해 분석된 histone 3의 계통도



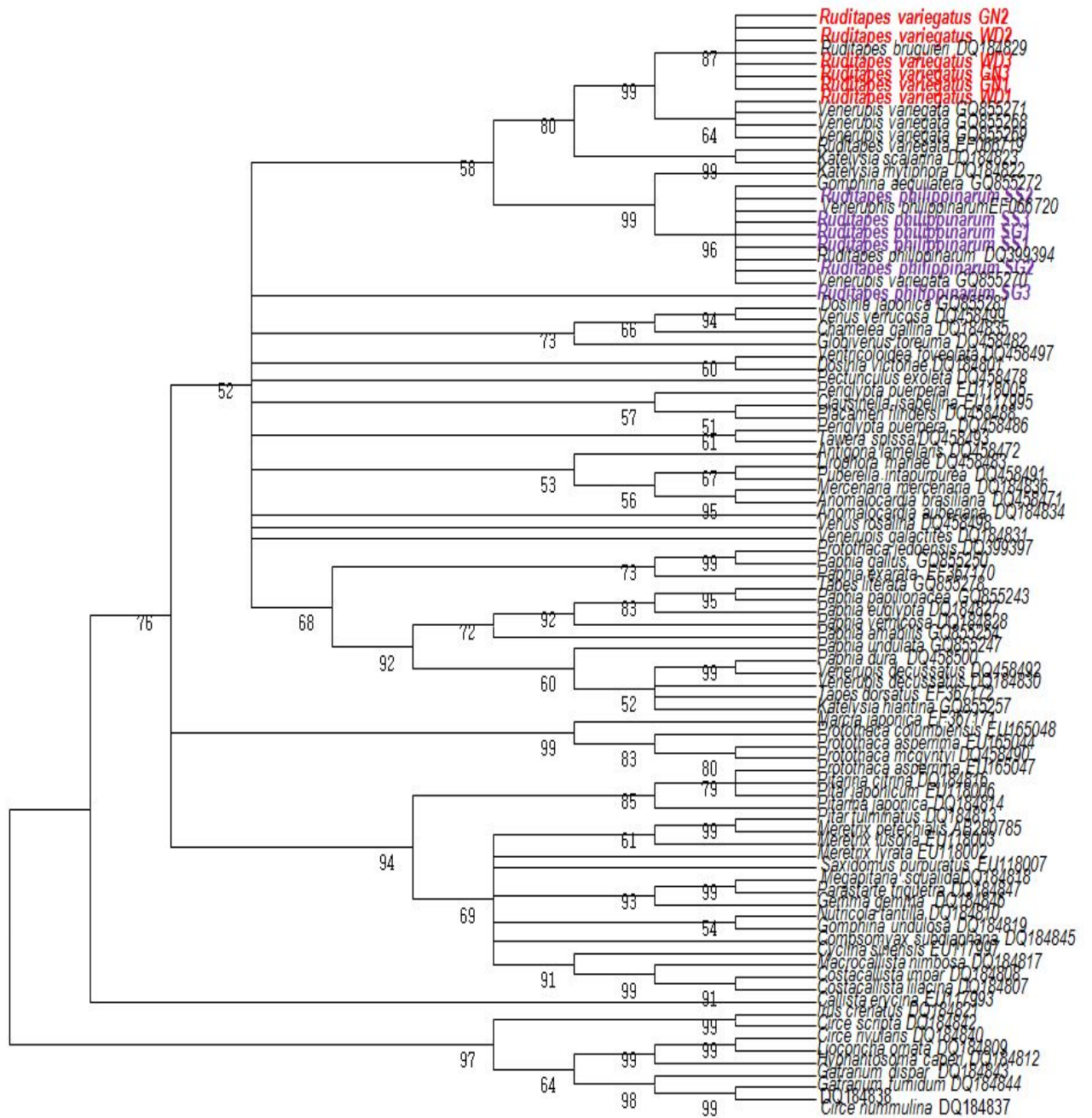


그림 3-1-23. 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 아기바지락 (*Ruditapes variegatus*)과 백합과 이매패류의 COI 유전자 (아미노산 서열)를 이용하여 MEGA 4.0 program의 Neighbor-Joining 방법에 의해 분석된 COI 유전자의 계통도

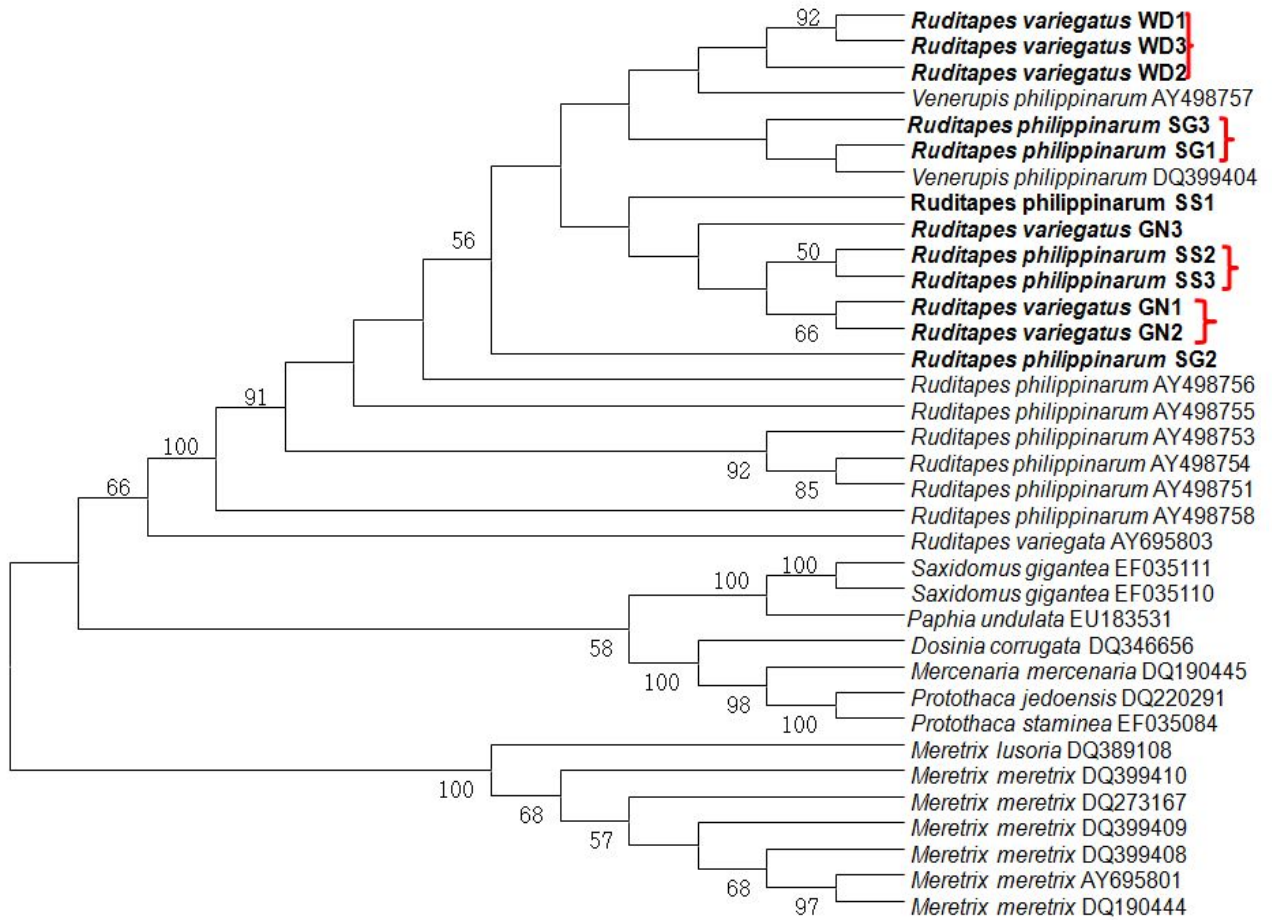


그림 3-1-24. 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 아기바지락 (*Ruditapes variegatus*)과 백합과 이매패류의 ITS 유전자를 이용하여 MEGA 4.0 program의 Neighbor-Joining 방법에 의해 분석된 ITS 유전자의 계통도



### 3-2절. 바지락 종묘의 안정적 공급에 관한 연구

#### 1. 바지락 순치를 통한 조기 성 성숙에 관한 연구

##### 가. 연구목적

자연산 바지락 모패를 이용하여 인공적으로 산란을 유도하기 위해서는 모패가 성적으로 성숙해야 한다. 자연적인 산란시기를 맞추기는 매우 어렵기 때문에 인공적인 시스템에서 온도조절 및 먹이공급을 통해 바지락을 성숙시키기 위한 순치가 필요하다. 중국은 이미 바지락 치패를 대량생산해 상용화 단계에 있지만, 북방지역 (대련 이북)과 남방지역 (북건성 주변지역) 의 치패 생산 방식은 큰 차이를 보이고 있다. 북방지역의 경우 육상수조에서 산란을 시키는 반면, 남방지역에서는 축제식 양식장에서 산란을 시키고 있다. 이는 기온이 낮은 북방지역의 경우 바지락 치패의 수정과 발생을 위한 수온을 유지하기 위해 실내 사육조에서 산란을 유도하고 있지만, 따뜻한 남방지역은 야외의 축제식 양식장을 이용한다. 우리나라의 경우 축제식 양식장을 이용한 방식을 사용할 경우 1년중 제한된 기간에만 시도할 수 있으므로, 실내 사육조를 이용하는 방법을 취하는 것이 치패 대량생산에 있어 합리적인 방법이라 사료된다. 이처럼, 바지락 치패의 대량생산에 있어 온도조건은 인공공묘를 하는데 있어 중요한 부분이라고 강조하고 있다. 따라서, 이번 연구는 실내 사육실에 순환여과 수조를 설치하고 8주간 온도 및 먹이공급을 조절하여 바지락의 성 성숙 변화 과정을 관찰하는데 그 첫 번째 목적이 있다.

##### 나. 실험방법

##### (1) 시료채집 및 바지락 선별

시료는 2010년 4월 충남 홍성에서 크기 35~45 mm 바지락 600개체를 채집하여 실험에 사용하였다 (그림 3-2-1).

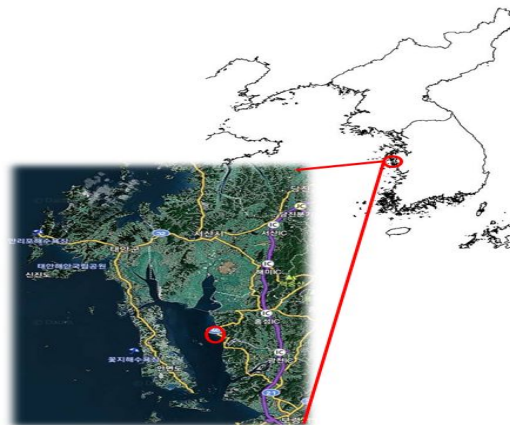
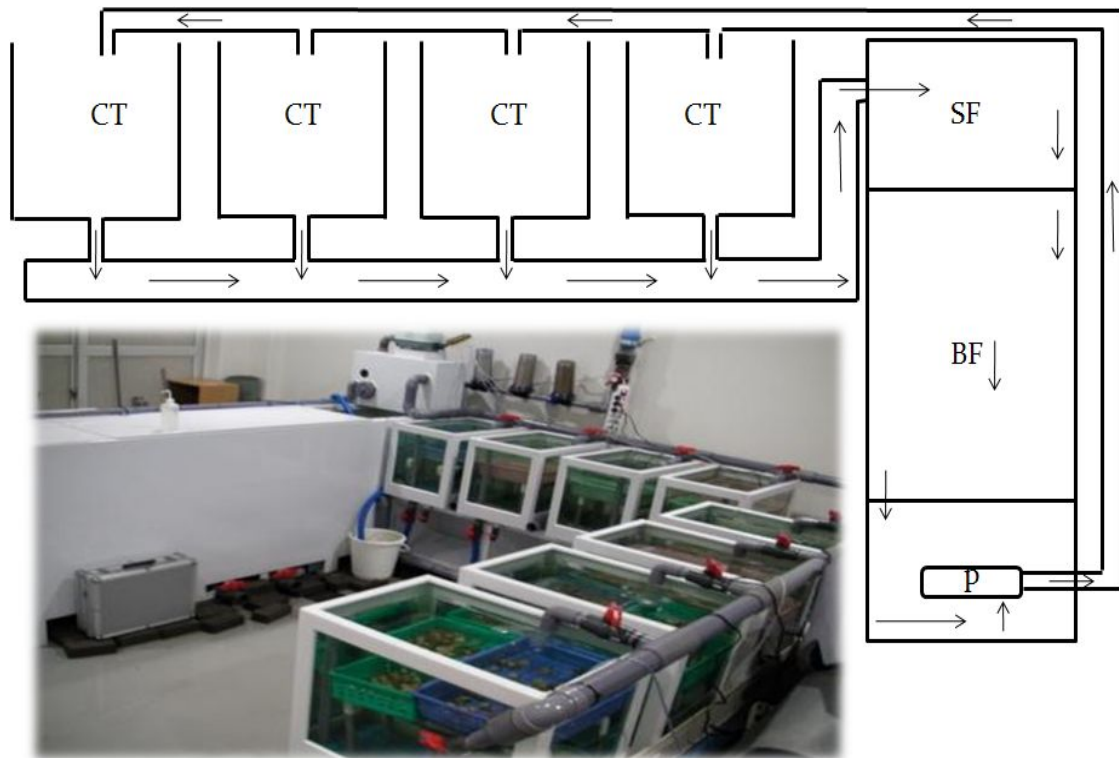


그림 3-2-1. 바지락 채집 지역 (충남 홍성)

이번 연구에 사용한 순환여과 사육조 크기는  $600 \times 400 \times 500 \text{ mm}^3$ 이며, 여과조는  $2500 \times 600 \times 1100 \text{ mm}^3$  크기로 침전조, 생물학적 여과조, UV살균조, protein 스키머와 온도 조절장치로 구성되어 있다 (그림 3-2-2). 채집된 바지락은  $11^\circ\text{C}$ 로 맞추어진 수조에서 3일간 적응수온에 순치시켰다. 이후 하루에 수온을  $1^\circ\text{C}$ 씩 올리며, Han et al. (2008)이 제시한 바지락의 가장 활발한 먹이 섭취율을 보인다는  $20 \sim 25^\circ\text{C}$  수온까지 바지락을 순치시켰다 (그림 3-2-2). 순치기간 동안 먹이는 공급하지 않았으며, 적정수온인  $22^\circ\text{C}$ 에 도달하였을 때 먹이를 공급하기 시작하였다. 바지락의 먹이는 *Tetraselmis* (30%), *Isochrysis* (20%), *Pavlova* (20%) 및 *Thalassiosira weissflogii* (30%) 등이 1 mL에 약 20억 cell로 농축되어 있는 Instant algae를 사용하였다. 먹이 공급량은 Hatchery culture of bivalve (FAO, 2004)에 제시된 하루 공급량인 바지락 전체 건중량의 3%를 2회로 나누어 09:00와 18:00 공급하였다. 먹이 공급 시에는 수조에 공급되는 해수를 차단하였으며 Instant algae이 바닥에 가라앉는 것을 방지하기 위해 각 수조에 에어 스톤 과 5 W 모터를 설치하여 수류를 발생시켰다.



**CT : Culture tank, SF : Submerged filter, BF : Bio filter**

그림 3-2-2. 순환여과 수조의 도면

## (2) 사육수조 환경 변화 측정

사육기간 동안의 수질 변화를 파악하기 위하여 수온, pH, 염분 및 용존산소를 YSI model 85를 사용하여 측정하였으며  $\text{NH}_4^+$ 과  $\text{NO}_2^-$ 는 3일에 한번 Aqua-VBC Kit를 이용하여 측정하였

다. 8주 동안 염분의 범위는 26.7~32.2 psu, 용존산소는 5.9~9.8 ppm의 변화를 보였다. pH는 7.3~8.0를 보였으며  $\text{NH}_4^+$ 는 0.0~0.13 ppm,  $\text{NO}_2^-$ 는 0.0~1.0 ppm의 범위를 나타내었다 (그림 3-2-3).

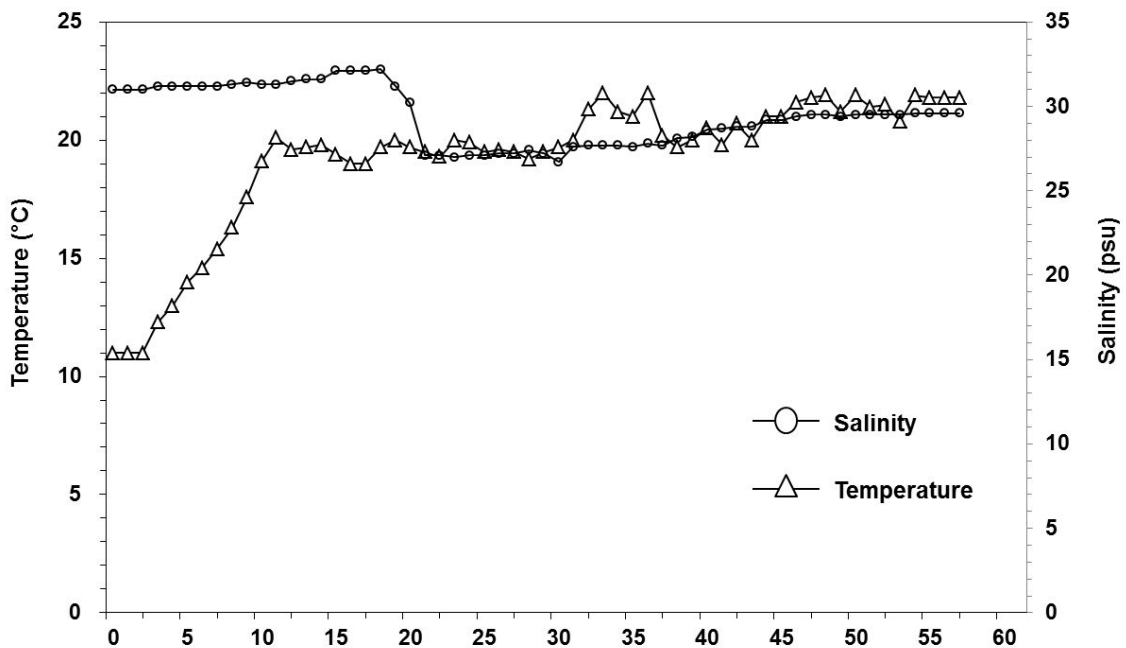


그림 3-2-3. 사육일수에 따른 환경변화 측정 (수온, 염분)

### (3) 바지락 순치실험

순환여과 수조에서의 바지락 순치 실험은 4월 16일부터 시작하였다. 이후 주 1회 20개체를 선택하여 바지락의 비만도, 생식소 발달 단계, 바지락 알에 대한 항원 항체 반응을 이용한 생식소지수 (gonad somatic index, GSI) 및 바지락 포자충 (*Perkinsus* sp.) 감염도를 조사하였다.

바지락의 비만도 (CI)는 바지락 습중량과 껍각 건조중량의 비로 나타내었다.

$$\text{CI} = \frac{\text{바지락 습중량 (g)}}{\text{껍각 건조중량 (g)}}$$

조직학적 관찰을 통한 생식소 발달 단계를 관찰하기 위해 바지락의 외투강, 생식세포, 소화맹낭 및 아가미 등이 포함되도록 3 mm 두께로 각 개체마다 일정하게 절취 후 Davidson's 용액에 24시간 고정된 후에 Harris' Hematoxylin과 Eosin Y (Howard and Smith, 1983; Ngo et al., 2003; Kang et al., 2004)로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 바지락 생식소 발달 단계는 휴지기 (Resting stage), 초기 발달기 (Early developing stage), 후기 발달기 (Late developing stage), 완숙기 (Ripe stage)로 구분하였다.

바지락의 생식소지수 (GSI) 측정을 위해 Indirect-ELISA 방법을 실시하였다 (Park et al.,

2004). Park et al. (2004)에 의해 개발된 바지락의 알에 대한 다클론 항체를 사용하였으며, 알 하나의 건조중량에 대한 난 단백질량의 비례식을 이용하여 ELISA에서 추정된 총 난 단백질의 양으로부터 알의 총 건조중량을 환산하였고, 생식소지수 (GSI)는 개체의 총 건조 중량에 대한 알의 건조 중량 비율로 계산하였다.

바지락 포자충 (*Perkinsus* sp.)의 감염도는 Park & Choi (2001)의 방법에 따라 측정하였다. 바지락 아가미의 습중량을 측정한 뒤, FTM 배지가 담긴 튜브에 넣어 실온의 암실에서 1주간 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 정량적인 감염도 측정을 위하여 바지락 조직은 2M NaOH를 처리하여 바지락 포자충 이외의 조직을 분해하였고, *Perkinsus* 만을 수집하였다. 바지락 포자충 감염도는 *Perkinsus* cells/gill weight으로 나타내었지만, 바지락 조직 전체에 대한 바지락 포자충의 감염도를 나타내기 위해 Park (1999)의 공식 ( $Y=3.3667x - 104,612$ )을 이용하여 바지락 개체에 대한 감염도를 환산하였다.

## 다. 결과

실험기간 동안 수온은 11~22°C, 염분은 26.7~32.2 psu의 범위를 보였다 (그림 3-2-4). DO는 5.9~9.8 mg/L, pH는 7.3~8.6,  $\text{NH}_4^+$ 는 0.1~5.0 mg/L,  $\text{NO}_2^-$ 는 0.3~1.0 mg/L의 값이 실험기간 동안 측정되었다 (그림 3-2-4). 바지락의 생존율 결과는 그림 3-2-5에 나타내었다. 0~6일까지 100%의 생존율을 보인 바지락은 7일부터 48일까지 일일 평균 0.53%씩 폐사하여 82.1%의 생존율을 보였으며, 48일부터 57일까지 1.38%씩 폐사하여 최종 60.3%의 생존율을 보였다. 실험에 이용된 바지락은 총 150개체로, 각장은 39.6~41.3 mm의 범위였고, 육질량은  $3.6938 \pm 0.7 \sim 5.9900 \pm 1.0$  g의 범위였다 (표 3-2-1).

채집된 바지락의 비만도(CI) 결과는 그림 3-2-6에 나타내었다. 0일  $0.20 \pm 0.03$ 의 비만도를 보인 바지락은 사육 12일째부터  $0.17 \pm 0.03$ 으로 감소하기 시작하여, 22일~28일  $0.15 \pm 0.01$ 로 유의적 ( $p < 0.05$ , ANOVA)으로 감소되었다. 특히, 실험 종료일인 57일째의 바지락의 비만도는  $0.12 \pm 0.02$ 로 실험 시작일에 비해 비만도가 60% (0.08)가 유의적으로 ( $p < 0.05$ , ANOVA) 감소하였다. 비만도 (CI)는 해산 이매패류의 생리적 건강상태를 나타내는 지표로 사용된다 (Kang et al., 2007; Yang et al., 2011; Limpanont et al., 2011). Kang et al. (2007)은 이매패류의 비만도는 영양분의 이용 및 축적, 생식소발달 그리고 생리적인 스트레스와 밀접한 관련이 있다고 보고한바 있다. 비만도는 생식소가 발달함에 따라 증가하게 되며, 산란이후 감소하게 된다. 또한 비만도는 먹이섭취와 관련이 있는데, 먹이섭취량이 높아지게 되면 비만도 역시 증가하는 경향을 보인다 (Kang et al., 2000). Domitilia et al (2009)는 포르투갈 북쪽에 위치한 Rias Gallegas과 남쪽에 위치한 Ria Formosa Lagoon에 서식하고 있는 European clam (*Ruditapes decussatus*)을 11주 동안 conditioning을 실시하였다. 실험시작 0일째 Rias Gallegas R. *decussatus*의 비만도는 0.1, Ria Formosa Lagoos의 바지락 비만도는 0.08이었다. 이번 실험에 사용된 홍성 지역의 바지락 비만도는

실험시작 0일째  $0.20 \pm 0.03$ 로 두 지역의 유럽산 바지락의 비만도에 비해 약 2배 높은 (비만도 차이, 0.1~0.12) 비만도를 갖고 있어, 홍성 지역의 먹이환경 및 저질상태는 Ria Formosa Lagoon 지역과 Rias Gallegas 지역에 비해 비옥한 것으로 사료된다.

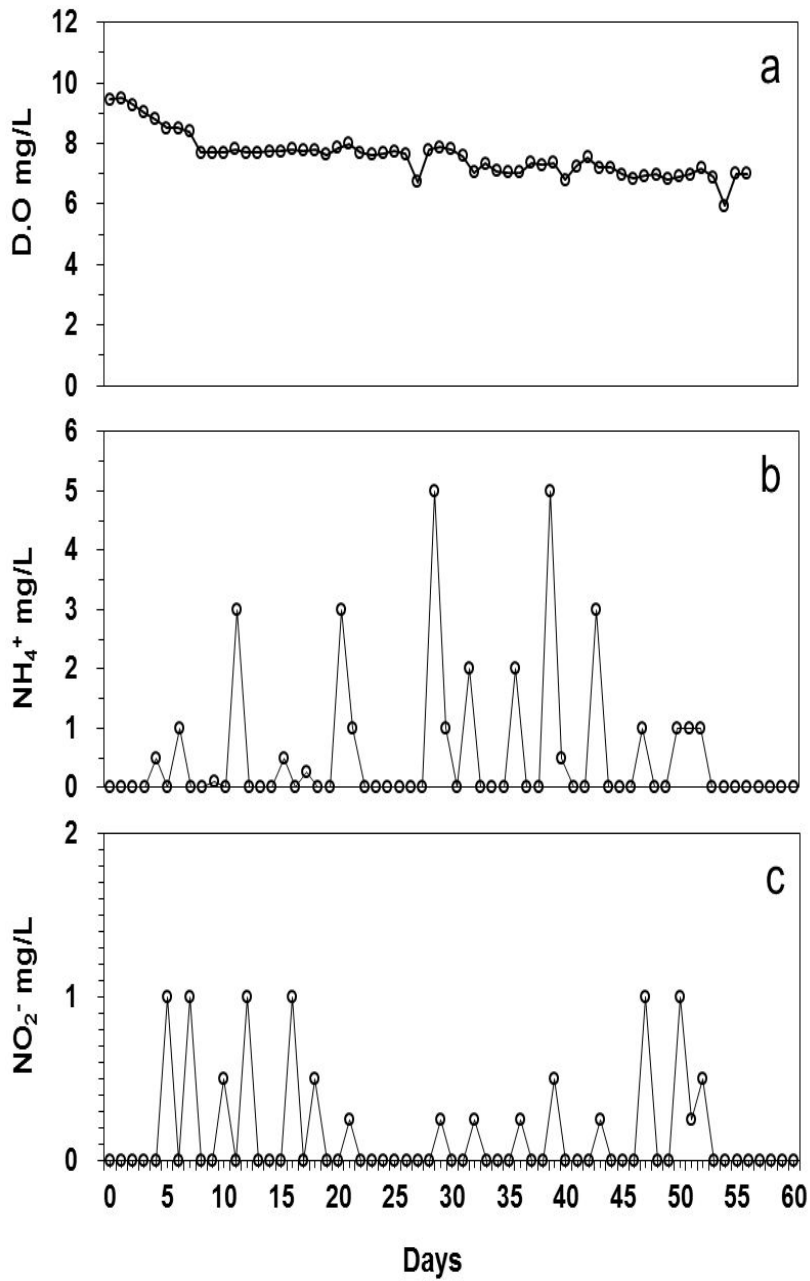


그림 3-2-4. 사육기간에 따른 용존산소 (a) 및 암모니아 (b) ,아질산 (C) 변화



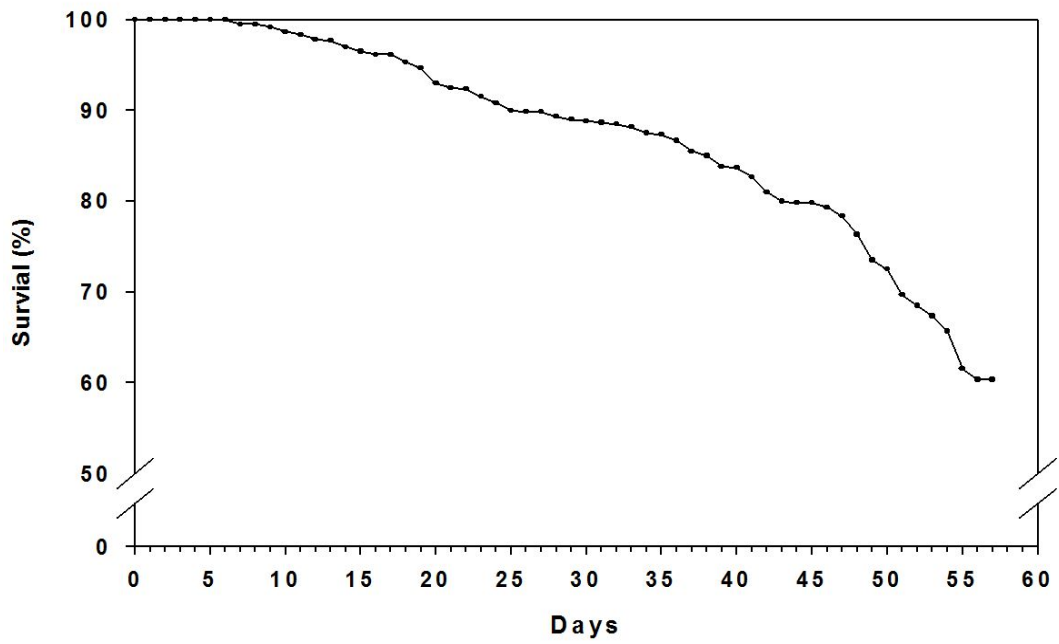


그림 3-2-5. 바지락 생존률

표 3-2-1. Conditioning일에 따른 바지락의 크기 및 중량

사육일수	개체	패각크기±표준편차 (mm)	육중량±표준편차 (g)
0	10	41.3±2.0	5.9900±1.0
12	20	39.6±2.3	4.3695±0.7
22	20	40.0±1.8	4.6519±0.6
28	20	40.1±2.1	4.5491±0.6
37	20	40.8±2.2	4.4409±0.9
42	20	39.7±1.5	3.9759±0.6
49	20	40.0±1.6	3.8706±0.5
57	20	39.9±1.5	3.6938±0.7

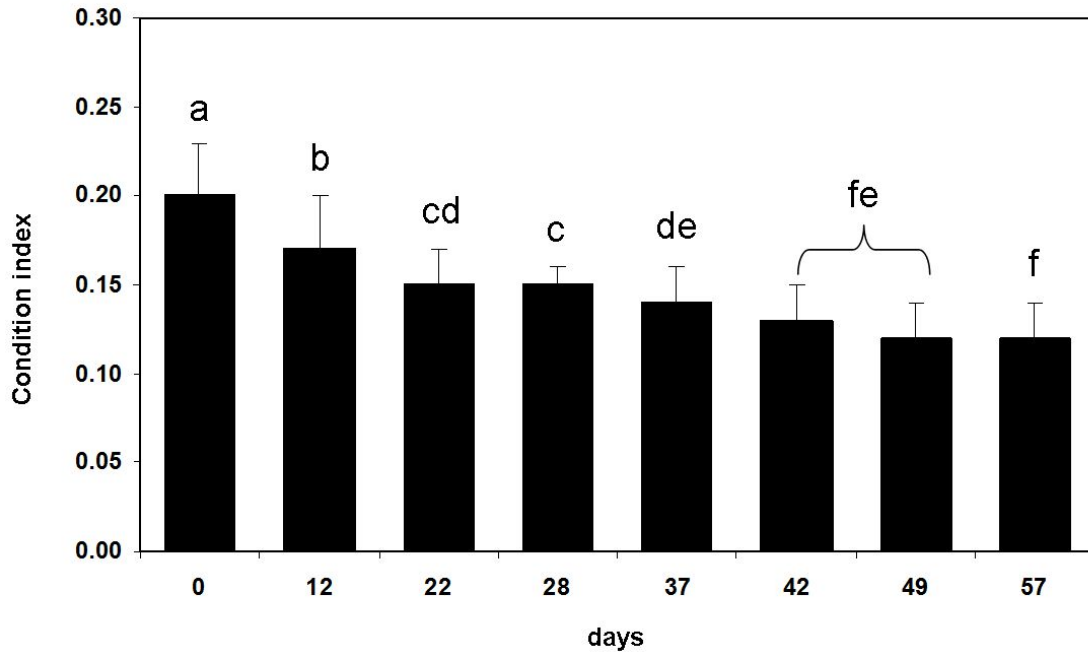


그림 3-2-6. 연구 기간 동안 바지락 비만도의 변화 (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

바지락의 생식소 발달은 시간이 지남에 따라 변화양상이 뚜렷하게 나타났다. 실험 시작 0일 대부분의 바지락은 초기 발달 단계 (90%)였고, 12일 후부터 후기 발달 단계 (20%)가 관찰되었다. 37일 후 100% 후기발달 단계였으며, 완숙 단계의 바지락은 47일 후에 20%의 개체에서 관찰되었다. 실내수조 사육 57일째 산란에 가입할 수 있는 단계인 완숙기의 바지락은 40%의 개체에서 관찰되었다 (그림 3-2-7).

이매패류의 생식소 발달은 수온과 먹이 조건에 따라 변화한다 (Park and Choi 2004; Marina and Alejandro 2007; Limpanont et al., 2011; Yang et al., 2011). Roger and Manuel (2010)의 연구에 의하면 20°C에 맞춰진 사육수조에서 참굴 conditioning을 인스턴트 algae *Tetraselmis* 3600 (Reed Mariculture Store)과 *Isochrysis* 1800 (Reed Mariculture Store)을 먹이로 참굴 건중량의 2%를 공급하여 72일 후, 44.6%의 참굴에서 완숙단계가 관찰되었다. 이는 해산 이매패류의 성성숙 conditioning을 하는데 있어 수온과 먹이의 조건이 매우 중요하게 고려되어야 할 요소이다. Chung et al (2002)는 곰소만 바지락을 2001년 3월 1일부터 5월 19일 까지 80일간 6종의 플랑크톤 (*Isochrysis galbana* 10%, *Chaetoceros gracilis* 10%, *Chlorella ellipsoidea* 10%, *Nanochloris oculata* 10%, *Tetraselmis tetrahele* 30%, *Nitzschia* sp. 30%)의 혼합액을 사육조에 300,000 cells/mL이 되도록 계속 공급하여, 수온에 따른 생식소 발달 변화에 대한 연구를 실시하였다. 22°C에 사육된 바지락에서는 30일 후 후기 발달단계의 바지락이 관찰되었고, 50일부터 완숙한 개체가 출현하여 60일 후에는 산란흔적을 보였음을 보고하였다. 이번 연구에서도 Chung et al. (2002)의 연구 결과와 비슷하게 30일 후 100%의 바지락 개체에서 후기 발달단계가 나타났으며, 50일 후에는 완숙기 단계의 바지락이 관찰되었다. 하지만, 60일 후 완숙기에 임한 바지락의 개체수의 차이가 있었는데, 곰소만 바지락이 60일 후 70%가 완숙기

단계였으나, 이번 연구에서는 40%의 바지락이 완숙기 단계였다. 이러한 결과는 실험 기간 동안 증가된 *Perkinsus*의 영향으로 인해 산란에 필요한 영양분을 공급받지 못해 생긴 결과로 사료된다.

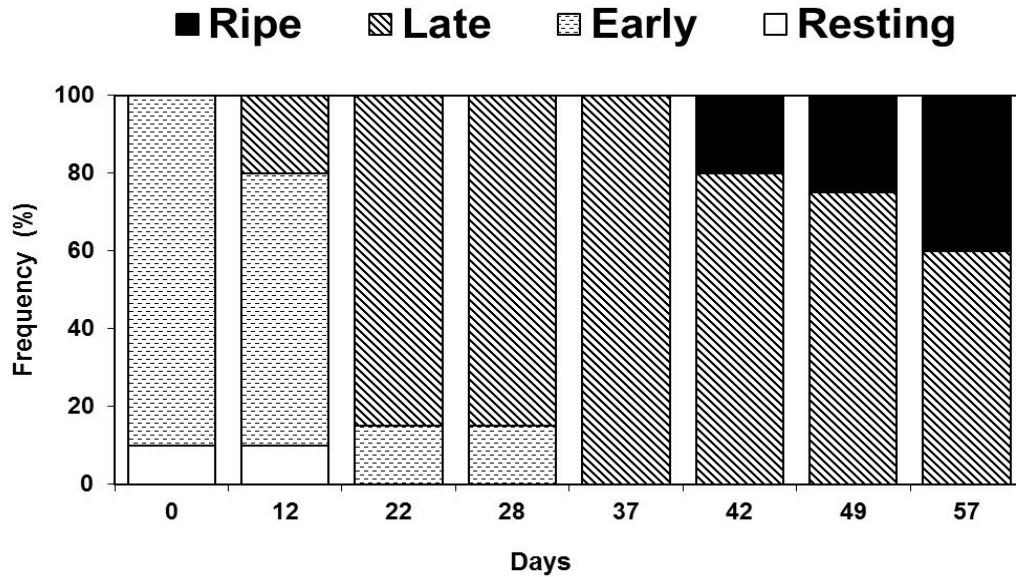


그림 3-2-7. 생식소 발달 단계 변화

바지락의 GSI는 후기 발달기가 관찰되는 22일 이후부터 측정이 가능했다. 바지락의 GSI는 후기 발달기가 관찰된 22일 후부터 측정이 가능했다. 평균 GSI는  $3.7 \pm 1.0 \sim 8.2 \pm 3.0\%$ 를 보였으며, 22일부터 37일까지 유의적인 증가는 없었으나, 37일 이후부터 유의적 ( $p < 0.05$ , ANOVA)인 차이를 보이며 증가하였다 (그림 3-2-8). 57일 후 산란에 가입할 수 있는 완숙기 단계 바지락의 GSI는  $9.8 \pm 0.13\%$ 였다. Jasim (2008)이 보고한 바지락 난 중량 ( $0.000000022$  ng)을 GSI값으로 나누어 계산된 바지락의 포란도는  $3,561,918 \pm 896,095$  eggs였다.

해산 이매패류의 생식소지수를 정량적으로 분석하는데 많은 어려움이 있지만 면역학적 방법을 이용한 해산 이매패의 번식량 측정법이 개발되어 이용되고 있다 (Choi et al 1993; Kang et al. 2003; Park et al. 2003; Park and Choi 2004). 바지락의 번식량은 후기 발달 단계가 관측되었던 22일부터 측정이 가능하였다. Park and Choi (2004)의 연구에 의하면 생식소 발달이 초기 발달단계일 경우 난 단백질이 생성되기 이전이거나 생성될지라도 그 양이 적어 난 단백질 형성이 본격적으로 시작되는 후기 발달단계부터 측정이 가능하다고 보고한 바 있는데, 57일 동안 conditioning을 통해 바지락의 포란도는 완숙기 단계에 있는 개체를 기준으로 최종  $3.5 \times 10^6$  eggs가 만들어진 것으로 추정된다. Chung et al (2005)은 곰소 지역 바지락을 이용하여 먹이생물 6종 (*Tetraselmis tetrathele*, *Isochrysis galbana*, *Nitzschia* sp., *Chaetoceros gracilis*, *Chlorella ellipsoidea*, *Nannochloris oculata*)을 혼합하여  $4 \sim 6 \times 10^8$  cells/day 공급하였고 산란자극은 공기노출, 수온자극 및 정자 자극을 주어 40.1~45 mm 크기

의 바지락에서  $1,540,154 \pm 58,359$  eggs를 산란시켰다. 또한 Toba and Miyama (1991)은 일본 도쿄만에 서식하는 바지락의 포란도를  $0.24 \sim 1.35 \times 10^6$  eggs로 보고하였고, Park and Choi (2004)는 우리나라 곶소만에 서식하는 바지락의 포란도를  $0.94 \sim 11 \times 10^6$  eggs로 보고한바 있다. 이에 반해 이번 연구 결과를 통해 측정된 포란도는 곶소만 바지락에 비해 1/4정도 낮았다.

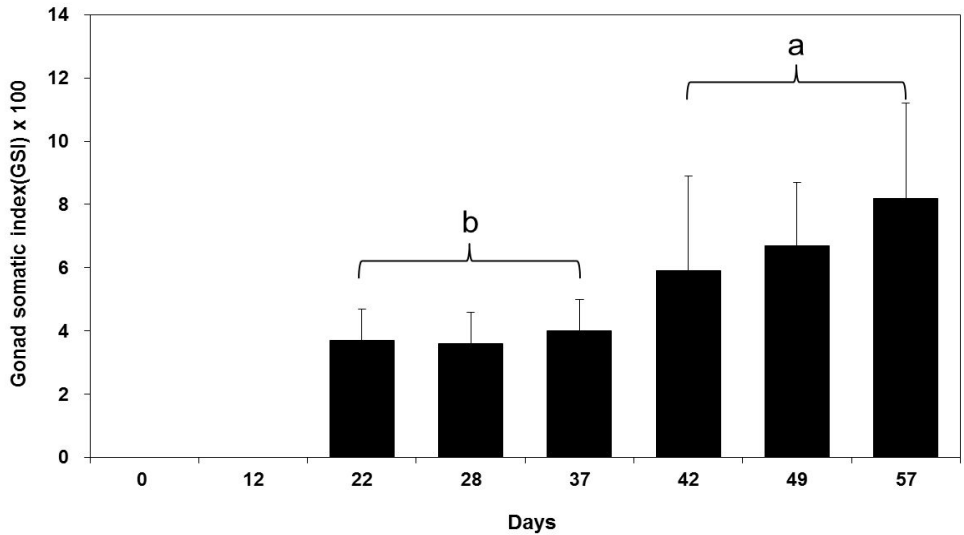


그림 3-2-8. 생식소 지수 Gonad somatic index (GSI) 결과 (ANOVA,  $p < 0.05$ )

바지락 포자충 감염도는 실험 시작 0일  $3,581,250 \pm 1,782,446$  *Perkinsus* cells/gill wet weight의 범위를 보였으며, 이후 시간이 지남에 따라 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 증가하기 시작하여 최종  $9,931,250 \pm 4,165,155$  *Perkinsus* cells/gill wet weight의 범위를 보였다 (그림 3-2-9). 위의 결과를 Park가 (1999)의 방법에 따라 바지락 전체 조직의 *Perkinsus* 감염도로 환산하였다. 환산된 *Perkinsus* 감염도 결과,  $182,522 \sim 705,064$  *Perkinsus* cells/g tissue wet weight의 범위를 보였다 (그림 3-2-9).

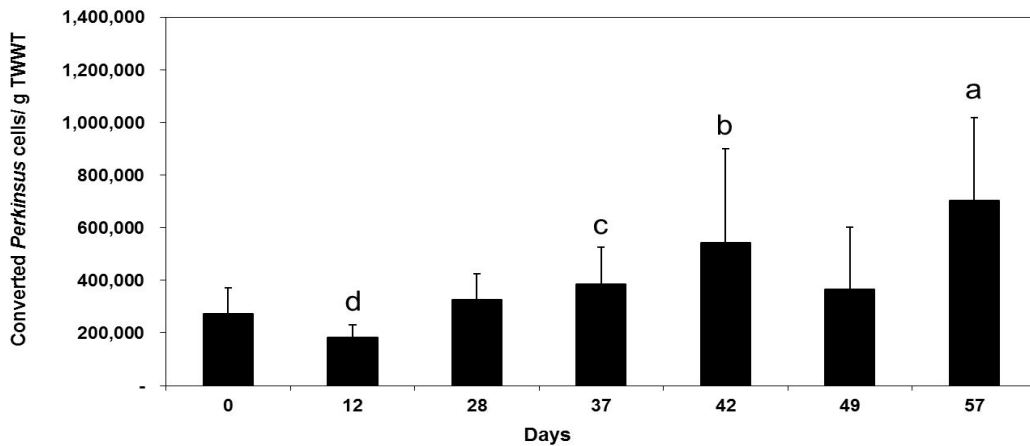


그림 3-2-9. 환산된 바지락 포자충 감염도 (ANOVA,  $p < 0.05$ )



## 2. 바지락 인공산란 유도 및 유생 발생 관찰

### 가. 시료채집 및 실험방법

#### (1) 먹이생물 종류 및 배양조건

바지락 모패 및 유생의 먹이생물을 배양하기 위해 한국 미세조류은행으로부터 3종의 이매패류 먹이생물 (KMMCC-12: *Isochrysis galbana*, KMMCC-604: *Chaertoceros gracilis*, KMMCC-111: *Tetraselmis suecica*) 100 mL를 분양 받았다 (그림 3-2-10).

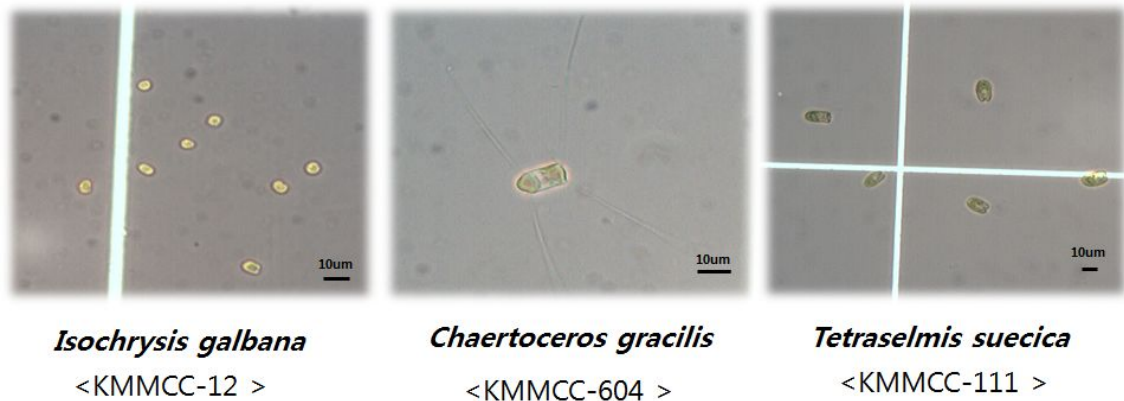


그림 3-2-10. 미세조류은행으로부터 분양받은 먹이생물

분양받은 100 mL의 먹이생물은 온도  $26.5 \pm 1.0^\circ\text{C}$ , 조도 8000 Lux, 염분  $32.7 \pm 1.1$  psu, 광주기 13시간과 암주기 11시간 조건으로 배양하였다. 먹이생물의 배양액은 Conwy media를 사용하였으며, 그 조성표는 그림 3-2-11.에 나타내었다. 먹이생물의 접종은 *Isochrysis galbana*와 *Tetraselmis suecica*는 1L당 Stock A 2 mL, Stock B 0.2 mL를 멸균된 해수에 희석하여 원종을 접종하였으며, *Chaertoceros gracilis*는 1L당 Stock A, Stock C 2 mL, Stock B 0.2 mL를 희석하여 접종하였다. 해수는 1.2 µm filter paper (Whatman)를 이용하여 여과 후 원종 배양 (250 mL) 및 소배양 (1.5 L)에 사용하였다. 중간배양 (15 L)시 해수는  $\text{CaCO}_3$ 를 1.5 g를 첨가 후 24시간 방치하여 사용하였다.

바지락 모패를 위한 먹이생물 배양은 4개의 500 mL flask에 Conmwy 배지 300 mL (250 mL 배지 + 50 mL 원종)에서 3일간 계대 배양을 실시 한 후, 1500 mL (1000 mL 배지 + 500 mL 원종) 배양액에 접종하여 다시 3일간 증식 배양시켰다. 증식 배양된 배양액 3 L를 15 L 배양액에 접종시켜 대량 배양후에 모패의 먹이로 사용하였다 (그림 3-2-12).

<b>Stock A</b>	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Ferric chloride	1.3 g
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Manganese(II) chloride	0.36 g
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	Boric acid	33.6 g
	EDTA	Ethylene diaminetetra acetic acid	45 g
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sodium phosphate dibasic dihydrate	20 g
	$\text{NaNO}_3$	Sodium nitrate	100 g
	<b>Trace metal solution</b>		<b>1.0 ml</b>
	Distilled water	<b>Up to 1L</b>	1000 ml

<b>Trace metal solution</b>	$\text{ZnCl}_2$	Zinc chloride	2.1 g
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cobalt(II) chloride hexahydrate	2 g
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Ammonium molybdate tetrahydrate	0.9 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Copper(II) sulfate pentahydrate	2.0 g
	Distilled water	<b>Up to 100ml</b>	100 ml

<b>Stock B</b>	Vitamin B12	Cyanocobalamin	10 mg
	Vitamin B1	Aneurine hydrochloride	200 mg
	Distilled water	<b>Up to 200ml</b>	200 ml

<b>Stock C</b>	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sodium Metasilicate Pentahydrate	4 g
	Distilled water	<b>Up to 100ml</b>	100 ml

그림 3-2-11. Conwy 배지 조성표

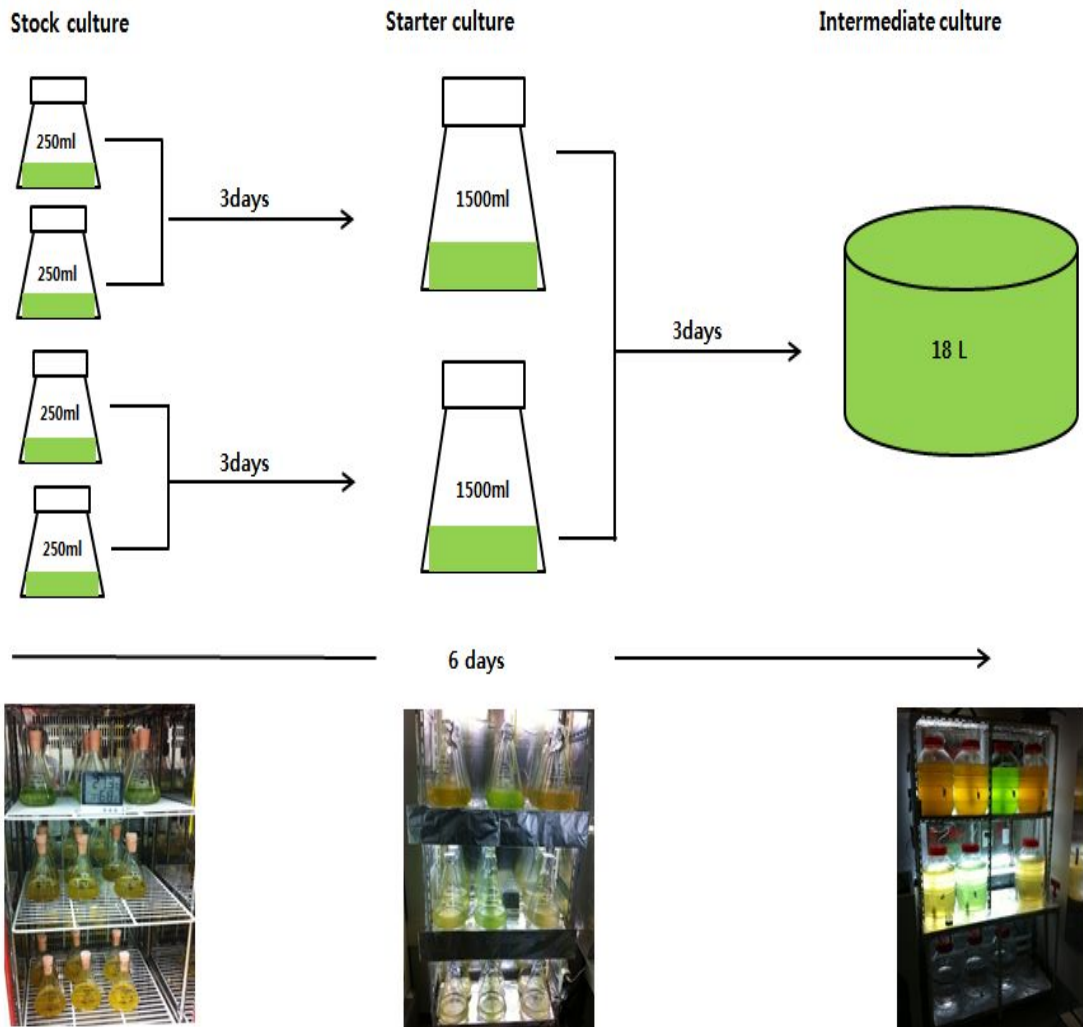


그림 3-2-12. 용량에 따른 먹이생물 배양 방법



## (2) 바지락 모패 및 치패 사육을 위한 시스템 모식도

바지락 모패 및 치패 사육을 위해 제주대학교 해양과학대학 사육동에 시스템을 설비하였다. 시스템은 설치 공간 및 해수를 원활히 사용할 수 없는 상황으로 인해 순환양식 시스템으로 설계하였다. 먼저 저수조는 250 L 용량이며, 저수조 내에는 티타늄 히터 2 kw가 들어있어 이 시스템의 전반적인 수온을 조절한다. 순환수조는 사육조 (40 L) 5개와 여과조, 냉각기, protein 스키머, 온도 조절장치, 카트리지 필터 (1, 5, 10  $\mu\text{m}$ ), UV 살균관이 포함되어 있는 형태로 구성되어 있다 (그림 3-2-13). 사육조로 공급된 해수는 여과조로 모이게 되는데, 여과조 내에는 침전조 및 생물학적 여과조가 포함되어 펌프를 통해 냉각기로 공급되며, 이후 protein 스키머를 통과하면서 해수 속에 들어있는 단백질을 제거하게 된다. 이렇게 단백질이 제거된 해수는 카트리지 필터를 통과하면서 해수 속에 남아 있는 고형 유기물질이 걸러지게 되고 마지막 단계에서 UV관을 통과하면서 해수 속에 포함된 세균 및 박테리아를 제거 후 공급수로 사육조에 유입되게 된다.

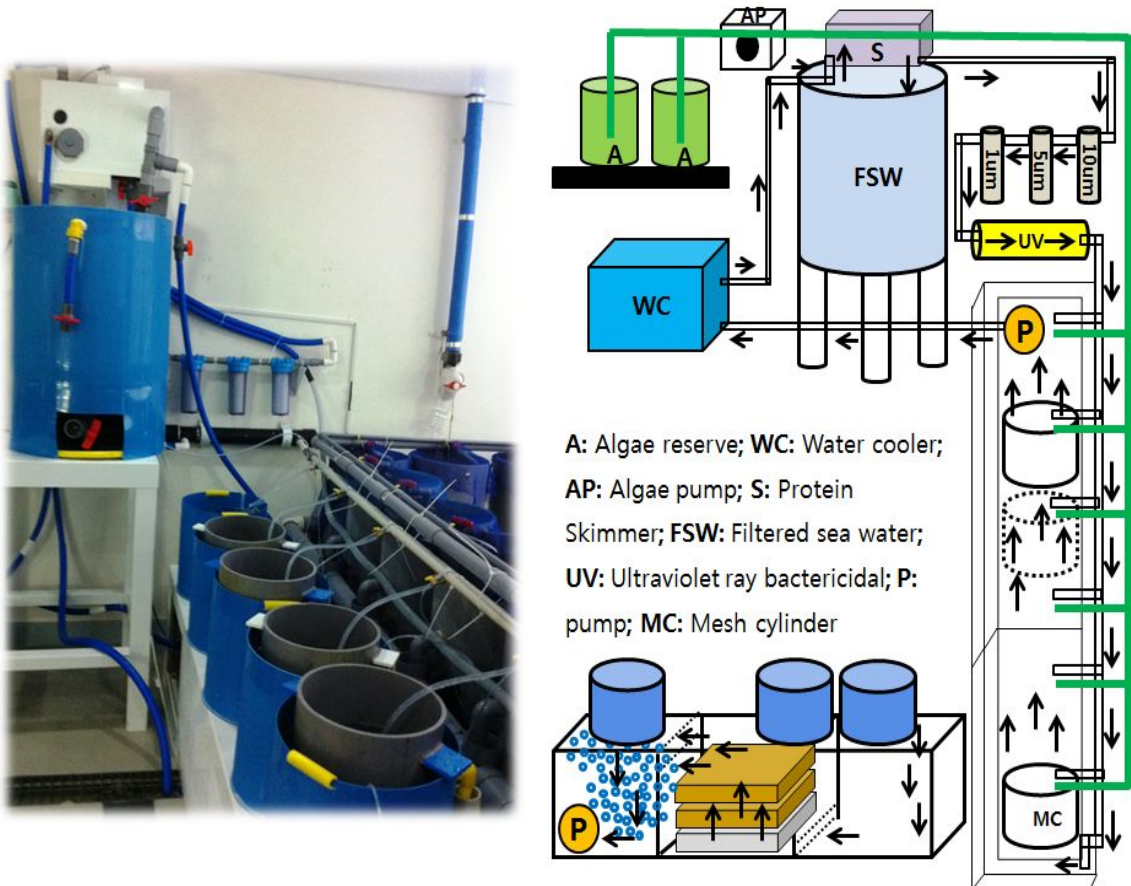


그림 3-2-13. 모패 순치 및 치패사육을 위한 사육시스템 모식도

### (3) 모패 채집 및 장소

모패는 2011년 8월13일 제주시 김녕항에서 채집 하였다 (그림 3-2-14). 채집 당시 수온은 21.5℃, 염분은 21.1 psu였다. 채집된 모패는 50개체였으며 패각의 길이는  $39.8\pm 2.8$  mm, 습중량은  $4.6348\pm 1.2$  g 이었다.

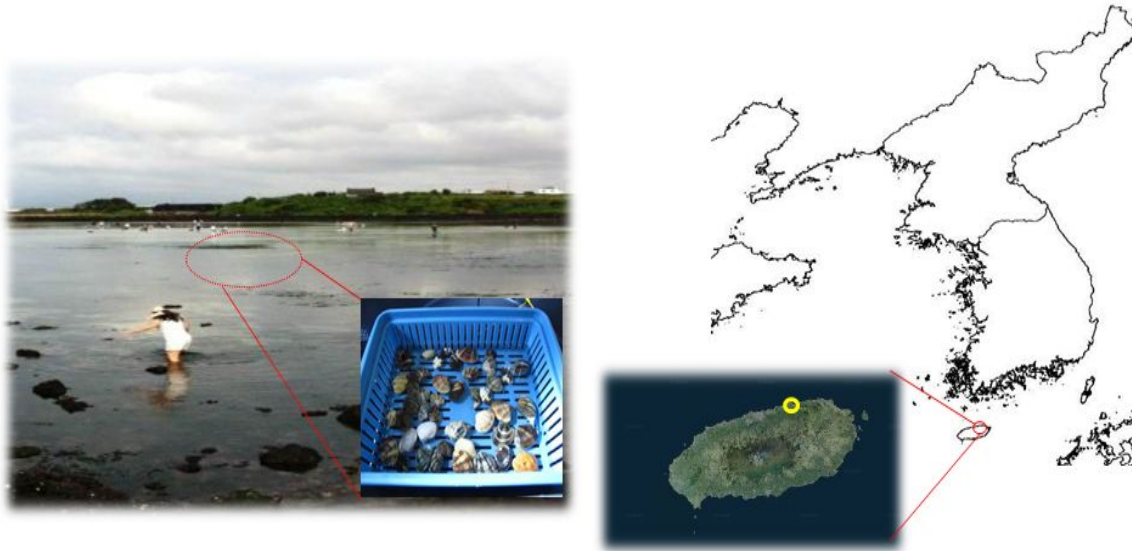


그림 3-2-14. 채집 장소 (제주시 김녕항)

### (4) 바지락 모패 순치 및 산란 유도

채집된 바지락은 실험실로 옮겨 수온 24℃, 염분 33.4 psu의 해수에 2일간 순치시켰다. 실험에 사용된 바지락은 산란에 임박한 상태로 육안으로 암수의 판별이 가능하였다. 수컷의 경우에는 외투막의 색이 선홍빛인 반면, 암컷은 외투막 색이 우유빛을 띠었다 (그림 3-2-15).

순치 2일경인 8월 15일 00:00경 바지락의 자연 산란이 관찰하였다. 바지락은 채집 당시 성숙한 단계이므로 별도의 산란 자극없이 실내 수조내에서 수온 및 염분 자극에 의한 자연 산란이 이루어진 것으로 추정된다 (그림 3-2-16).

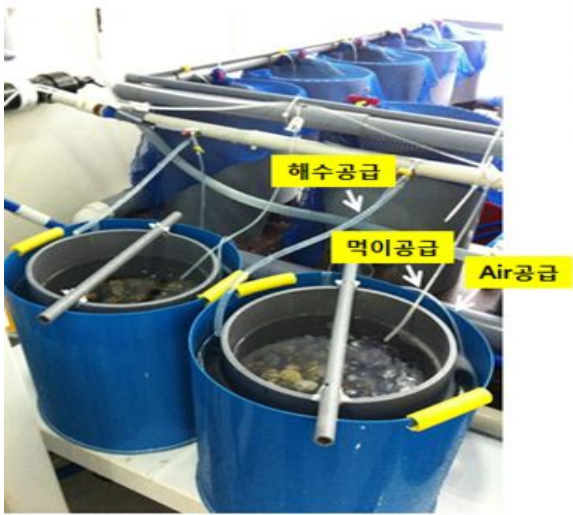


그림3-2-15. 바지락 모패의 순치 및 완숙한 바지락의 외부모습

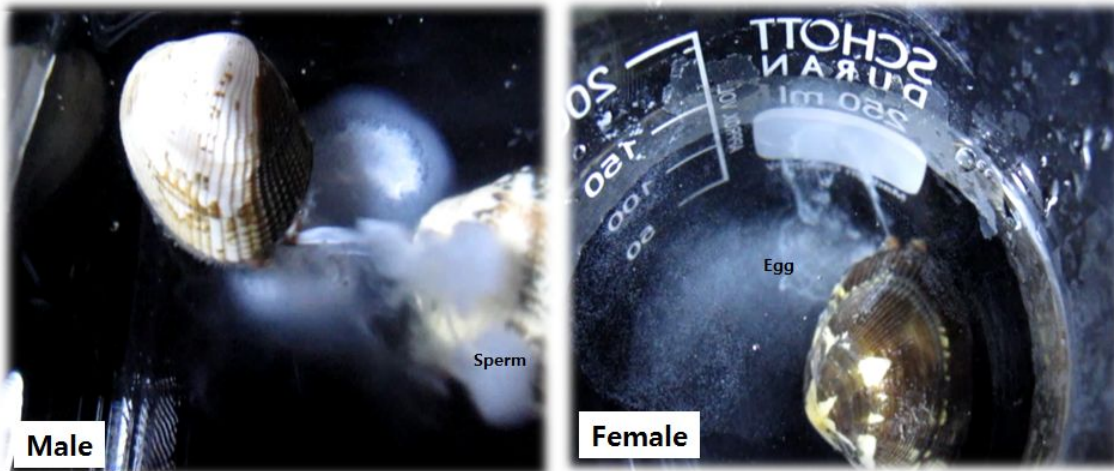


그림3-2-16. 산란하는 바지락 암컷과 수컷의 모습

## 나. 연구결과

### (1) 바지락의 유생관찰

바지락 유생 발달 과정은 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 광학현미경을 이용한 바지락 유생발달 단계는 그림 3-2-17과 그림 3-2-18에 나타냈으며, 장방출주사전자현미경을 통한 유생발생 단계는 그림 3-2-19와 그림 3-2-20에 나타냈다.

방난 된 수정난은 55~60  $\mu\text{m}$  크기였으며, 수정 후 1시간 경과되면서 극체가 형성되었다. 이후 2 cell, 4 cell, 8 cell이 진행되면서 수정 약 5시간 후에는 gastrula stage가 관찰되었다. 이 시기에는 prototroch가 발생하면서 자유유형을 하는 개체들이 관찰되었다. 수정 약 19시간 후부터는 먹이섭이를 시작하는 D-larvae가 관찰되었다. 특히, 먹이 섭이를 한 D-larvae의 소화맹낭에서는 섭이한 플랑크톤 (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis*)이 광학현미경상에서 관찰되었다. 수정 2일 후 바지락 유생은 early D-shaped 단계가 되면서 velum이 형성되었다. 4일 후 straight hinge veliger (124.7  $\mu\text{m}$ ) 단계를 거치면서 10일 후 early umboned veliger (153.4  $\mu\text{m}$ ), 17일 후 late umboned veliger 그리고 수정 후 21일 foot이 발생하면서 pediveliger (217.8  $\mu\text{m}$ ) 단계가 되었고 최종적으로 36일째 siphon이 발생되면서 post-larvae stage가 되었다. 유생 발달 관찰 기간동안 바지락의 일일 성장률은 4.6  $\mu\text{m}$ 였으며, early post set 단계의 바지락의 크기는 281.2  $\mu\text{m}$  였다.

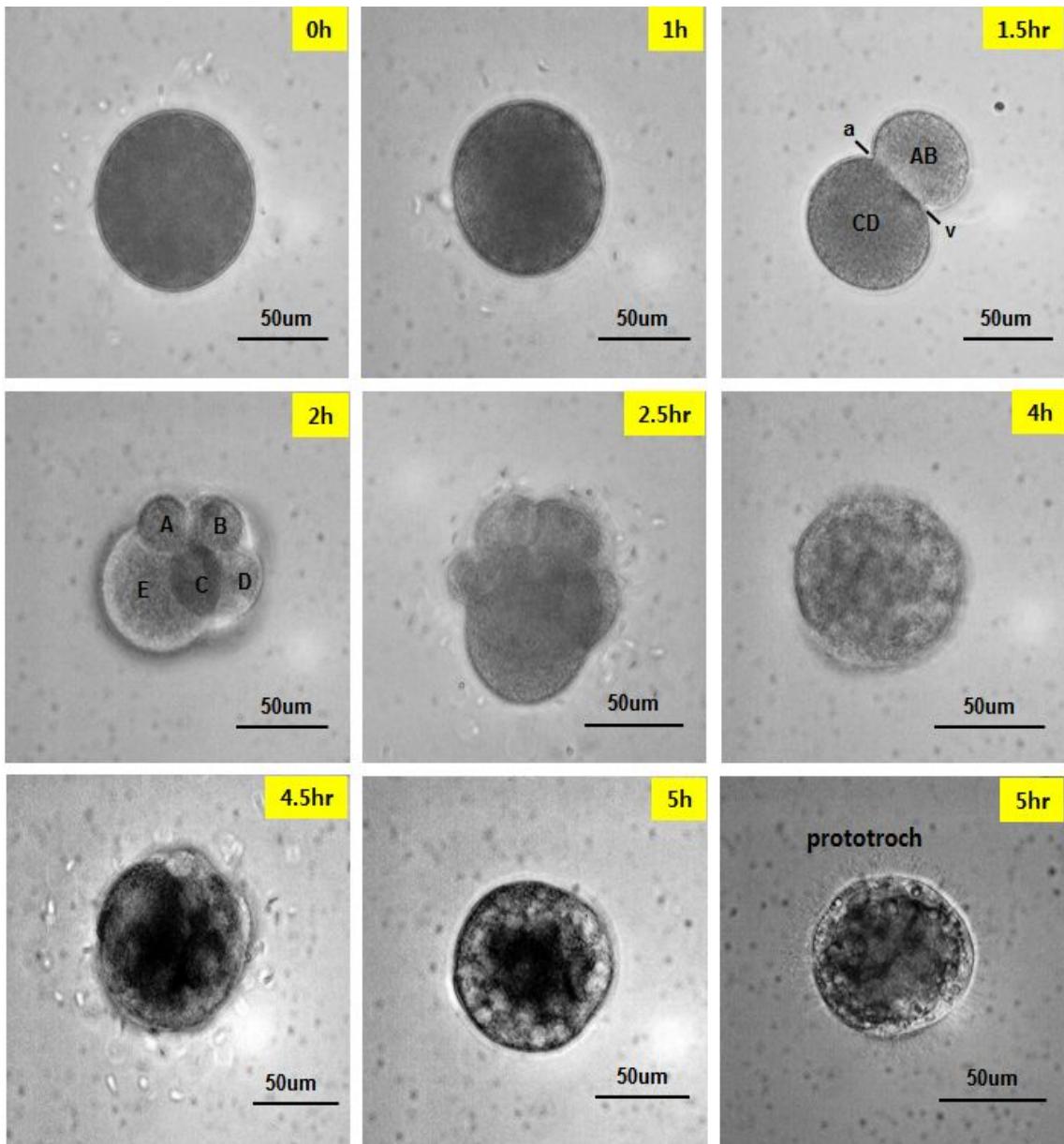


그림 3-2-17. 광학현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 I



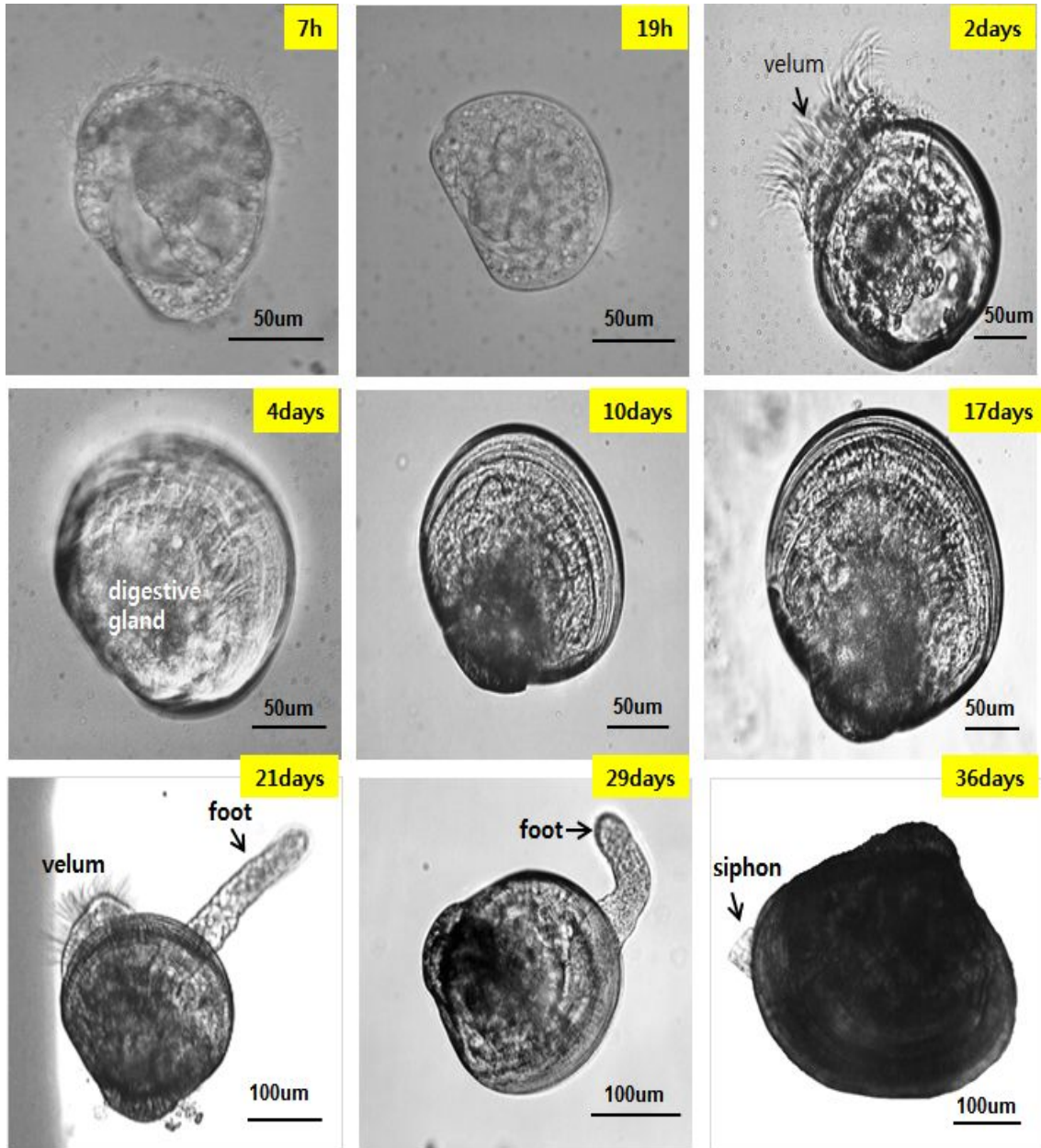


그림 3-2-18. 광학현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 II

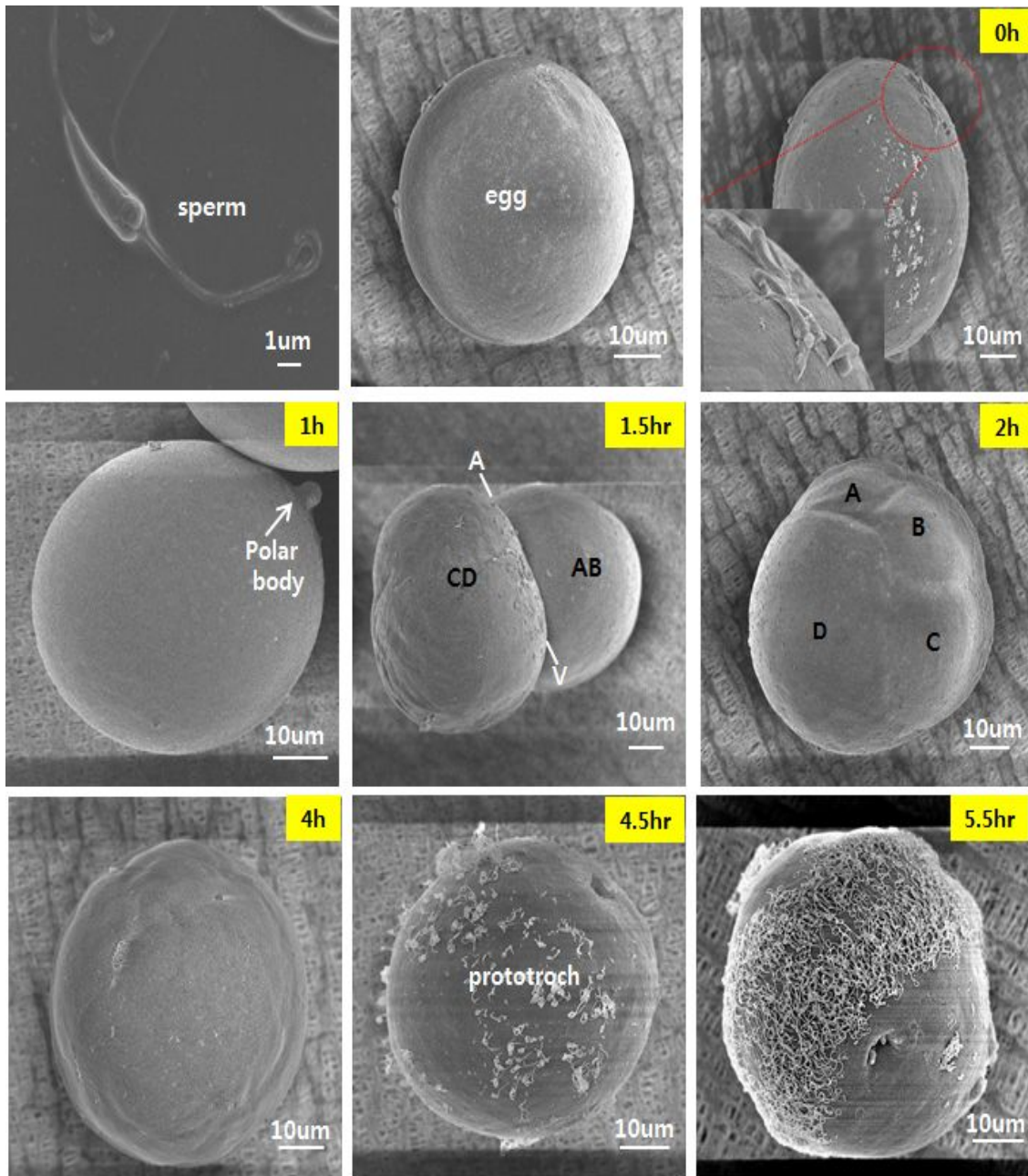


그림 3-2-19. 전자현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 I

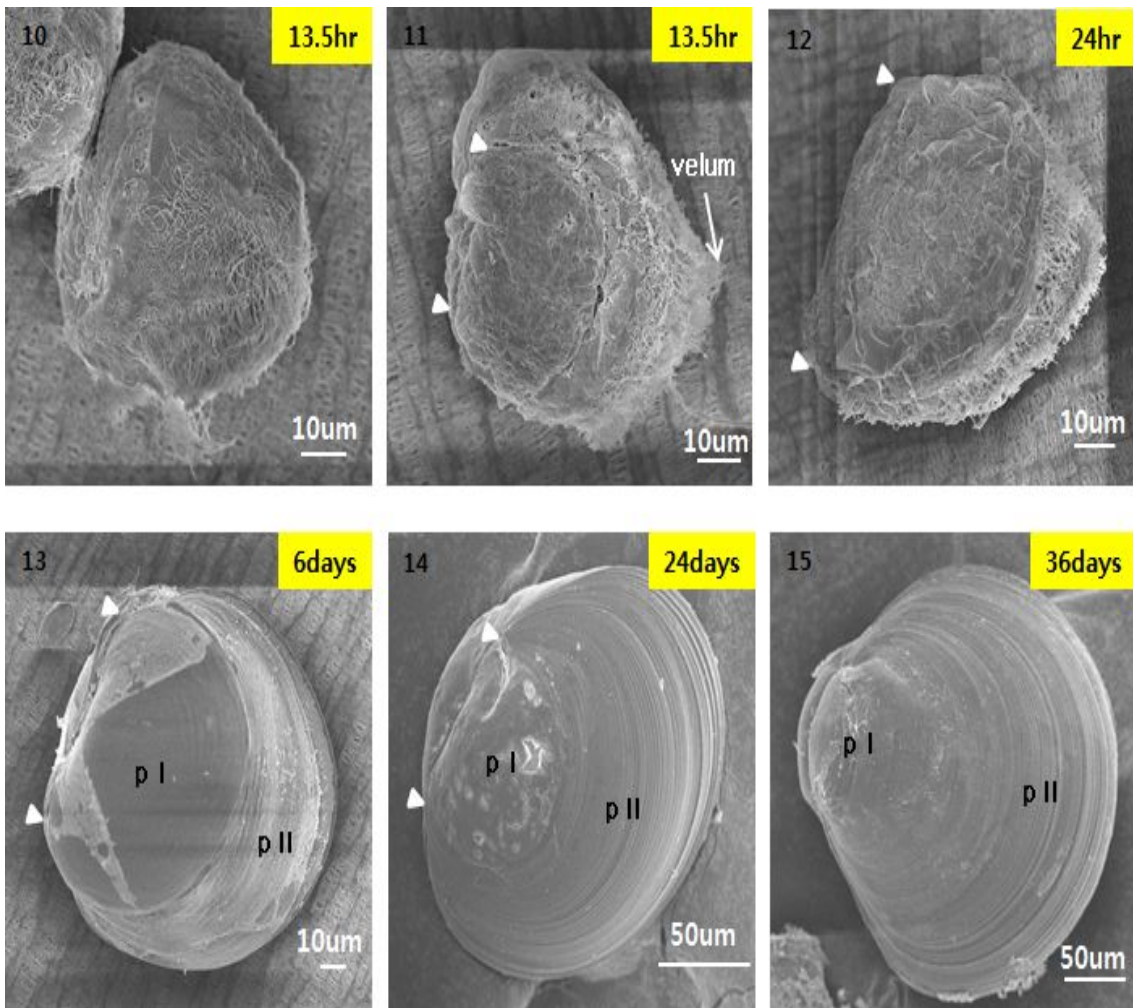


그림 3-2-20. 전자현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 Ⅱ



## (2) 바지락의 유생의 성장률

바지락 유생은 36일간 수온은  $24.7 \pm 1.7^\circ\text{C}$ , 염분은  $32.7 \pm 1.1$  psu, 용존산소  $6.4 \pm 0.6$  mg/L의 환경에서 사육되었다. 바지락 유생은 36일 동안 서서히 그 크기가 증가하였으며, D-larvae 이후 early post-set 단계까지 총 36일이 소요되었다 (그림 3-2-21).

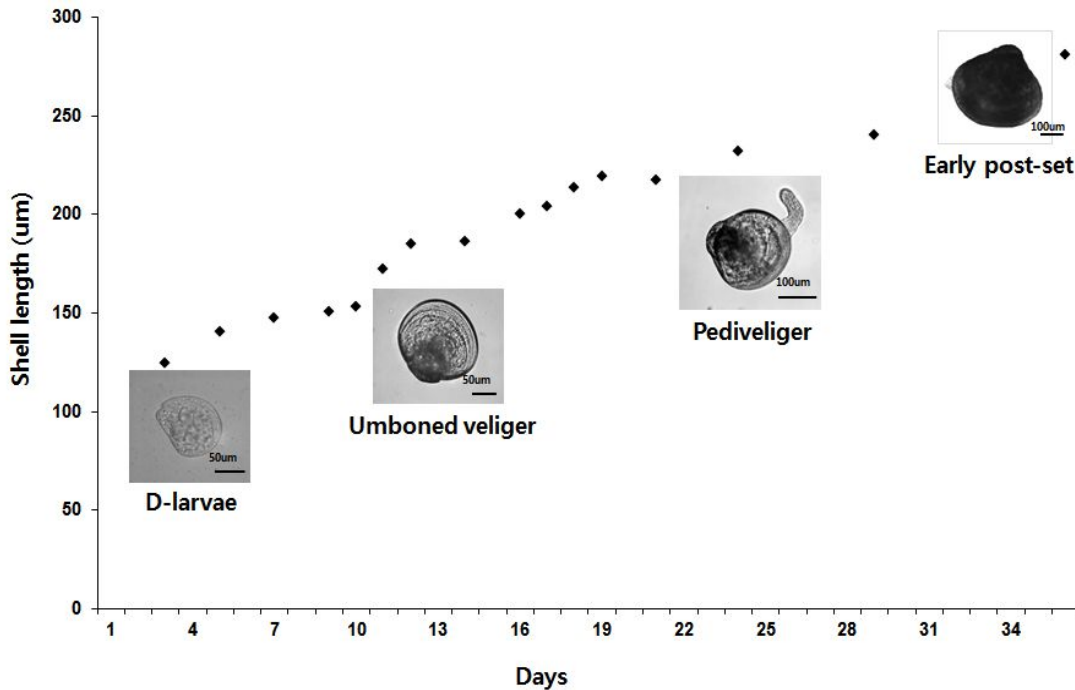


그림 3-2-21. 바지락 유생의 성장률

## (3) 바지락 모패의 산란 전·후 비만도 변화 및 산란양 변화

바지락 모패의 산란 전·후 비만도 변화 및 산란량의 변화를 확인하였다. 바지락 15개체를 이용하여 바지락 건중량과 패각 건조중량의 비로 비만도(CI)를 산출하였다.

$$CI = \text{바지락 건중량 (g)} / \text{패각 건조중량 (g)}$$

번식량 측정은 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 이용하여 측정하였다 (Park et al., 2004). Park et al. (2004)에 의해 개발된 바지락 알에 대한 다클론 항체를 1차 항체로 사용하였고, 2차 항체는 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG를 이용하여 측정하였다. 알 하나의 건조중량에 대한 난 단백질량의 비례식을 이용하여 ELISA에서 추정된 총 난 단백질의 양으로부터 알의 총 건조중량을 환산하였고, 생식소지수 (Gonad Somatic Index, GSI)는 개체의 총 건조 중량에 대한 알의 건조 중량 비율로 계산하였다. 포란도는 생식소 지수가 값에 총 바지락 건조중량을 나눈 후 바지락 난 중량  $0.000000022$  ng (Jasim, 2008)를 나누어 환산하여 나타내었다.

실험 결과, 바지락 모패의 비만도 (CI)는 산란 전  $0.07 \pm 0.02$ 의 범위를 보였고, 포란도는

13,014,754±5,138,527개로 측정되었다. 산란 이후 바지락 모패의 비만도는 0.05±0.01로 감소하였고, 포란도는 6,225,637±3,208,183개의 범위를 보여 약 5백만개의 난을 산란 한 것으로 추정되었다 (그림 3-2-22).

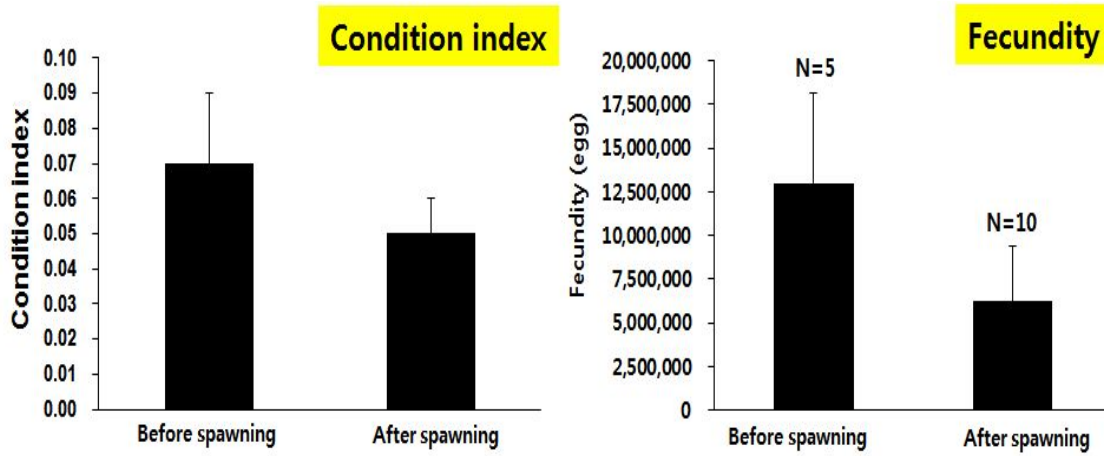


그림 3-2-22. 산란 전·후 바지락 모패의 생리적 변화



### 3-3절 바지락치패 인공종묘 생산

#### 1. 바지락 치패 종묘 생산 시스템에 관한 연구

##### 가. 바지락 모패 구입

인공종묘 생산에 있어 우량종묘를 얻기 위해서 우량 모패 확보는 불가결하다. 이번 인공종묘 생산에 사용된 모패는 전라남도 여수 소경도, 무안 송계, 해남 구림리, 고흥의 남성리, 전라북도 고창, 충청남도 태안의 황도, 파도리 등지에서 구입되었으며, 바지락의 산란기인 6~7월경에 구입하였다. 최남단에 위치하여 바지락의 산란 시기가 가장 빠를 것으로 예상되며, 그 크기가 상대적으로 큰 전남 고흥 남성리에서 구입한 바지락 모패를 산란용으로 우선적으로 이용하였고 2차년도도 마찬가지로 남해안 지역의 바지락 생산지 중 6개 지역 (고흥 남성리, 고흥 백일도, 여수 선소, 강진 하저, 해남 구림리, 무안 송석리)의 모패를 육안으로 비교한 결과, 고흥 남성리의 바지락이 가장 크고 육질의 비만도가 가장 좋아 모패로 이용하였다 (그림 3-3-1).

그림 3-3-1. (위쪽 좌측부터 시계방향으로) 고흥 남성리, 강진 하저, 여수 선소, 고창 곰소바지락 모패



2차년도는 1차년도의 원생동물, 흡혈충 등이 모패에 기생 혹은 공생하여 이를 자연스럽게 제거하기 위해 모패관리 과정을 실시하기 위해 구입 시기를 4월경으로 앞당겼다 (그림 3-3-2). 그러나 예년보다 수온이 낮았던 관계로 대부분 알이 차있지 않은 미성숙된 모패였다. 따라서 인위적으로 수조에 입식하여 성숙단계로까지 먹이생물을 급이하여 실험하였다.

3차년도에는 신안군 지도읍에서 고흥 남성리의 바지락을 이용해 1차 산란을 진행하였고 거제도로 양식장을 옮겨 2차례의 바지락 산란을 진행하였다. 양식장 이전으로 거제도에서는 바지락 모패 구입시기가 늦어져 충청남도 태안시의 라향어촌계에서 8월 초에 바지락을 구매하여 실험을 실시하였다 (그림 3-3-3).



그림 3-3-2. 2010년 4월 남성리 바지락 모패 (미성숙 상태)

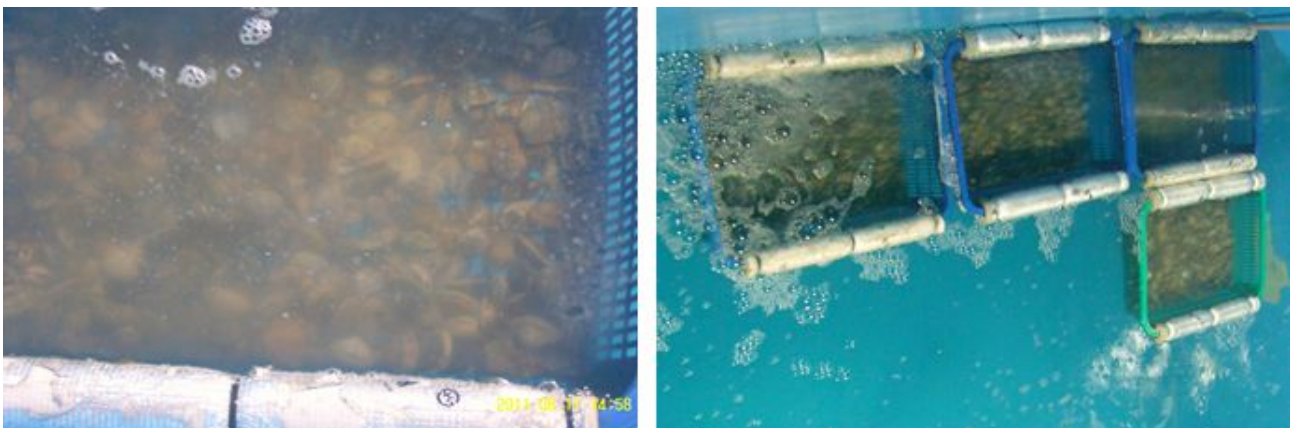


그림 3-3-3. 2011년 8월 충남 태안시 라향어촌계 바지락 모패 (산란중)



## 나. 모패 관리

모패 관리는 치패 생산 현장인 전라남도 신안군 지도읍에 위치한 전라남도 해양바이오 연구원 패류동으로 운반하였으며 운반 과정에서 가능한 자극이 되지 않도록 시원한 냉장 상태로 운반하였다. 바지락 생산 현장 (고흥 남성리)에서는 바지락을 크기별로 분류할 수 없기 때문에 본 패류양식장에서 바지락 모패의 패각 성장윤의 간격이 넓고 (빠른 성장을 지시함) 크기가 큰 3~5년생을 분류하였다. 또한 크기가 작거나 커도 연령이 있는 바지락은 모패에서 제외시켰다. 평년과 같으면 남성리 바지락 모패는 5월 중에 상당히 성숙되어 있을 것으로 추정하였지만, 2차년도인 2010년 초에는 예년보다 온도가 낮았던 까닭으로 충분히 성숙한 상태는 아니었다. 이러한 상태의 모패를 60 kg을 구입하여 지도 패류양식동으로 운반하였고, 도착 즉시 3 ppm의  $\text{KMnO}_4$ 으로 모패를 세척하였다. 이는 모패에 내부뿐 아니라 외부에도 다양한 형태의 기생충 또는 병원균 등을 포함하고 있을 가능성이 있기 때문에 부화하기 이전 모패를 가능한 깨끗한 상태로 유지시켜 놓는 것이 중요하다. 모패를  $\text{KMnO}_4$ 으로 세척하고 부화조에 입식한 이후에도 물갈이를 통해 바지락 내부에 있는 다양한 기생충 및 원생동물 등을 제거시켰고 구입한 모패가 알이 차있지 않았기 때문에 모패 관리조에 먹이를 충분히 공급하여 산란시기를 앞당기기 위해 모패 관리조에 4회/day 간격으로 물색의 변화에 따라 먹이생물을 주입하였다 (그림 3-3-4). 모패사육탱크의 수온은 23°C로 유지하였고, 사육수는 모래여과기 및 미세공극필터로 여과된 해수를 공급하였다. 환수시 사육수는 부분환수를 실시하였다.



그림 3-3-4. 바지락 모패 구입 후 모패 관리. 먹이생물 주입 전 후 (좌, 우)

## 다. 먹이생물 배양 및 공급 방법

### (1) 치패의 먹이생물 선호도 파악 후 먹이생물 공급비율 선정

대량생산된 먹이는 부유단계와 착저한 유생, 그리고 그 이후 치패의 먹이로 공급되며 1, 2차년도 조사를 통해 바지락 유생은 산란 직후 60~80  $\mu\text{m}$ 의 크기를 가지므로, 초기의 먹이생물은 10  $\mu\text{m}$  이하가 대량으로 배양되어야 했다. 부하 직후의 먹이는 5  $\mu\text{m}$  전후의 크기를 주로 공급하였고 바지락이 유생단계를 거쳐 착저를 하게 되면 일반적으로 약 200  $\mu\text{m}$  크기에 이르게 되고, 이때 먹이생물은 10~20  $\mu\text{m}$  크기의 먹이생물을 집중적으로 공급하도록 하였다. 조사 결과 초기 바지락 유생이 각정기까지 성장하는데 필요한 주요 먹이원은 *Isochrysis galbana*와 *Chaetoceros mulleri*였고 특히 *Isochrysis galbana*는 직경이 5~7  $\mu\text{m}$ 이고 세포벽이 없어 바지락 유생에게는 최적의 먹이 원이었으며 *Chaetoceros mulleri*도 소형으로 대다수 개별 생활을 하고, 규조류 중에는 고온에서도 적응성이 매우 높은 종으로 패류종묘생산 시 주요 먹이원으로 적합한 것으로 보였다. 그 후 각정기에서 착저 하기 전까지의 먹이 공급방법은 *Isochrysis galbana*와 *Chaetoceros mulleri*에 *Platymonas subcordiformis* 혹은 *Tetraselmis suecica*를 2 : 2 : 1로 혼합하여 먹이원을 선택적으로 섭취할 수 있도록 하였다. 바지락 치패의 크기가 500  $\mu\text{m}$  이하까지는 위 먹이비율을 유지하도록 하였고 500  $\mu\text{m}$  이상으로 성장한 바지락 치패는 상기 먹이생물 공급 비율을 1 : 1 : 2로 전환하여 공급하거나 *Isochrysis galbana* 또는 *Chaetoceros mulleri* 중 하나만을 선택하고 *Platymonas subcordiformis*를 포함하여 두 가지 종류의 먹이생물을 공급하였다. 바지락의 먹이생물 선호도는 종류도 중요할 수 있지만, 유생의 크기가 60~80  $\mu\text{m}$ 이므로 먹이생물의 사이즈에 의존하는 것으로 판단된다. 즉 바지락의 먹이생물 선호도는 초기 유생단계에서는 *Isochrysis galbana*와 *Chaetoceros mulleri*인 것으로 파악되었다. 또한 먹이생물 별 대량생산이 가능한 수온을 구분하였으며 일부 낮은 수온이나 높은 수온에서 대량생산이 잘 되지 않는 종을 대체 할 수 있는 종을 먹이생물 대량 생산과정에서 연구하여 이를 표시하였다. *Isochrysis galbana*는 바지락이 초기 유생단계에 가장 선호하는 종으로 18~28°C의 수온 범위를 보여 낮은 수온에서는 대량생산이 잘 되지 않았다. 이를 대신하여 *Nitzschia* sp.를 배양하였으며 적정 수온은 낮은 *Isochrysis galbana* 보다 낮은 15~23°C로 나타났다. *Platymonas subcordiformis*는 대량 배양 가능한 적정 수온이 18~27°C로 전반적으로 나타났다. 대체로 바지락 먹이생물로 사용한 *Platymonas subcordiformis*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros mulleri*, *Dicrateria inornata*, *Isochrysis galbana* 는 평균 22°C 수온에서 배양시 바지락 먹이생물의 대량 배양이 모두 가능하여 이른 시기에 먹이생물을 배양할 때는 보온이 가능한 수조가 용이할 것으로 보인다.

## (2) 배양시설에 따른 먹이생물 공급 방법

먹이생물 배양을 실내에서 실시하는 경우 원종에서부터 초기 배양을 거쳐 6톤 수조에서 대량 배양한 뒤, 파이프를 연결하여 직접 부화조로 공급하는 방법을 사용하였으며 이와 같은 방법은 전라남도 해양바이오 연구원의 패류동에 설치되어 현재도 운영 중에 있다. 단지 밀도 상태에 따라 공급량을 자동적으로 급이 하지는 못하고 있으나 본 과제에서는 수동으로 작동하는데 큰 불편은 없었다 (그림 3-3-5).

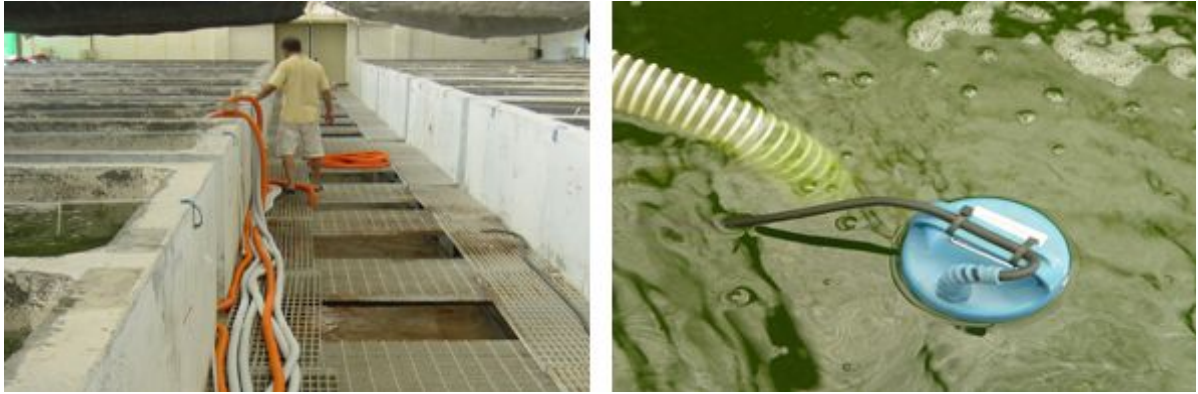


그림 3-3-5. 평면배치 양식장의 수동형 먹이 공급 방법

3차 년도에는 거제도 둔덕면 술역마을에 위치한 두양수산에서 먹이생물 배양 및 바지락 유생의 생산을 위한 실험을 실시하였다 (그림 3-3-6, 3-3-7). 종패장의 평면배치가 아닌 먹이배양시설이 3층으로 배치된 배양장의 맨 꼭대기 층에 위치하여, 먹이생물의 공급 방법이 동력펌프를 사용하지 않고 siphon에 의하여 먹이생물에 스트레스를 주지 않고 중력에 의하여 효율적으로 공급할 수 있었다.





모래여과기



해수펌프



3층 먹이생물 대량 수조



대형수조 먹이생물 배양



주변소모품



온열장치, 공기주입

그림 3-3-6. 거제 두양수산 모래여과 시설과 펌프 및 대량배양 수조



원종 냉장보관



2단계 배양



2단계 배양



3단계 배양(중형수조)

그림 3-3-7. 거제 두양수산 먹이생물 2, 3단계 수조



## 라. 바지락 산란 및 수정

1차년도에는 확보된 바지락 모패로부터 축제식 양식장과 수조에서 자연 산란 수정을 유도하였다. 축제식 양식장에서의 바지락 산란은 해남군 황산면 옥동리에서, 육상 실내 수조에서의 인공종묘생산은 전남 신안군 지도에 있는 전라남도 해양바이오연구원의 패류동에서 시도하였다. 실내의 경우 수조에 유입된 물은 모래여과기에 백 필터를 거쳐 유입된 해수를 사용하였으며, 바지락을 수조에 투입하기 전, 수조에 붙어 있는 각종 오염물질 등을 정화하였다.

바지락 산란 시기는 알의 모양과 상태를 보고 판정할 수 있는데, 모패를 절개하였을 때 생식소의 부드러운 정도와 비만도를 확인하여 알 수 있으며 현미경 관찰 시에는 slide-glass에 펼쳤을 때 잘 성숙된 알과 정소조직에 해수를 가하면 정자의 운동을 관찰함으로써 성숙 정도를 확인할 수 있으며, 대체로 수컷이 암컷에 비하여 숙성이 빨리 되는 경향이 있었다. 일부 수컷이 성숙되었다고 전체 모패가 충분히 성숙되었다는 것은 아니므로 여러 개체의 조사가 필요하다. 난자의 경우는 난 주변의 투명한 테두리가 없어지고 난자만 까맣게 나타났을 때가 산란시기가 임박했다는 것을 의미한다 (그림3-3-8).

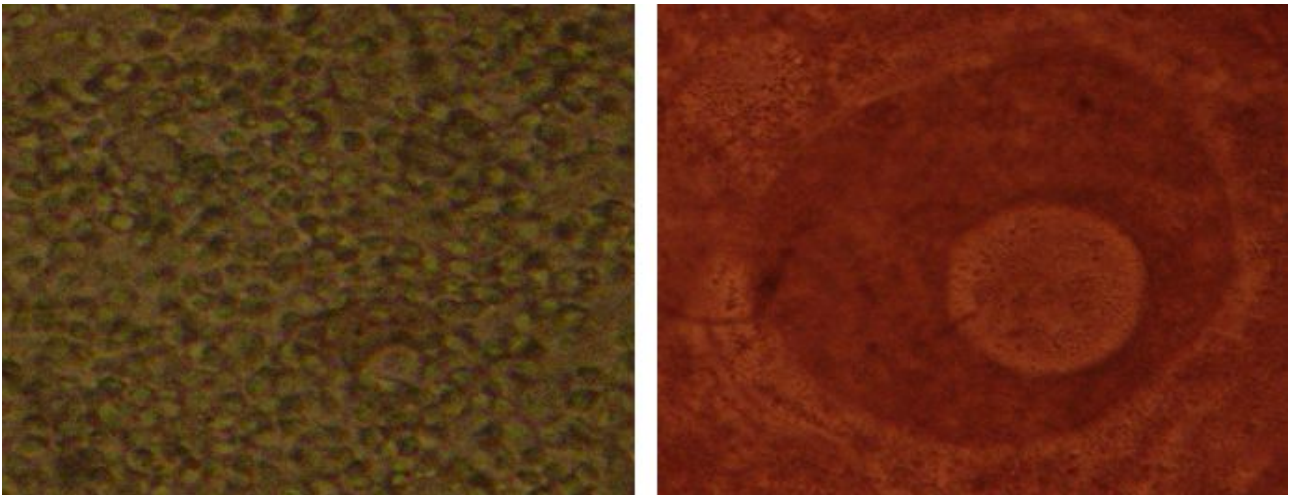


그림 3-3-8. 현미경으로 관찰한 바지락의 정자와 난자

바지락 모패의 산란이 임박하였다고 판단되면, 1단계로 산란판에 올려놓고 4~5시간 동안 실외에 차광막을 쳐서 건조자극을 주며 1단계 방법을 사용하여도 산란을 하지 않을 시에는 2단계로 담수에 30분 정도 담갔다가 산란되는지 여부를 관찰한다. 2단계 방법을 사용하여도 산란이 이루어지지 않을 경우, 바지락을 냉장조에 약 30분가량 넣고 냉자극을 가하여 인공적으로 산란을 유도한다. 1차년도는 충분히 성숙된 바지락으로 산란조에 투입된 이후 6시간 이내에 산란하였으며 2차, 3차년도에는 4~5시간의 건조 자극만으로도 바지락 산란이 원활하게 이루어졌다 (그림 3-3-9).



그림 3-3-9. 성숙된 바지락 모패의 건조 자극

산란이 이루어지는 산란조에는 EDTA를 3 ppm으로 만들어 넣고, 비타민 1정 (0.1 g)을 부화조에 넣어준다. 산란이 임박한 바지락 모패는 산란판에 올려 산란조에 설치하였다. 충분한 산소공급과 자극이 가도록 하기 위해 에어볼을 산란판 하단으로 이동시켰다 (그림 3-3-10). 1~3차년도 모두 바지락 산란은 12시~새벽 2시경 어둡고 조용한 상태에서 이루어졌으며 부화조의 수온은 23℃로 맞추고, 수정란 밀도가 15~20 개체/mL 될 때까지 지속적인 현미경 관찰을 하여 바지락 모패가 담긴 산란판을 다른 수조에 옮기거나 수조에서 제거하였다.



그림 3-3-10. 성숙된 바지락 모패의 산란수조에서 산란

본 패류양식장에서는 산란조에 유생밀도를 측정하고 양호한 수정밀도가 되면 다음 부화조로 산란판을 이동시켜, 계속적으로 산란을 유도하였다. 1차 년도에는 대략적으로 1 mL당 유생이 20개 정도로 유지시킨 뒤, 모패는 산란조에서 제거하고 수조의 바지락 유생은 2~3시간 간격으로 현미경 관찰을 통해 발생단계를 기록하였다. 2차 년도에는 상기에서 언급한 바와 같이 15~20 개체/mL가 되어야 하지만, 실제 현장에서는 충분히 성숙이 되지 않은 상태에서 일부 산란이 이루어져 9톤 수조에 8개체/mL의 밀도로 유생이 관찰 되 수조 당 7,200만 개체가 생산되었고 총 5개 수조에서 산란하여 전체적으로는 3억 6천만 개체의 유생이 생산되었다. 3차 년도에도 지도현장에서 산란시 15~20 개체/mL의 밀도로 하여 4개의 수조를 만들었고 거제도 현장에서 10 개체/mL로 산란을 유도하여 40톤 수조 1개로 4억 개체의 유생이 생산되었다.

#### 마. 유생관리

산란이 시작되고 수정이 되면 약 24시간 후에 패각이 형성된 D상 유생을 관찰할 수 있으며 바지락의 발생과정은 수정란 → 난할 → 2세포기 → 4세포기 → 8세포기 → 포배기 → 담륜자기 → D상유생기 → 각정기 → 침착기 → 치패순의 과정을 거쳐 성장하였다. 이를 그림 3-3-11에 나타냈으며 이는 3차 년도에 D상 유생기까지의 변이를 시간상으로 나타낸 것이다. 그 후 2주일 정도 육상수조에서 관리를 하면 각정기를 거쳐 바지락 유생은 200~300  $\mu\text{m}$  정도의 크기가 되고, 바닥에 착저하게 된다. 부화된 유생은 초기 D형 유생단계에서 5~6일 동안 먹이생물을 공급하기 위하여 앞에 언급한 바지락의 먹이생물 선호도에 따른 공급비율에 따라 하루 6시간 간격으로 지나칠 정도로 충분한 먹이를 공급하였다. 본 실험에서는 5시 30분, 11시 30분, 17시 30분, 23시30분에 총 4차례 먹이생물을 펌프를 이용하여 먹이생물 공급수조에서 부화조에 공급하였고, 먹이의 과잉공급이나 해수의 오염을 방지하고자 오전 10시, 오후 10시에 물갈이를 하루 2회 교환하였다. 수조에서 유생기의 물갈이 작업은 1/3 가량의 해수를 60  $\mu\text{m}$ 의 망을 이용하여 하루 2차례 (오전과 오후) 환수를 시켜주었다.



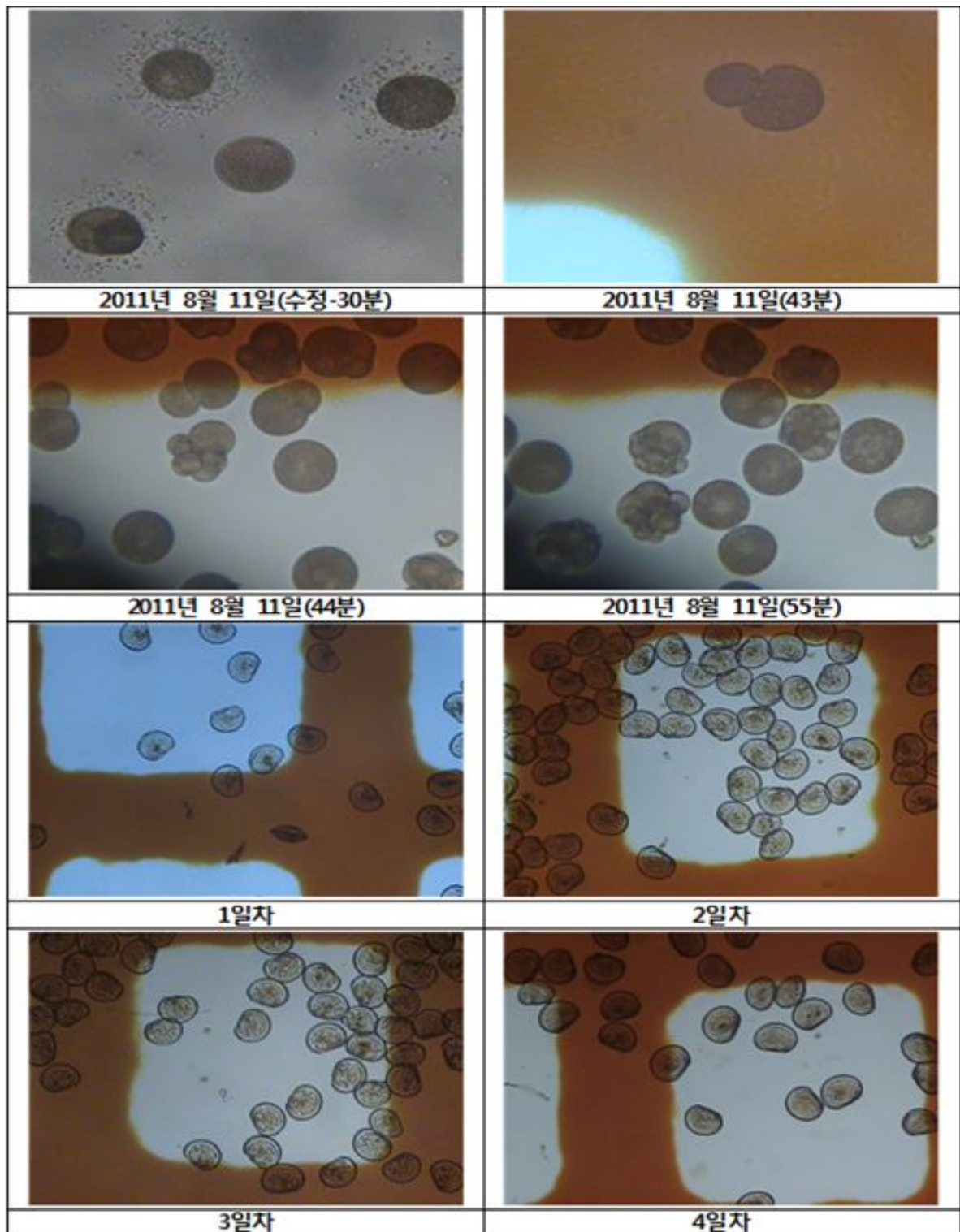


그림 3-3-11. 3차년도 수정란에서 D상 유생기 까지의 변이

## 바. 초기 치패관리

부유생활을 하는 D형 유생기에서 각정기 과정을 거쳐 착저를 하게 되면 빨이 깔려있는 수조로 옮겨주었다. 착저하기 전 바닥에는 펄을 깔아 바지락이 물의 움직임에 의해 구르면서 깨지는 것을 방지하고, 공간을 넓혀 바지락 치패의 서식공간을 넓혀주는 효과를 보일 수 있도록 하였다. 이때 사용한 빨은 전기로에서 300℃로 구워 유기물을 제거하고 솔에 삶아 결속한 상태로 만들고 이를 60 μm 망에 담아 여과해수에 연결하여 여과된 빨과 해수가 함께 서서히 흐르도록 하여 수조에 자연스럽게 주입하였다 (그림 3-3-12).



그림 3-3-12. 빨 전처리사진

이 때 수조에 설치된 브로어의 공기는 최대한 틀어 빨 입자가 한곳으로 밀리지 않도록 해주며 해수는 수조에 10 cm 정도 채우고 빨입자가 완전히 침강하면 여과 해수를 채우고 착저한 유생을 넣어줬다. 착저 후에는 수조의 수위를 낮춰 50 cm로 유지하며 하루 2회의 해수 순환을 하여 물갈이를 해 주었다. 또한 5일 간격으로 망 크기를 달리하여, 바지락 유생을 크기별로 분리하고 수조 이동을 해 주었다. 그 후 3~4주 정도 관리하면 약 600 μm 정도의 크기가 되며, 이것은 물러 가재 등을 이용하여 채묘하고 중간 배양장으로 이동시키거나 1~2 mm까지 크기를 키우고 중간 배양장으로 이동시켜준다. 착저용 틀은 가로가 91 cm 세로가 76 cm 높이가 4.5 cm이며 바닥과 옆면이 채로 되어있다 (그림 3-3-13). 바지락 유생이 착저하도록 틀의 안쪽에 건축용 부직포, 부직포, 아세테이트지, 장판 등을 깔고 이를 실리콘을 이용하여 접착하였다. 그 후 독소를 빼내기 위해 KClO<sub>3</sub>가 담긴 소독조에 일주일가량 담아 놓았다. 그 후 빨, 모래, 빨과 모래를 섞어 담아 준 후 착저판을 완성하였으며 이를 수조에 위·아래로 50 cm 간격을 두고 고정하여 바지락 유생관리조를 만들어 주었다. 그리고 착저단계에 온 바지락 유생을 살포하여 수조바닥을 포함하여 착저판에 안착시켰다. 기존의 사육조와는 달리 바닥면을 여러겹 만들어줘 한 수조에서 사육할 수 있는 유생의 양을 증가시킬 수 있었다 (그림 3-3-14).



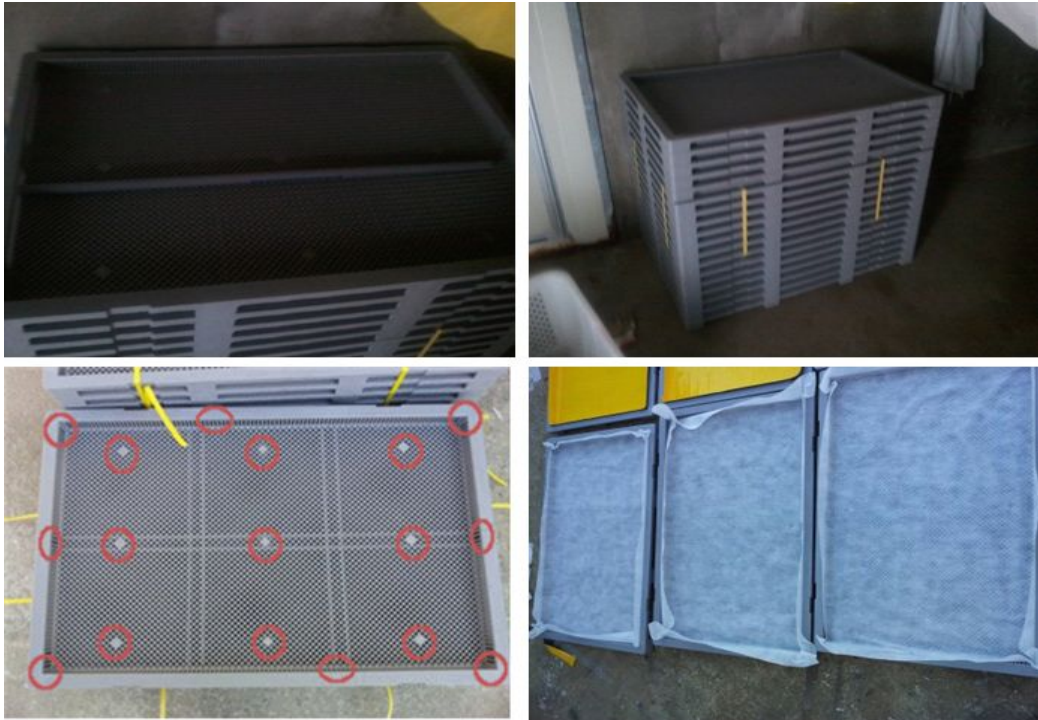


그림 3-3-13. 착저용 틀 (size: 91 x 76 x 4.5 cm)

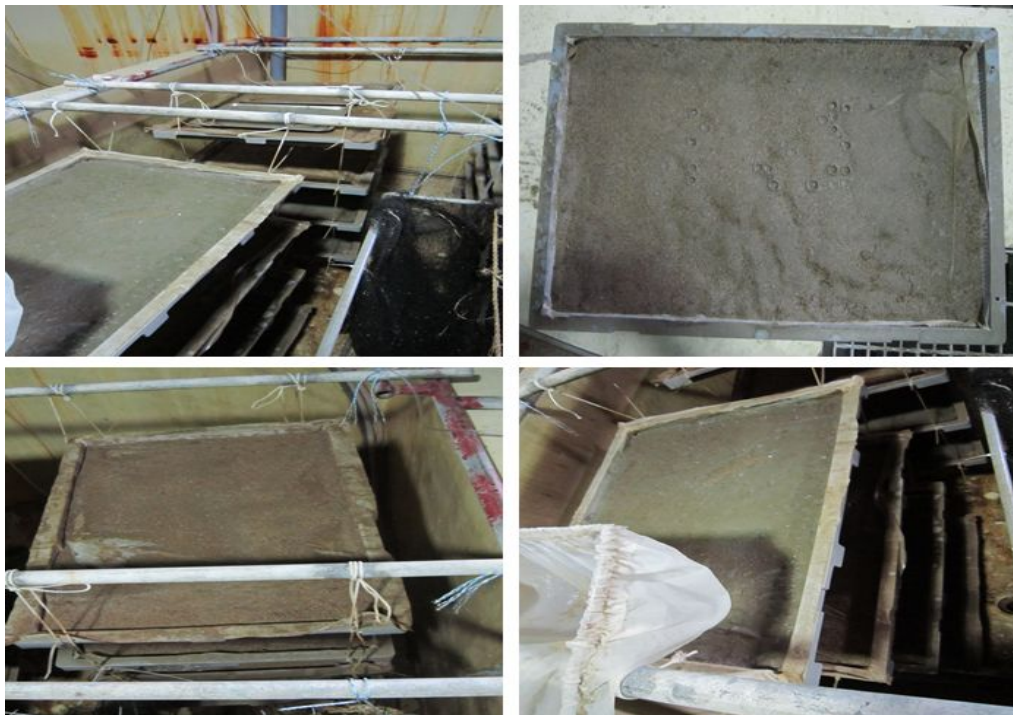


그림 3-3-14. 수조에 착저판이 설치된 모습



총 83일 동안 사육한 바지락 유생은 1.5~3 mm 까지 성장하였으며, 61일 동안 배양한 바지락 유생은 1~1.5 mm까지 성장하였다 (그림 3-3-15).

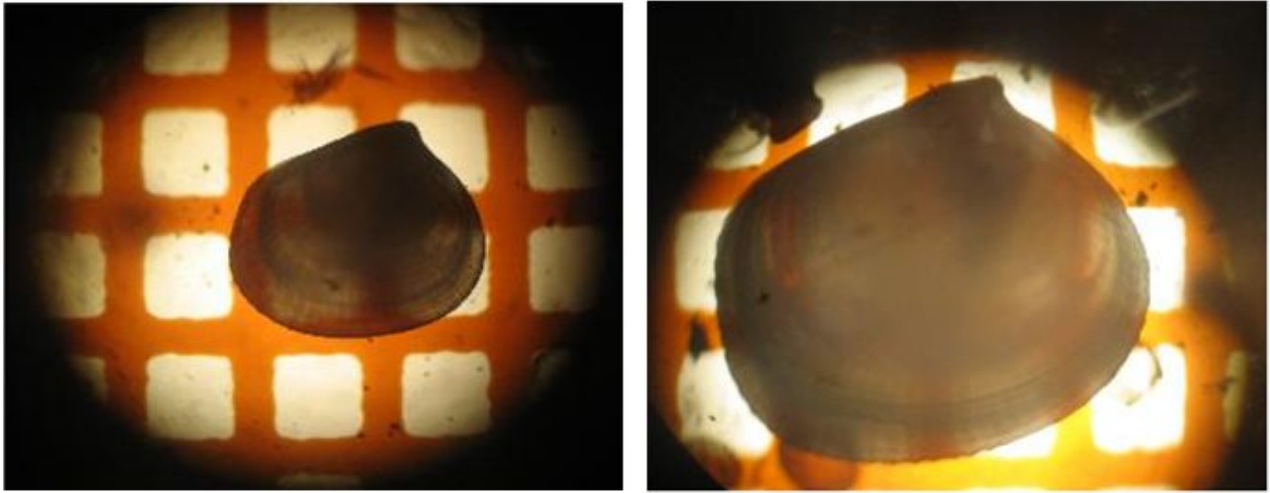


그림 3-3-15. 바지락 각정기 유생 (1.5~3 mm)

이번연구에서 산란된 바지락은 4ton 수조에 10 eggs/mL로 4억 개체의 유생이 발생이 되었다. 그러나 사육 중 이루어진 환수 및 환수시 생긴 수압에 의한 충격으로 바지락 치패가 감소하였으며, 착저 시기부터 원생동물이나 호흡충의 침입으로 인해 감모하는 양이 증가하여 최종 0.2%의 생존률을 보였다. 착저한 바지락 치패는 총 80만 개체로서 착저판 기질에서 측정하였다 (그림 3-3-16, 3-3-17).

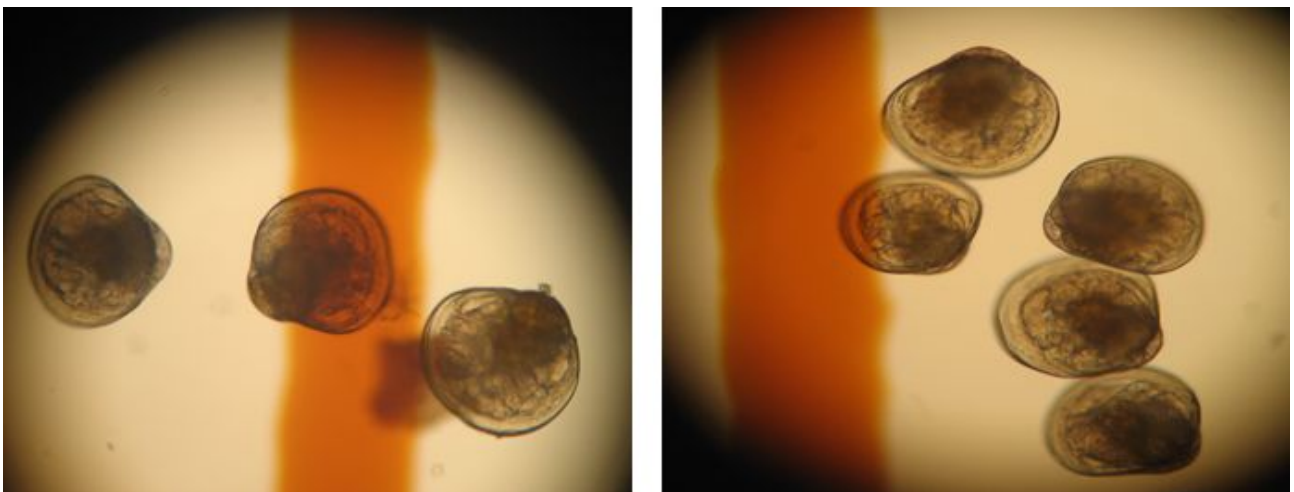


그림 3-3-16. 착저한 200 $\mu$ m의 바지락 유생

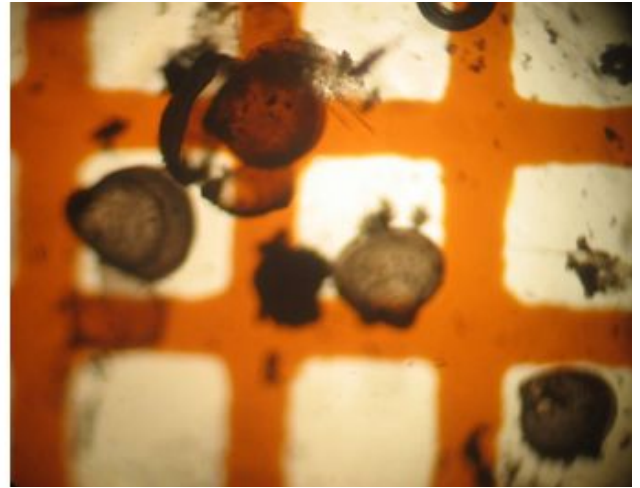
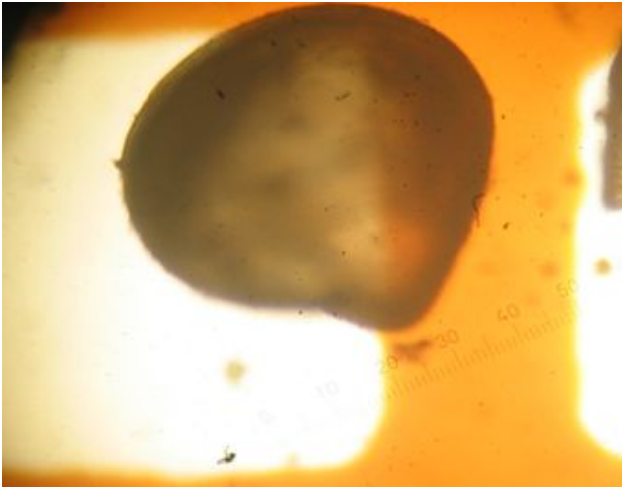


그림 3-3-17. 착저한 500 $\mu\text{m}$ 의 바지락 유생

## 2. 인공종묘 대량생산 채묘 기술

바지락 인공종묘 생산 과정 중 효율적인 채묘방법은 부유생활을 하는 D형 유생기, 각정기 과정을 거쳐 착저를 하게 되는 유생, 중간 육성장으로 옮기기 위한 채묘방법을 나타냈다.

바지락이 산란 후 D형 유생이 약 80% 이상 발생을 하면 처음으로 수조를 이동하여 준다. 이 때 패각이 얇게 형성된 상태이기 때문에 매우 조심스럽게 채묘 해야 한다. D형 유생의 크기를 고려하여 60  $\mu\text{m}$  물러가제를 사용하고 바깥부분에 큰 통을 설치하여 해수가 계속적으로 받아들여 물러가제 바깥쪽으로 수압의 영향을 줄 일 수 있도록 한다. 수조에서 해수와 유생을 함께 빼내기 위해 직경 100 mm 호스를 사용하여 유하식으로 물을 천천히 빠져나오게 한 후 준비해 놓은 물러가제 위로 흐르도록 해 준다. 이때 물러가제의 바깥쪽을 손으로 만져주고 안쪽에 유생이 많이 모이면 바가지를 이용하여 해수와 함께 다른 수조로 옮겨준다.

각정기 과정을 거쳐 착저를 하게 되는 유생의 채묘는 D형 유생기와는 달리 패각이 다소 단단하게 형성되고 유생관리 수조의 환경을 달리한다. 유생관리조는 착저하기 전 바닥에는 펄을 깔아 바지락이 물의 움직임에 의해 구르면서 깨지는 것을 방지하고, 바지락 치패의 서식공간을 넓혀주는 효과를 보이도록 했다. 따라서 빨과 노폐물을 제거하고 비어있는 패각이나 성장속도가 느려 크기가 다른 바지락 치패를 분리하여 채묘해야 한다.

이를 위해 유생 관리조에 빨을 투입 할 때 60  $\mu\text{m}$ 에 거른 세립한 빨만을 이용하며 성장한 치패의 크기를 고려하여 100, 200, 250, 320, 420  $\mu\text{m}$  물러가제로 치패를 걸러낸다. 착저한 치패의 수조에는 유생 관리조에 비해 해수가 많지 않으므로 배수구에 물러가제를 이용하여 수조의 물을 천천히 빼내고 해수가 빠지는 동안 벽면이 건조되지 않게 여과해수를 뿌려주며 바닥에 남아있는 빨과 치패를 모두 배수 시켜 여과시킨다. 이때도 물러가제가 막히지 않게 손으로 물러가제를 만져주며 빨이 잘 빠져 나올 수 있도록 해주고 유생 관리조로 이동시켜 준다.

중간육성을 위한 유생은 같은 방법으로 500  $\mu\text{m}$  가량으로 여과하여 치패만을 모으고 무게를 측정하여 아이스박스여과된 해수에 적신 수건을 깔고 유생을 운반한다.



### 3-4절 먹이생물 대량배양

식물플랑크톤은 해양 생태계의 먹이망과 물질순환에서 있어서 중심적인 역할을 담당한다. 식물플랑크톤은 지구상의 생물량의 50%이상을 차지하며 해양생태계에서 연간 약 104 Gt의 탄소화합물을 합성해내고 있는 일차 생산자로서 매우 중요한 위치를 점유하고 있으며, 자치어나 패류 유생, 해삼류 등 각종 어패류 및 해산동물의 유생 시기에 먹이원으로 이용된다. 따라서 본과제의 패류 (바지락 외 이매패류) 종묘 생산에 가장 필요한 항목 중의 하나가 먹이 생물인 식물성 플랑크톤의 배양과 패류의 변태 과정에 따른 식물성플랑크톤의 크기별 순수종의 배양이다. 이러한 먹이생물 배양 시에는 적절한 배지가 필요한데, 현재 알려지고 있는 F/2배지, h/2 배지를 개선한 h/2-beta 배지, ES 배지, SWM배지 등 많은 종류가 있다. 먹이생물용 배지는 먹이 생물의 각 특성에 따라 조성이 다르며, 적용범위도 다르다. 수온, 염분에 따라 배지의 조성 방법이 다르고, 심지어는 해저 바다 기질에 따라서도 먹이 생물용 배지는 성분이 다르게 제조되고 있다. 결론적으로 먹이 생물용 배지는 먹이생물을 배양하는 지리적인 위치에 따라 서로 다르게 만들어져야 한다.

#### 1. 바지락 먹이 생물의 특성

먹이생물로 *Platymonas subcordiformis*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros mulleri*, *Dicrateria inornata*, *Isochrysis galbana*를 배양하였으며 그 특성은 다음과 같다. *Platymonas subcordiformis*의 경우 분포가 매우 넓고 주로 해수 중에서 생활한다. *Platymonas subcordiformis*의 개체는 매우 작아 일반 길이가 15~17  $\mu\text{m}$ , 넓이는 7~10  $\mu\text{m}$ , 두께는 4~5  $\mu\text{m}$ , 세포편 앞 약간에 등복, 분열이 있다. 등 쪽은 약간 볼록하고 복부는 약간 평평하다. 꼬리 부분은 비교적 좁고 뾰족하며, 4개의 편모가 있고 편모의 길이가 신체의 3/4, 세포 내부에 세포 대부분을 차지한 녹색컵 모양의 색소체 중 하부에 위로 열린 컵 모양의 핵이 하나 있다. 환경이 좋지 않을 때 *Platymonas subcordiformis*의 편모는 떨어지고 세포질과 세포벽이 분리, 수축되어 분열, 휴면 형성하고, 배양용기 밑바닥에 가라앉는다. 운동은 전부 편모에 의거하고 수중에서 헤엄치고 신속히 활동한다. 또한 무성생식 방식으로 번식을 하며 한 개의 개체가 분열 되 두 개로 (소수는 4개로) 분열 후 자세포는 편모를 떨어뜨린 모세포는 다시 편모가 자라난다. 그리고 모세포 벽을 뚫고 떨어져 나온다. *Platymonas subcordiformis*는 해수 비중에 적응성이 넓고, 비중 1.003의 해수 속에서도 성장번식하고 1.045 고염수 중에도 정상생활을 할 수 있다. 최적 범위는 1.015~1.025로 알려졌다. *Platymonas subcordiformis*의 최적 수온은 20~25°C이며, 저온에 적응력이 강해 수온이 5°C로 내려가도 정상으로 번식 성장할 수 있으나 성장속도는 조금 느려진다. 고온에서는 30°C이상시 성장 및 번식이 억제되며, 35°C이상 이면 *Platymonas subcordiformis*는 대량 사망한다. 광량은 일반적으로 실내에서

유리병에 배양 시 직사광선을 피하며 더욱이 햇빛에 장기간 노출되지 않도록 해야 한다. 주로, 직사광선이 없는 곳에서 배양용기를 창 가까이 광선이 비교적 강한 곳에 두어 가능한 반사광을 흡수하도록 한다. 실내 유리그릇에 배양한 *Platymonas subcordiformis*는 만약 강한 직사광이 비추면 가라앉고 색깔은 누렇게 되며 생장에 영향을 받는다. 또한 *Platymonas subcordiformis*는 산염도에 적응 범위가 넓고 pH 5~9.5에서 모두 적응하지만 최적 적응 범위는 pH 7.0~8.5이다.

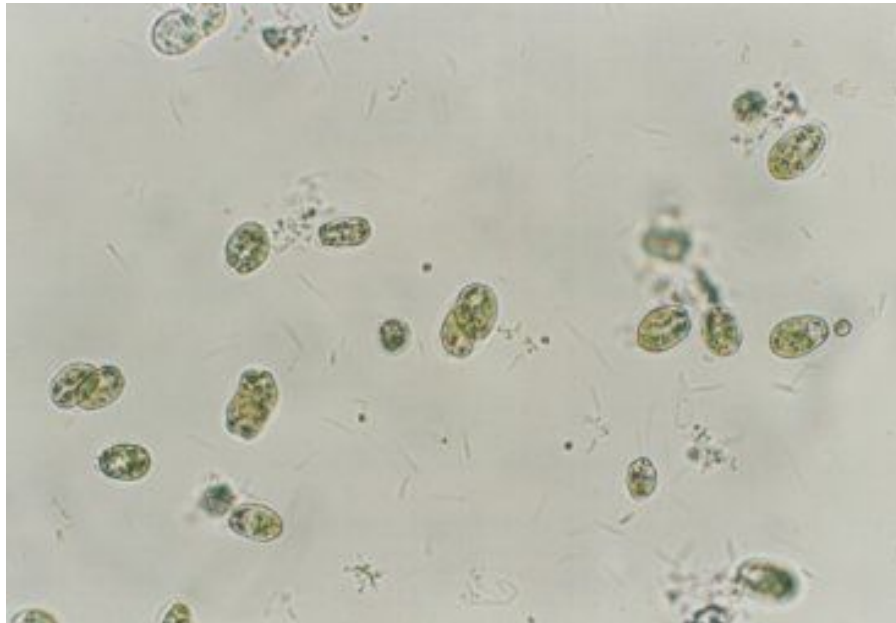


그림 3-4-1. 패류 먹이생물인 *Platymonas subcordiformis*.

*Chaetoceros mulleri*는 소형으로 대다수 개별 생활을 하지만 다만 어쩌다 2~3개 세포가 조성된 군체가 나타난다. 각면은 타원 내지 원형이며 중앙이 조금 볼록하거나 평탄하다. 넓이는 5~98  $\mu\text{m}$ , 높이는 4~5  $\mu\text{m}$  각모는 가늘고 길다. 이 종류는 연안에 주로 분포하는 종으로 우리나라 서남해안지방에 모두 분포되어 있다. 고온에서도 적응성이 높으며, 패류 종묘생산 시 주요 먹이이다. *Dicrateria inornata*, *Isochrysis galbana*는 단세포이며, 패류 종묘생산 시 초기 먹이로 매우 중요하다. 직경이 5~7  $\mu\text{m}$ , 세포벽이 없고, 편모를 가지고 있다. 번식은 무성생식을 하며, 이분열방식이다. 최적 적응 비중은 1.005~1.015이며, 최적 온도 적응 범위는 18~28°C이다.



그림 3-4-2. 패류 먹이생물인 *Chaetoceros mulleri*.

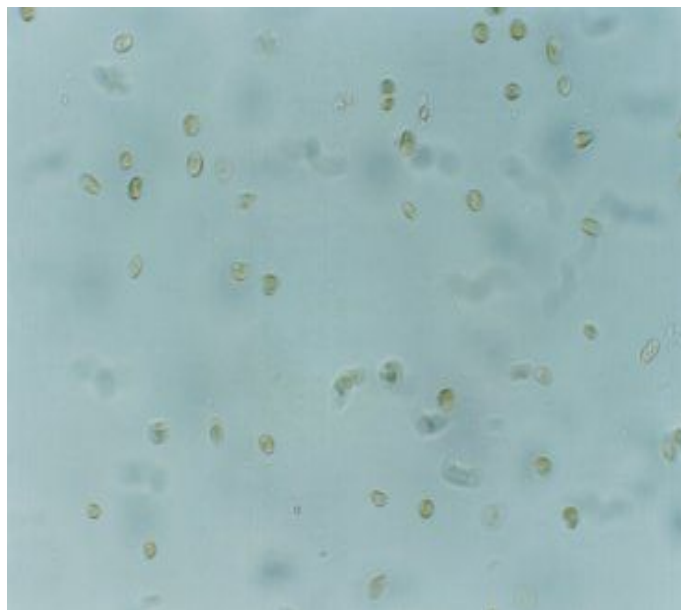


그림 3-4-3. 패류 먹이생물인 *Dicrateria inornata*.

## 2. 먹이생물 대량 배양 기술

가. 먹이생물 (식물성플랑크톤) 생산과정

### (1) 연구 방법

#### ① 배양실험

먹이 생물 대량배양을 위해 *Platymonas subcordiformis*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros mulleri*, *Dicrateria inornata*, *Isochrysis galbana*, *Nitzschia* sp.를 F/2 배지로 1차 원종배양하고 배지의 영양분을 값싼 원료로 대체하고 현장에서 먹이생물을 대량화하기 위한 소독 및 단계별 배양방법을 알아내고자 하였다. 이를 위해 식물플랑크톤의 성장속도를 측정하기 위해 현미경관찰과 생체형광측정, 형광반응지수 (FRI)를 측정하였다.

#### ② 생체형광 및 형광반응지수

생체 형광의 측정은 fluorometer (Turner Designs Inc., Sunnyvale, CA)를 이용하는 방법으로 식물플랑크톤의 광합성 용량과 성장을 측정하기 위한 방법으로 초기의 생체형광 값 (*in vivo* fluorescence; F)을 측정하고, Photosystem II에서 Photosystem I으로 전달되는 전자를 차단하는 전자전달계의 저해제인 DCMU [3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea]를 가하여 증가된 형광 (Fd)을 측정하고 두 형광차이를 비교함으로써 식물플랑크톤의 광합성능력을 평가한다 (Samuelsson and Öquist 1976), 이로부터 형광 증가비율 (fluorescence enhancement ratio)인 형광반응지수 (fluorescence response index, FRI)를 측정하여 광합성계의 활성도를 추정하였다 (Cullen and Renger. 1979).

$$FRI = \frac{(Fd - F)}{Fd}$$

FRI는 식물성플랑크톤의 stress에 의한 광합성 사이클의 전환 결과로, 식물플랑크톤 광합성의 동화 또는 억제 정도를 반영한다 (Domotor et al., 1982)

### (2) 연구 결과

식물성플랑크톤을 대량 배양하기 위해서 배양 용기 크기에 따르는 단계별 배양 방법을 시행하였다. 초기부터 대량 배양용기에 배양을 하면 증식 속도가 느리고, 증식과정에서 사멸된 식물성플랑크톤이 바닥에 침강, 분해되면서 수질을 악화 시킬 수 있기 때문이다. 따라서 먹이생물인 식물성 플랑크톤을 단기간에 증식시켜 먹이로 사용하는 방법이 플랑크톤을 배양하는 최적방법이다. 또한 먹이배양을 할 때 2차, 3차 배양을 하지 않고, 1차 배양만을 원칙



으로 하여 증식을 시키는데, 이는 아무리 멸균 및 살균 과정이 지난 배양액을 사용하더라도 플랑크톤 증식과정이 항상 외부에 노출되어 있기 때문에 다른 생물이나 원생동물이 증식 할 수 있기 때문이다.

다음은 먹이생물 배양 단계를 간단하게 정리한 표이다.

1단계: 원종배양 (250 mL, 500 mL) → 2단계: 소량배양 (2 L, 3 L) → 3단계: 확대배양 (중간배양 (20L)) → 4단계: 확대배양 (60L) → 5단계: 대량배양 (6 m<sup>3</sup>)

먹이 생물의 배양 단계는 4~5단계로 하여 증식을 시켰으며, 원종관리는 광주대의 clean room에서 항온으로 연중 관리토록 하여 언제든지 필요한 시기에 접종하여 먹이생물을 배양 할 수 있는 시스템을 갖추도록 하였다. 각 단계별 접종 시 농도는 식물성플랑크톤의 개체수로 *Tetraselmis suecica*와 *Platymonas subcordiformis*는 각 20만 cells/mL *Nitzschia* sp., *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros mulleri*는 각 500만 cells/mL 단계에서 접종을 하였고 접종 시 최종으로 현미경과 Fluorometer를 이용하여 FRI가 0.6 이상을 나타내 식물성 플랑크톤 상태가 양호할 때 확인 후 접종했다.



그림 3-4-4. 원종 (250 mL, 500 mL) 및 1단계 배양 (소량배양 (2 L, 3 L))



그림 3-4-5. *Platymonas subcordiformis* 1단계 배양 (소량배양 (2 L, 3 L))



그림 3-4-6. *Chaetoceros mulleri* 원종 (250 mL, 500 mL) 및 1단계 배양 (소량배양 (2 L, 3 L))



그림 3-4-7. *Isochrysis galbana* 원종 (250 mL, 500 mL) 및 1단계 배양 (소량배양 (2 L, 3 L))





그림 3-4-8. *Tetraselmis suecica* 원종 (250 mL, 500 mL) 및 1단계 배양 (소량배양 (2 L, 3 L))



그림 3-4-9. *Nitzschia sp.* 원종 (250 mL, 500 mL) 및 1단계 배양 (소량배양 (2 L, 3 L))



그림 3-4-10. 2단계 확대배양 (중간배양 (20 L))



그림 3-4-11. *Platymonas subcordiformis* & *Chaetoceros mulleri* 2단계 확대배양 (중간배양 (20 L))





그림 3-4-12. *Chaetoceros mulleri* & *Tetraselmis suecica* 2단계 확대배양 (중간배양 (20 L))



그림 3-4-13. *Isochrysis galbana* 2단계 확대배양 (중간배양 (20 L))

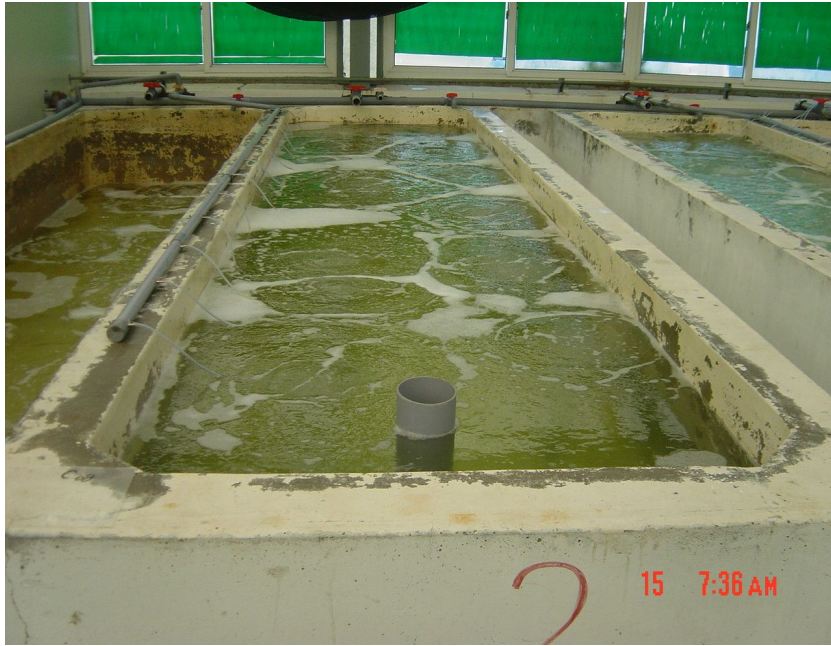


그림 3-4-14. *Chaetoceros mulleri* 3단계 대량배양 (6 m<sup>3</sup>)

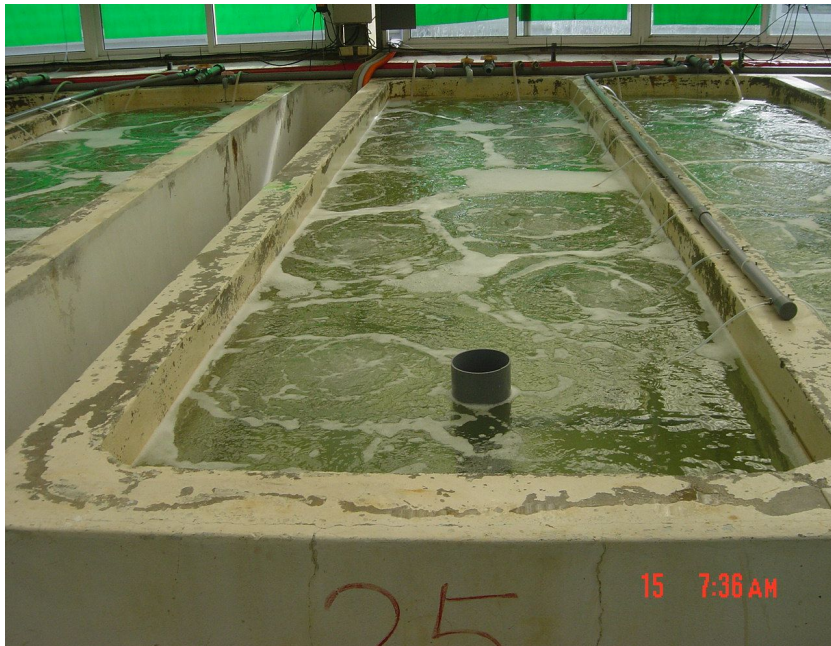


그림 3-4-15. *Isochrysis galbana* 3단계 대량배양 (6 m<sup>3</sup>)



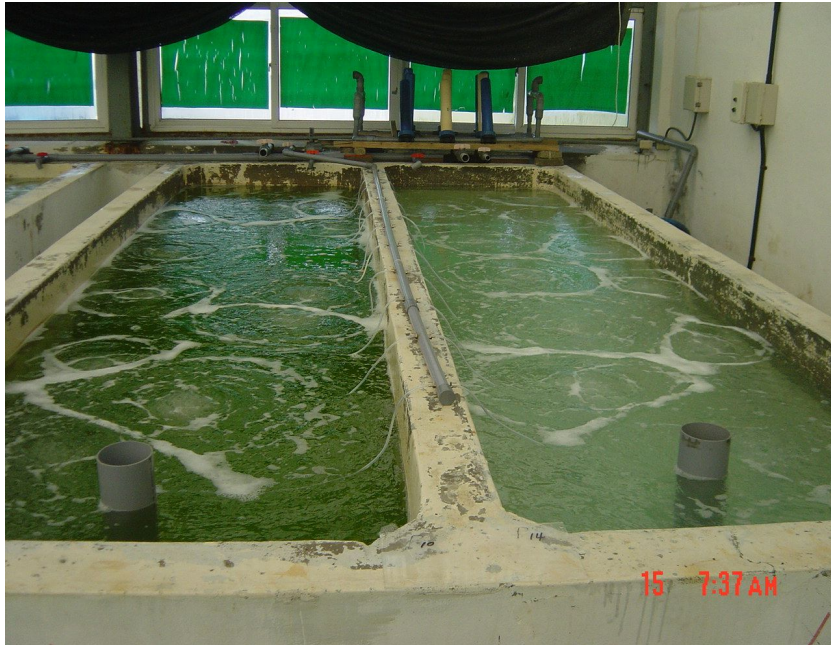


그림 3-4-16. *Platymonas subcordiformis* 3단계 대량배양 (6 m<sup>3</sup>)



그림 3-4-17. *Tetraselmis suecica* 3단계 대량배양 (6 m<sup>3</sup>)

2차년도에는 이른 시기인 3월부터는 먹이생물의 대량 배양 시스템을 개발을 시작하였으며 먹이생물로 *Nitzschia* sp., *Platymonas subcordiformis*, *Chaetoceros mulleri*, *Isochrysis galbana*를 취하여 대량 배양하였다 (그림 3-4-18).

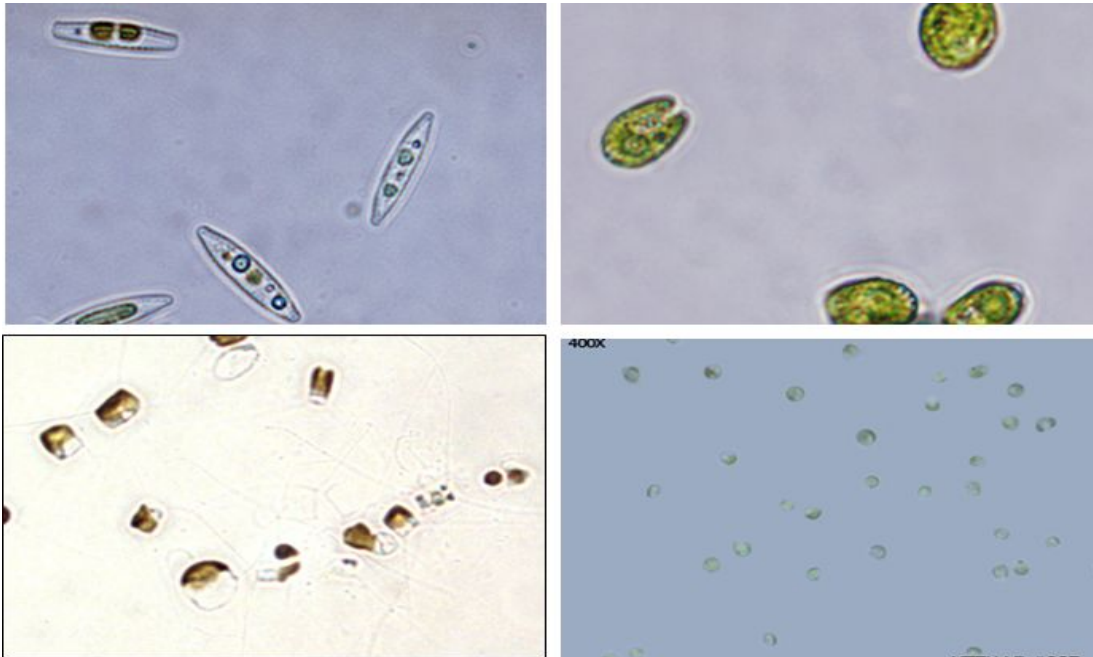


그림 3-4-18. 패류 먹이생물인 *Nitzschia* sp.(상좌) *Platymonas subcordiformis*(상우)  
*Chaetoceros mulleri*(하좌) *Isochrysis galbana*(하우)

3월 이른 시기에는 양식장의 온도와 수온이 낮아 2단계의 소량배양 (2, 3 L)시 *Nitzschia* sp.를 제외한 플랑크톤의 성장속도가 상대적으로 느리게 배양되었다. 2단계에서 30 L의 중간 배양을 거쳐 3단계의 60 L 확대배양까지 *Platymonas subcordiformis*, *Chaetoceros mulleri*, *Isochrysis galbana*는 12일이 소요되었다 (그림 3-4-19). 상대적으로 낮은 기온으로 인하여, 4 단계로 60 L 확대배양을 추가함으로써 대량배양 (6 m<sup>3</sup> 수조)까지 이르는데 시간을 절약하였고 단계 배양에 따른 생산의 안정성을 유지하고자 하였다 (그림 3-4-20). 2010년 3월 실내 온도는 6.5~10℃로 매우 낮아, 대형수조의 해수는 보일러를 가동시켜 18~20℃로 유지하도록 하였고 3단계로 접종 후 4일 배양된 60 L 2통을 대형수조에 접종한 결과, 7~8일 후 *Nitzschia* sp., *Isochrysis galbana*는 1,000~1,500만 cells/mL, *Platymonas subcordiformis*는 100~200만 cells/mL 먹이생물로 사용할 수 있었다 (그림 3-4-21). 3~4월은 대량배양까지 총 25일 가량 많은 시간이 소요되어 인위적으로 보일러를 가동하여 수온을 24℃까지 가온하였다. 그 결과 성장속도를 약 5 일 단축하였으며 *Nitzschia* sp., *Isochrysis galbana*는 2,000~3,000만 cells/mL, *Platymonas subcordiformis*는 300~500만 cells/mL 농축할 수 있었고



5~6월부터는 원종에서 대량배양까지 총 15~16일이 소요되었다. 6월부터는 수온이 22℃ 이상으로 나타나 보일러 가동을 하지 않고 먹이생물 배양을 할 수 있었다. 또한 모패 관리에 사용하고자 자연 상태와 동일하게 여러 종류의 플랑크톤을 공존시켜 한 수조에 혼합하여 배양하기도 하였다. 혼합 배양을 한 경우도 낮은 수온의 영향으로 *Chaetoceros mulleri*의 성장이 부진하였지만, 나머지 *Nitzschia* sp., *Isochrysis galbana*는 양호하게 성장하였으며 먹이생물로서 사용가능한 밀도로 원종배양과 유사한 밀도를 나타내는 성과를 거두었다. 7월부터는 수온이 24℃ 이상으로 올라가 *Nitzschia* sp.의 성장은 현저하게 느리게 나타나 먹이생물 배양에서 제외하였고 7월말에는 수온이 27~28℃로 증가하여 *Isochrysis galbana*와 *Platymonas subcordiformis*만 먹이생물로 배양하고 8월 고수온기(30℃ 이상)에 6톤 수조에서는 모든 종의 먹이생물이 정상적으로 성장하지 못하였다. 고수온기에 먹이생물이 최적의 성장을 하도록 적정 수온으로 유지하기 위해 수온을 낮출 수 있는 별도의 시설이 필요하지만, 이 경우 경제적으로 타당하지 않았다. 향후, 이 문제에 대해서는 고수온기에서도 먹이생물을 대량생산할 수 있는 방법을 찾아야 할 것으로 판단된다.



그림 3-4-19. 1단계 원종배양, 2단계는 2, 3 L 소량배양과 30 L 중간배양으로 구분



그림 3-4-20. 3단계 먹이생물의 60 L 확대배양



그림 3-4-21. 먹이생물의 4단계 대량배양 단계

### 3. 먹이생물 배지 개량 및 먹이생물 대량 배양 연구

#### 가. 식물성플랑크톤 배지 조성에 따른 성장

식물플랑크톤의 배양 시 필요한 주요 무기영양소는 C, H, O, N, P, S Ca, Fe, Mg, K이며, Mn, Zn, Cu 등 미량금속이 있다. 이중에서 질소와 인 성분은 식물플랑크톤이 성장하는데 있어 다량 소비 영양소이다. 특히 질소 성분 중 암모늄은 식물플랑크톤이 선호 하는 영양소이다. 그리고 플랑크톤 중에서 규조류는 Si가 없으면 성장을 하지 못한다. 식물플랑크톤은 종묘 생산 시 먹이생물로서 중요하지만, 현재 당면해 있는 전 지구적인 기후변화 원인인자로서 매우 중요하기도 하다. 특히 각종 어패류 및 갑각류의 종묘생산 시 초기먹이로서 중요하지만, 대량배양의 어려움과 성장비에 따르는 경제적인 비용으로 인해 식물플랑크톤 대량 배양 연구가 미미한 편이다. 따라서 이번 연구는 이러한 성장비에 따르는 경제적인 효과를 극대화하기 위해 저비용 배지 개발에 일차적인 목표를 갖고 식물플랑크톤 증식 연구를 하였다. 하지만 기업과 연계된 사업이라 기본적인 배지 연구에 관한 사항을 정리 하였다. 현재 연구된 사항 중 저 비용의 비료를 사용하여, 먹이생물인 식물플랑크톤을 배양하고 있는 방법이 있지만, 비료 하나만으로 단기간 (5일 이내) 배양이 어려울 뿐만 아니라 식물플랑크톤의 영양 결핍을 초래해 대량배양이 어려움을 토론했고 있다. 이에 본 연구에서는 저비용의 비료를 가지고 최단 기간 내에 대량 배양하는 영양액 제조 방법을 기술하고자 한다.

비료는 N 회사에서 공급되어지는 요소비료와 복합비료를 사용하였으며, 비료 외에 필요한 시약은 공업용급으로 최저 금액으로 배양액을 만드는 연구를 하였다. 성장에 필요한 N:P 비율은 Redfield ratio를 크게 벗어나지 않았으며, 필요한 영양소는 최대한 공급하는 방법을 사용하였다. 실험에 사용된 배지는 다음과 같다.

**Media 1:** 요소비료: 20 mg/L, 복합비료: 10 mg/L

**Media 2:** 요소비료: 20 mg/L, 복합비료: 10 mg/L, Liquid extraction from sea mud: 1 mL

**Media 3:** 요소비료: 20 mg/L, 복합비료: 10 mg/L, FeSO<sub>4</sub>: 2.5 mg/L, MnSO<sub>4</sub>: 1 mg/L, EDTA: 10 mg/L

**Media 4:** 요소비료: 20 mg/L, 복합비료: 10 mg/L, FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O: 2.88 mg/L, NaSiO<sub>3</sub>: 10 mg/L for diatom

이 중 Liquid extraction from sea mud :1 mL는 갯벌 100 g을 채취하여 1 L의 증류수에 넣고 5분간 골고루 섞이게 한 다음, 1시간 부유물질을 침전 시킨 다음, 상등액 1 mL를 취하였다. NaSiO<sub>3</sub>는 규조류의 배양에 필수 원소이기에 *Chaetoceros mulleri*와 *Nitzschia* sp. 배양에 사용되었다. EDTA는 킬레이트 화합물로서 미량금속인 Fe와 Mn의 흡수에 필수적인 작용을 한다. 실험은 먹이생물의 이용에 적합하게 5일간에 최대 peak가 나타나게 식물플랑크톤 접종을 1/15~1/20 비율로 접종을 하였으며, 배양액은 Media 1, 2, 3, 4를 250 mL에 1 mL를 투여하였다. 플랑크톤 활성도를 나타내는 FRI와 개체수를 날마다 측정하였다.

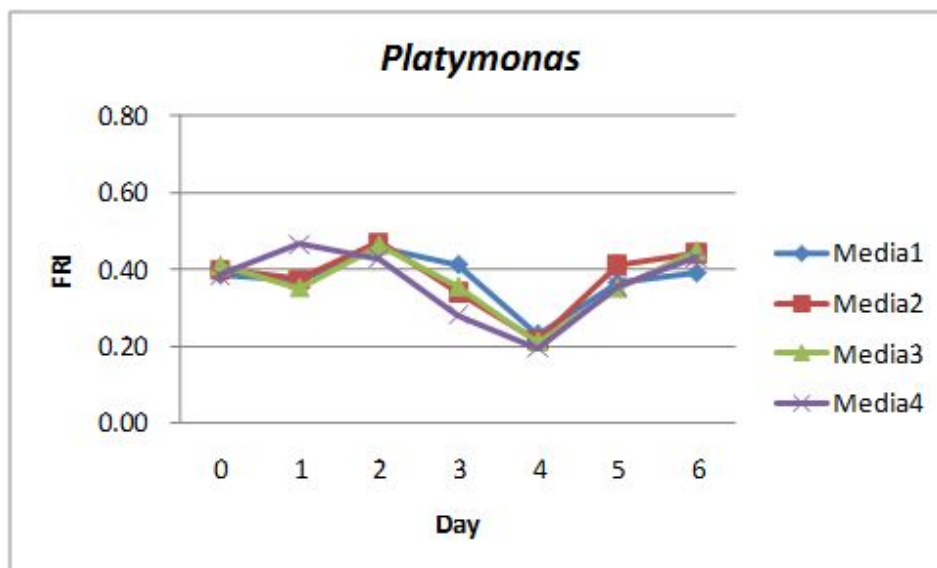


그림 3-4-22. 각 Media에 따른 *Platymonas subcordiformis*의 활성도

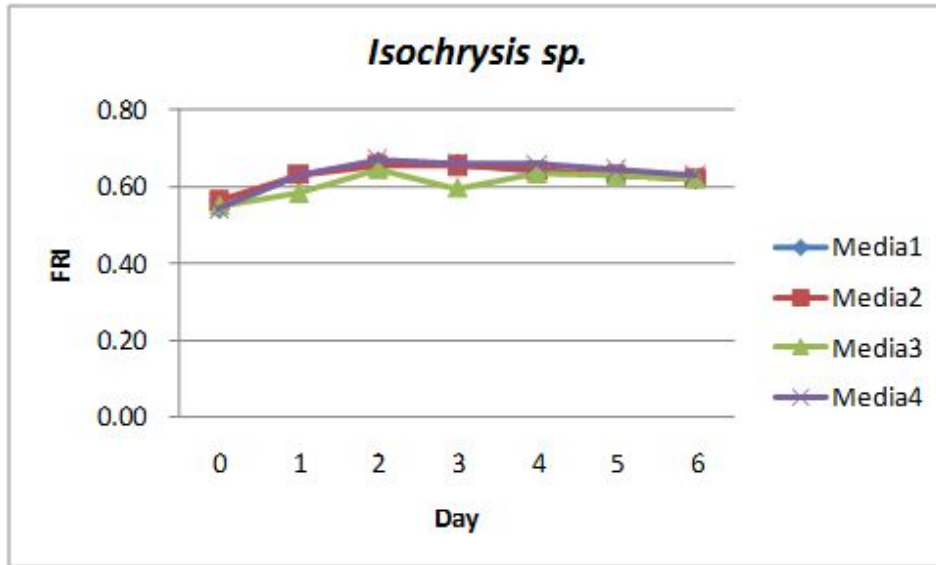


그림 3-4-23. 각 Media에 따른 *Isochrysis galbana*의 활성화도

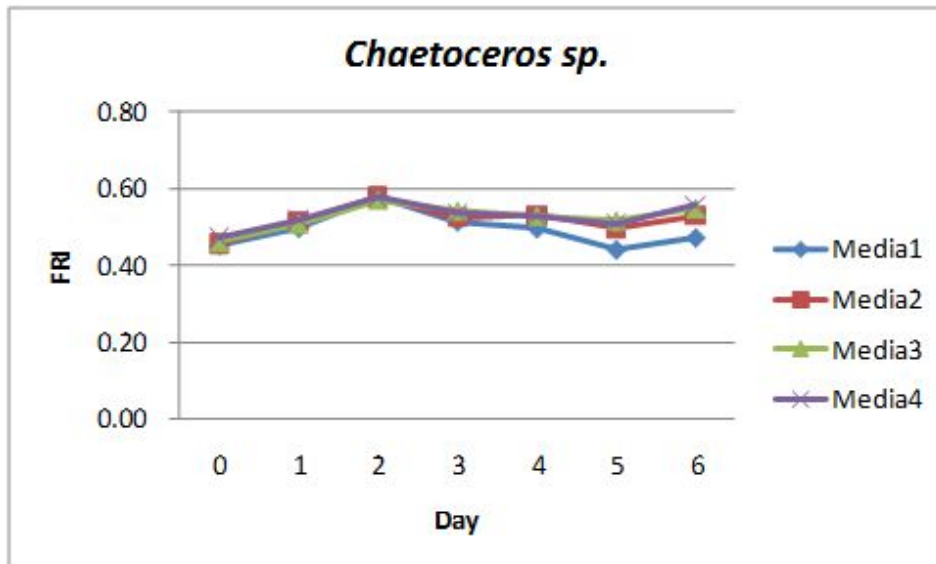


그림 3-4-24. 각 Media에 따른 *Chaetoceros mulleri*의 활성화도

식물성플랑크톤 활성화도(FRI)는 접종 시 3일 만에 최대 성장률을 보였으며, 이 후 서서히 감소하는 경향을 나타냈다. *Platymonas subcordiformis*의 경우 5일째까지는 감소하는 형태를 나타냈고 이 후 점차 증가하는 양상을 보였다. *Isochrysis galbana*와 *Chaetoceros mulleri*는 *Platymonas subcordiformis* 성장과 비교할 때 활성화도의 변화가 크지 않았으며, 특히 *Isochrysis galbana*는 활성화도의 굴곡이 크지 않고 고른 양상을 나타냈고 증식기간 동안 평균 0.61이상의 높은 FRI 값을 나타냈다. 이는 배양 기간 동안 플랑크톤의 활성화도가 높아 종묘 생산 시 먹이원으로 충분한 성장을 하는 것을 의미한다. 식물성 플랑크톤 일별 변화를 날마다 현미경으로 개수하여 다음과 같이 그림으로 나타냈다. 단기간 내 식물플랑크톤의 증식 곡선 중에서 Media 3 (요소비료 20 mg/L, 복합비료:10 mg/L, FeSO<sub>4</sub> 2.5 mg/L, MnSO<sub>4</sub> 1 mg

/L, EDTA 10 mg/L)과 Media 4의 개체수 변화는 배양 시 3일까지는 큰 변화가 없었으나 3일 이후에 먹이생물로서 역할을 할 수 있는 peak에 도달하는 시간이 짧아졌으며, 이는 식물플랑크톤의 배양액으로 사용하기에 충분한 배양액이 될 수 있는 것으로 생각된다.

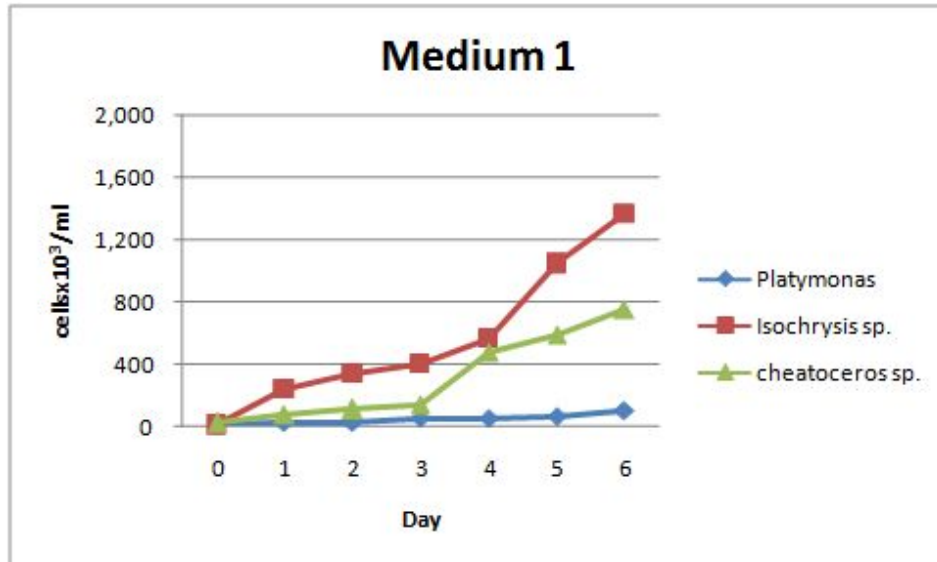


그림 3-4-25. Media1에서 각 종류 별 개체수 (cells/mL)

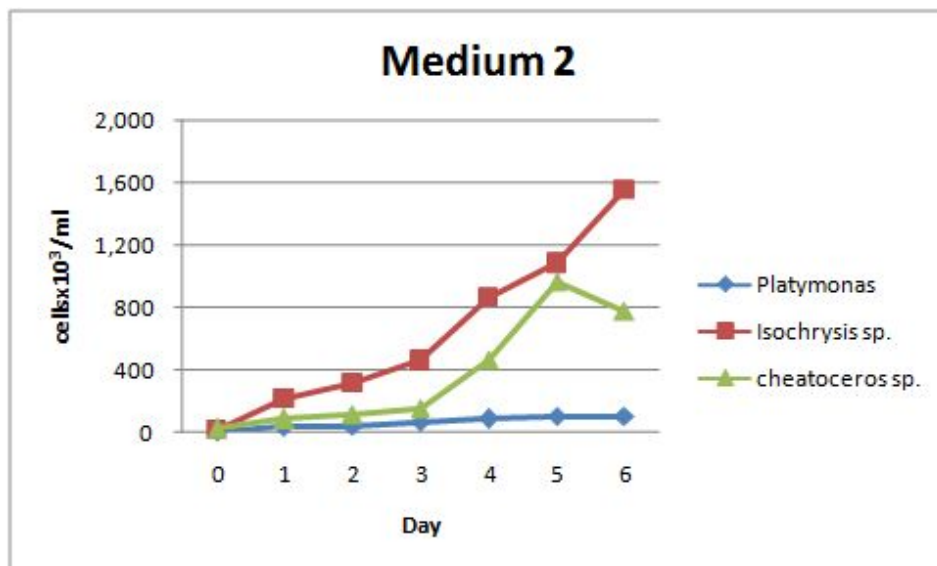


그림 3-4-26. Media2에서 각 종류 별 개체수 (cells/mL)



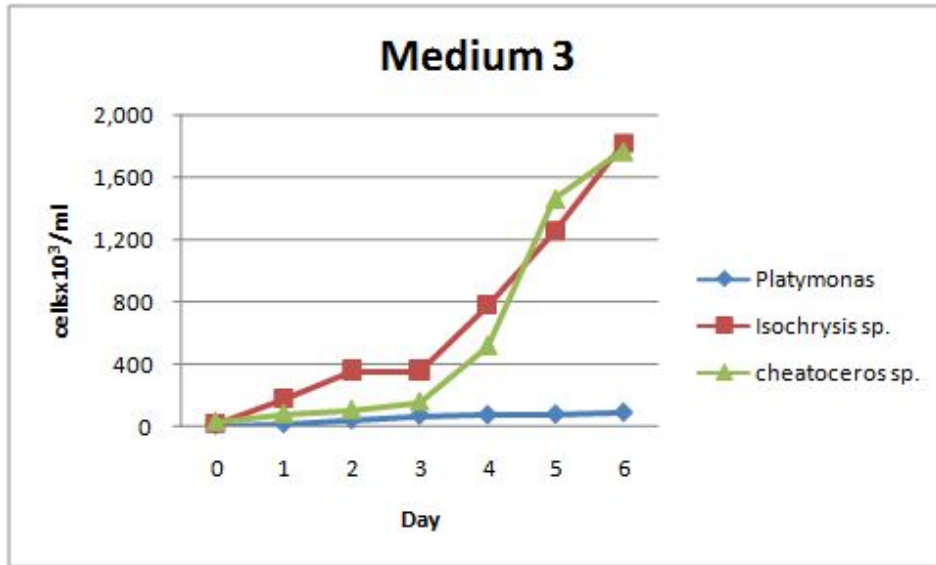


그림 3-4-27. Media3에서 각 종류 별 개체수 (cells/mL)

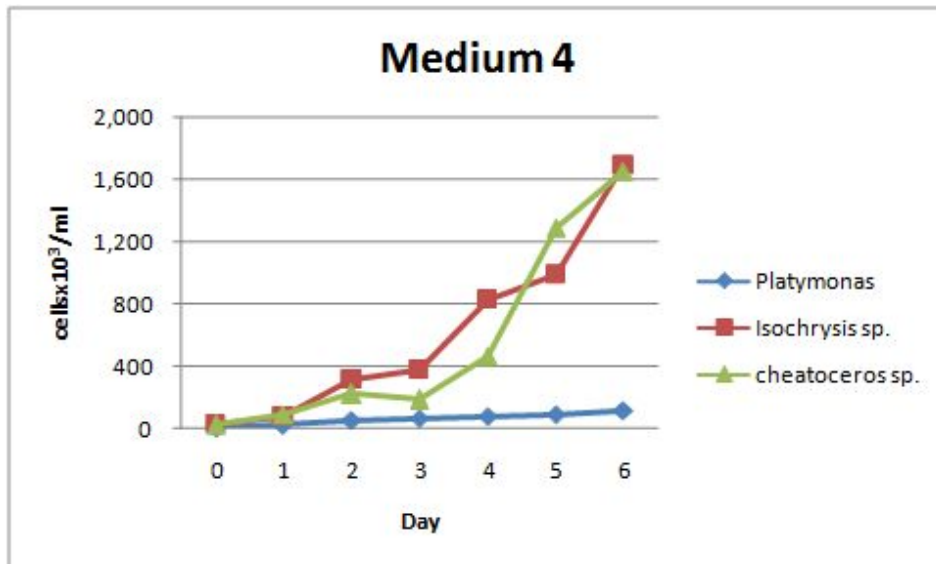


그림 3-4-28. Media4에서 각 종류 별 개체수 (cells/mL)

나. 먹이생물 생산비 절감을 위한 양식현장에서 먹이생물 생산방법

가장 먼저 1단계 배양을 하기 위해서 3 L 플라스크를 준비한다. 현장에서 소독은 플라스크를 담수로 간단하게 (담수 100 mL를 넣고 흔들어서 버림) 2회 세척한 후 염산 (20%) 100 mL 플라스크에 넣고 내부의 모든 면이 염산이 묻을 수 있도록 서서히 돌리며 꼭지 부분까지 고루고루 씻어준다. 이때 사용한 염산을 버리지 않고 그대로 다른 플라스크에 넣거나 보관용 플라스틱 통에 넣어 보관하고 세척용으로 향후 계속 사용가능하다. 다음으로, 담수로 3회 정도 다시 세척을 하고 해수 2.8~3 L 를 플라스크에 넣고 가스레인지 위에 넣고 물을 끓인다. 이때 계속 보고 있지 않으면 넘치므로 주의하고 플라스크 바닥에서 직경 2 mm 정도의

기포가 계속해서 올라오면 가열을 멈춘다. 4시간 정도 그늘에서 식히며 뚜껑 부분에 거즈를 올려놓아 이물질이 들어가지 않도록 한다. 플라스크가 완전히 식으면 배양액을 키우는 종류에 따라 3 mL 넣어 배지를 완성한 후 원종 200 mL를 접종하고 아침 9시와 오후 5시에 하루 두 번 플라스크를 흔들어 주면 적어도 5일이면 peak에 도달한다 (표 3-5-1).

다음으로 2, 3단계 배양도 1차와 마찬가지로 소독과정을 거친다. 20~30 L의 배양통에 해수를 넣어 2회 세척하고 염산 (20%) 1,000 mL를 넣고 모든 면이 염산에 묻을 수 있게 서서히 돌려 씻고 염산은 세척용으로 재사용이 가능하므로 플라스틱 통에 넣어 보관한다. 다음으로 해수로 3회 정도 세척하고, 1  $\mu$ m 여과백을 사용하여 여과한 해수를 2차일 경우 20 L, 3차 일 경우 60 L를 채우며, 600 L일 경우 500 L까지 채운다. 60 L의 경우 염소 ( $\text{CaCl}_2$ )를 4 g 넣고 12시간 이상 용기 뚜껑을 닫고 소독한다. 표 1에 따른 배양액 60 mL를 넣고 산소관을 설치하고 공기 주입량을 조절하여 하루 정치 후 중화제  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  용액 20 mL를 용기에 넣어주고 1차 배양플랑크톤 5 L를 접종한다 (표 3-5-2).

마지막으로 4단계 대량 수조배양도 마찬가지로 세척 및 소독이 가장 중요하며 그 방법은 브러쉬 등을 이용하여 수조 바닥과 벽면을 깨끗하게 닦아 내고, 공기라인과 에어스톤을 깨끗하게 문지르면서 해수로 깨끗하게 세척한다. 깨끗하게 세척되지 않을 경우 위에서 사용한 염산을 헝겊에 적서 닦으면 깨끗하게 된다. 그리고 담수로 2~3차례 세척하고 여름철의 경우 2시간 정도 말려준다. 해수 유입구에 60  $\mu$ m 망을 씌운 후 수조벽면의 수위 높이를 70 cm까지 여과 해수를 채우고 염소 ( $\text{CaCl}_2$ )를 1톤당 50 g을 넣고 12시간 이상 정체 시킨다. 다음날 오전 10시 전후로 하여 배양액을 제조하여 주입한다. 배양액은 20 L 바스켓에 해수를 절반 넣고 표 3-5-1에 나타난 순서대로 배양액을 제조하여 용해 시켜 만든다. 수조에 배양액을 넣을 때는 공기를 강하게 넣어 충분히 혼합을 시킨 후 배양액을 골고루 뿌려준다. 그리고 중화제  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 을 톤당 25 g을 넣고 30분 후 3차 배양 플랑크톤을 해수 2톤에 60 L가량을 접종하여 만든다.

식물플랑크톤의 배양액은 1, 2단계에는 소량이 사용되어 F/2배지의 시약을 사용하였으며 3, 4차의 대량배양은 이를 대체할 수 있는 원료를 사용하여 여러 번의 실험 끝에 배양액의 비율을 조정하고 각 먹이 생물의 최적의 배양액 조건을 맞추고자 노력하였다. 표 3-5-2는 먹이생물의 배양액 비율을 맞춰 나타난 결과이다.

표 3-4-1. 식물성플랑크톤 1, 2 단계 배양 & 원종 보관 배양액

종류	시약	중량	비고
배양액 1	KNO <sub>3</sub>	300 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g	
	FeSO <sub>4</sub>	8.0 g	
	MnSO <sub>4</sub>	1.0 g	
	EDTA-2Na	180 g	
	증류수&담수	3,000 mL	
배양액 2	증류수	3,000 mL	
	비타민 B1	캡슐 2개	
	비타민 B12	캡슐 2개	
배양액 3	증류수	3,000 mL	
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0.3 g	
<p>*<i>Platymonas subcordiformis</i>. - 배양액 1을 넣는다.                      *<i>Dicrateria inornata</i> - 배양액1과 배양액 2를 각각 넣는다.                      *<i>Chaetoceros mulleri</i> - 배양액1과 배양액3을 각각 넣는다.</p>			



표 3-4-2. 식물성플랑크톤 수조 대량 배양액 제조 방법

종류	시약	일반적 중량	성장속도가 느려진 경우	비고
<i>Platymonas subcordiformis</i>	요소비료	20 g	10 g	1차 년도에 비교하여 성장속도가 느리게 나타나 영양염을 감소시킴.
	복합비료	10 g	-	
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	1.6 g	
	MnSO <sub>4</sub>	0.1 g	-	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	5 g	
	EDTA-2Na	10 g	8 g	
<i>Isochrysis galbana</i>	요소비료	10 g	3.6 g	"
	복합비료	8 g	-	
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	2 g	
	KNO <sub>3</sub>	10 g	10 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	5 g	
	EDTA-2Na	10 g	8 g	
<i>Nitzchia sp. (&amp; Chaetoceros mulleri)</i>	요소비료	20 g	10 g	"
	복합비료	10 g	-	
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	1.6 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	5 g	
	EDTA-2Na	10 g	8 g	
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	10 g	10 g	

- 상기 중량은 1톤 (1m<sup>3</sup>)당 필요량
- 배양액조제 시 *Chaetoceros mulleri*는 담수를 이용하고, 나머지는 해수를 이용.
- 모든 플랑크톤은 먹이로 활용 시 1차 배양만을 해야 함.

일반적 중량 사용의 경우,

- *Platymonas subcordiformis*는 플랑크톤 활성이 좋을 때 요소와 복합으로 만으로 증식이 잘됨. 다른 종류도 마찬가지로 증식속도가 느림.
- *Platymonas sp.*는 피크 일 때 20만 cells/mL, *Dicrateria inornata*와 *Chaetoceros mulleri*는 각 400만 cells/mL가 됨.

성장속도가 느려진 경우,

- *Platymonas subcordiformis*는 피크 일 때 8만 cells/mL, *Isochrysis galbana*, *Nitzchia sp.*는 70~100만 cells/mL로 나타남.
- 일반적 중량 사용의 경우 요소와 복합사료 만으로도 증식이 잘된 *Platymonas subcordiformis*도 낮은 수온으로 인하여 플랑크톤 활성이 좋지 않아 성장속도가 느려진 경우의 배양시약의 중량을 조절.
- 5일간 배양 시 피크가 나타나지 않을 때, 먹이생물의 배양 방법은 시약량을 50% 감소시켰음 (유생이나 치패 부화조 수질 악화 방지).

#### 다. 염분변화에 따른 먹이생물 변화

본 연구과정 중 염분조건에 따른 식물플랑크톤 성장의 관한 연구를 시행하였다. 연구종으로는 본 실험에서 먹이생물로 사용한 *Platymonas subcordiformis*, *Chaetoceros mulleri*, *Isochrysis galbana*로 3가지의 식물플랑크톤을 사용하였으며, 배지는 1차 년도에 개발한 현장용 배지를 이용하여 최적의 염분조건을 알고자 하였다. 각각 다른 염분에서 배양된 *Platymonas subcordiformis*의 변화는 그림 3-4-29에서 보여 주었고 모든 처리과정에서 초기 세포의 밀도는  $12 \times 10^3$  cells/mL 맞추었다. 실험 조건에서 lag phase는 처음 2일 동안 상승하고, 그 후 8일까지는 지수적인 상이 관찰되고, 그 이후 정체하는 것을 관찰할 수 있었다. 최대 세포의 밀도는 각각  $475 \times 10^3$  cells/mL,  $400 \times 10^3$  cells/mL,  $393 \times 10^3$  cells/mL 그리고  $382 \times 10^3$  cells/mL 였다. 가장 높은 세포의 밀도를 나타낸 것은 25 psu 일 때였으며, 염분이 그 보다 낮아도 *Platymonas subcordiformis*의 성장은 양호하게 나타났다. 이는 *Platymonas subcordiformis*의 세포밀도뿐 아니라 형광도 높은 값을 나타내고 세포밀도와 상관관계도 F는  $R^2=0.8206$ , Fd는  $R^2=0.9037$ 으로 밀접하게 보였다. 다음으로 그림 3-4-30은 *Isochrysis galbana* 세포 밀도 변화를 보여주었는데 실험 기간 동안 세포 밀도의 처음 2일 동안은 천천히 증가하고 그 후 12일까지 각각  $5,162.5 \times 10^3$  cells/mL,  $4,445.8 \times 10^3$  cells/mL,  $4,439.7 \times 10^3$  cells/mL 및  $4,160 \times 10^3$  cells/mL의 농도를 보이면서 최고점에 도달하였다. 이때 세포의 최고 농축은 염분이 30 psu 이상과 25 psu 이하에서 나타나 낮은 염분에서도 배양이 가능하게 보여진다. 세포밀도와 F값 사이도  $r^2=0.9654$ , Fd는  $r^2=0.8879$ 로 상관관계가 좋은 것으로 나타났다. *Chaetoceros mulleri*는 그림 3-4-31에서 보여준 바와 같이 위 두 종과는 달리 2일이 지난 뒤 12일 동안 관찰된 세포밀도가  $531 \times 10^3$  cells/mL,  $432 \times 10^3$  cells/mL,  $486 \times 10^3$  cells/mL 그리고  $387 \times 10^3$  cells/mL로 나타났고 그 이후 감소하였다. 이는 초기에는 염분에 따른 영향을 보이는 듯 하였으나 낮은 수온에 따른 성장환경이 다른 종에 비해 좋지 않아 염분에 따른 농도변화를 나타낼 수 없었다.

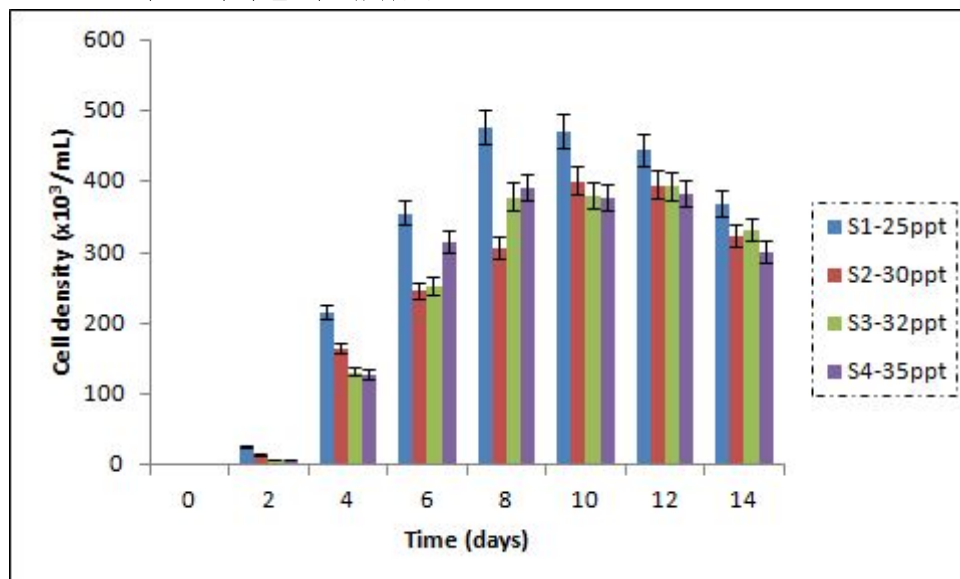


그림 3-4-29. 염분변화에 따른 *Platymonas subcordiformis*의 밀도 변화

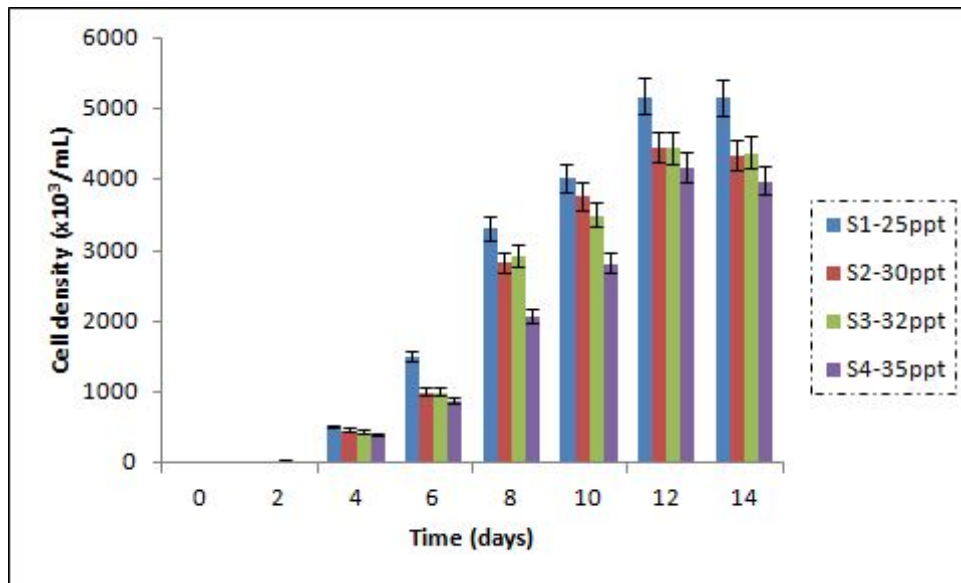


그림 3-4-30. 염분변화에 따른 *Isochrysis galbana*의 밀도 변화

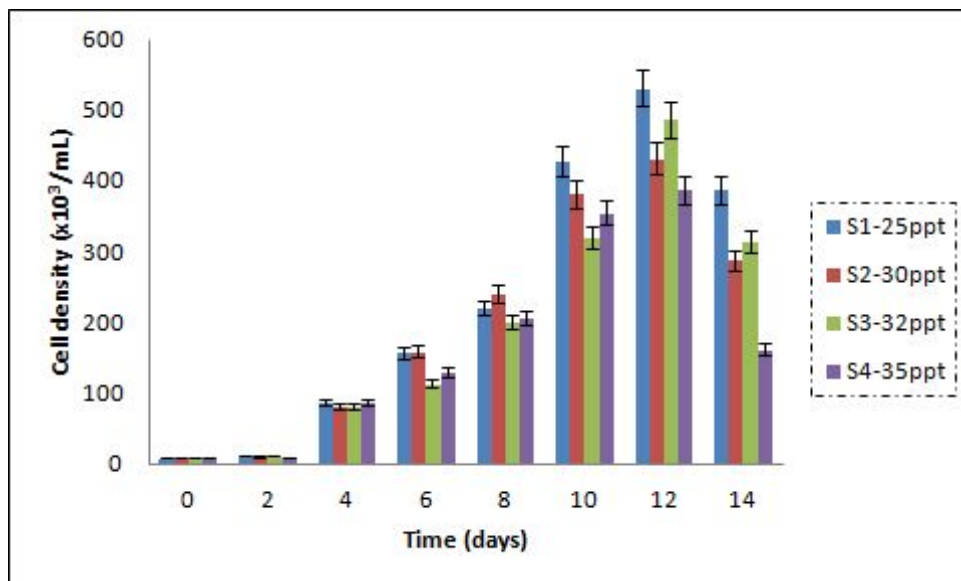


그림 3-4-31. 염분변화에 따른 *Chaetoceros mulleri*의 밀도 변화

#### 4. 먹이생물 농축시스템 기술에 관한 연구

먹이생물 배양을 축제식양식장에서 할 경우, 다양한 종류의 먹이생물이 혼합되어 자연 상태와 유사하기 때문에 모패의 먹이로는 적당할 것으로 판단되었다. 그러나 이렇게 대량 배양된 먹이생물에는 이물질을 포함하고 있으므로, 이것을 제거하고 사용할 수 있도록 그림 3-4-32에서 보여준 바와 같이 중공사막을 이용하여 축제식 양식장에서 배양된 먹이생물을 걸러 농축시킨 뒤 사용할 수 있도록 하였다. 실제 해양비전 21에서는 2007년에 이렇게 농축시킨 먹이생물을 바지락 치패에 공급한 사례가 있었지만, 결과는 만족스럽지 못하였다. 먹이생물은 온도가 너무 낮거나 또는 너무 높아도 생산하기 어렵기 때문에 이 시기를 대비하기 위해서는 먹이생물 농축기술이 필요하다고 판단되지만, (주)해양비전21에서 시도한 바와 같이 몇 가지 문제점을 보완하면 현장에서 유용하게 사용 할 수 있을 것으로 판단된다.

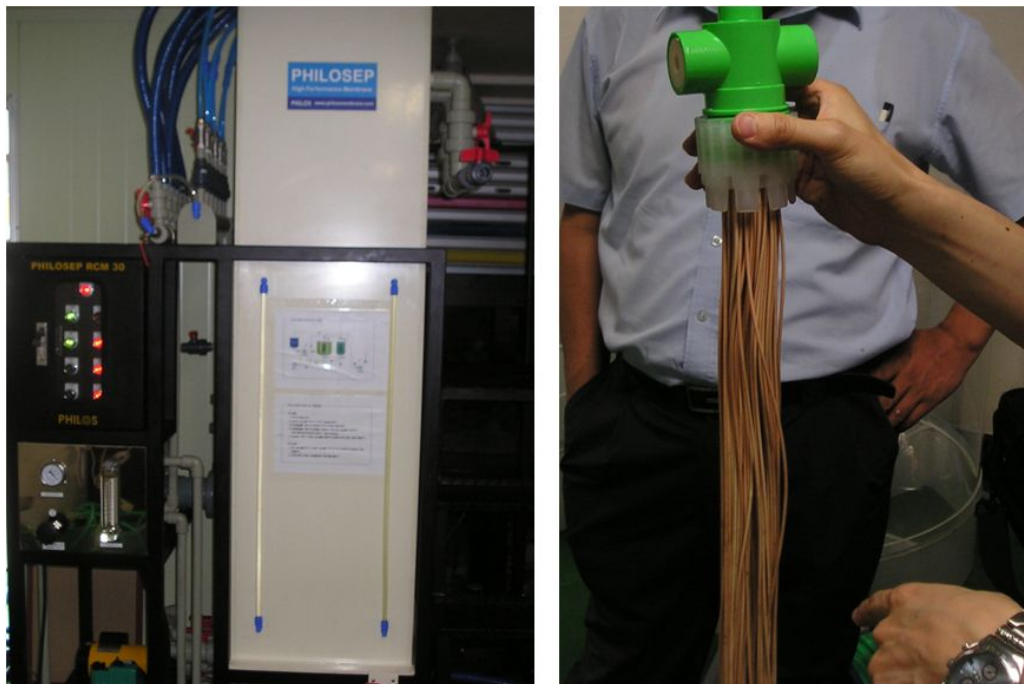


그림 3-4-32. 중공사막 필터; 가는 줄에는 0.5  $\mu\text{m}$ 의 공극이 존재해 0.5  $\mu\text{m}$  이상의 식물플랑크톤이 농축됨

최근 양식업계의 구조개선에 따라 먹이생물 수요가 증가하고 있는 추세이지만, 먹이생물을 생산하는 회사는 소수이다. 국내에서는 아직 해삼산업이 본격화되지 않았지만, 본격화 될 경우 먹이생물과 관련된 산업은 크게 활성화 될 가능성이 높다. 현재 대부분의 먹이생물 배양은 실내에서 배양하므로 생산량이 한정될 뿐만 아니라 생산원가도 비교적 고가이다. 따라서 1차 년도에는 배지 제조시 저렴한 사료 등을 사용하여 원가를 절감하였지만, 2차 년도에는 자연 상태에서 먹이생물을 농축하여 거의 무제한적으로 생산이 가능하도록 시도하였다. 자연 상태에서의 먹이생물 배양은 해남양식장에서 시도하였으며, 이곳은 인근에 규사광산이

있어 해수에 포함된 규소의 농도가 매우 높아 이곳에 규조를 접종한 결과, 지속적으로 규조가 6개월 동안이나 우점하는 특이한 현상이 발생하였다. 먹이생물을 자연 상태에서 배양하므로 실내배양보다 건강도가 더 좋을 것으로 예상하고 있으나 자연 상태에서 배양된 먹이생물은 여러 종이 혼합되어 있는 문제점을 가지고 있는데, 이는 장점도 될 수 있지만 단점도 될 수 있다. 자연의 노지에서 먹이생물을 배양하게 되면 부유물질이나, copepoda와 같은 동물 플랑크톤도 섞여 있기 때문에 먹이생물로서 상품가치가 떨어지므로 농축하기 이전에 불순물을 제거하는 것이 반드시 필요하다. 그래서 불순물을 제거하기 위하여 중공사막 필터를 사용하여 먹이생물 농축을 시도하였다. 그러나 중공사막을 사용하여도 아주 미세한 점토입자는 섞여 들어오므로 바지락 초기유생의 먹이로는 적당하지 않지만, 600  $\mu\text{m}$  이상 되는 치패의 먹이로는 큰 문제가 없을 것으로 판단되며 농축하여 만든 먹이생물은 1~2 cm 이상의 패류 먹이원으로는 최적의 상품으로 예상된다.

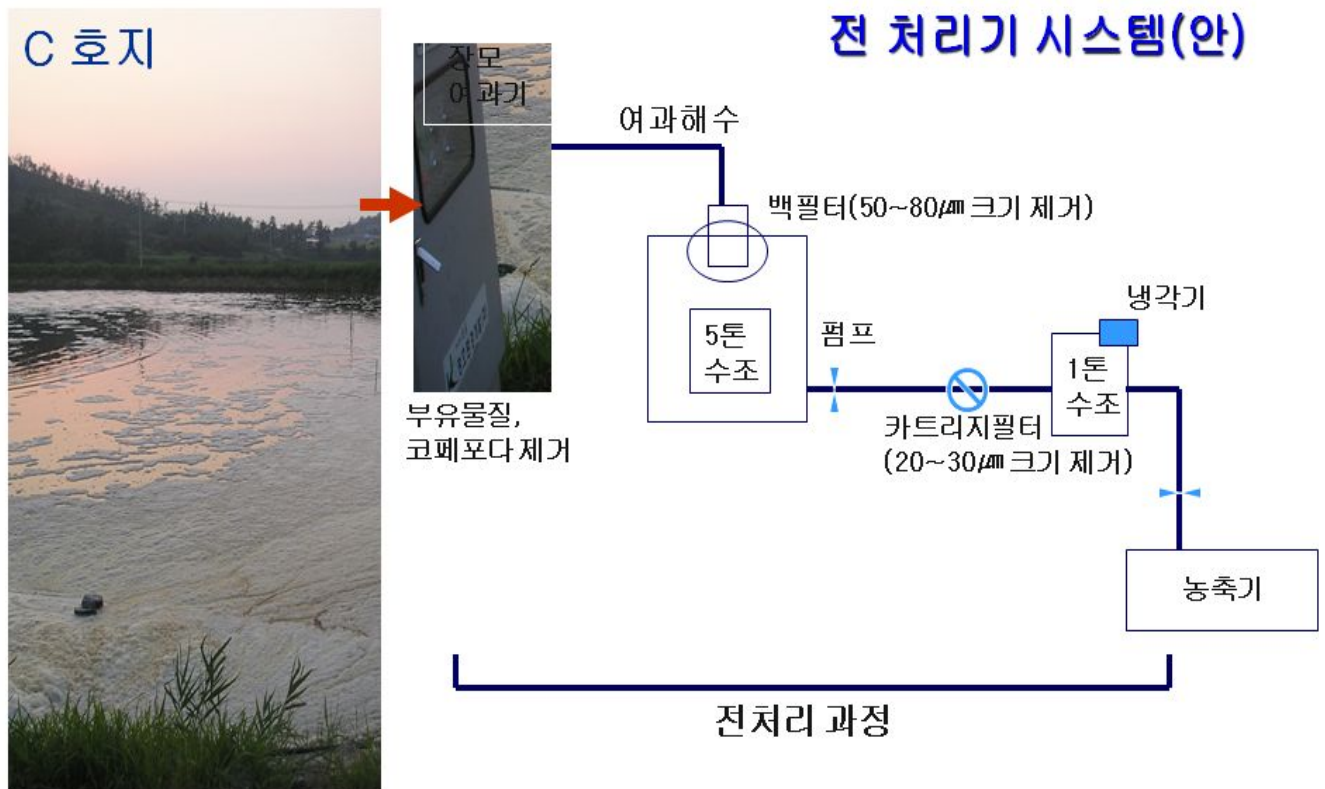


그림 3-4-33. 자연상태에서 농축하기 위한 전처리 시스템

그림 3-4-33은 자연상태에서 배양된 먹이생물을 농축하는 과정을 모식적으로 제안한 시스템으로 축제식양식장에서 배양된 먹이생물은 충분한 양이지만, 여러 종류의 먹이생물 뿐만 아니라 부유물질과 동물플랑크톤을 포함하고 있다. 따라서 다양한 이물질을 제거하기 위해, 1차적으로 장모여과기를 통과시키고 2차로 백필터를 이용해 50~80  $\mu\text{m}$  크기의 이물질을 제거하고 백필터까지 통과한 먹이생물은 5 ton 수조로 유입시켜, 다시 카트리지 필터를 이

용하여 3차적으로 20~30  $\mu\text{m}$  크기의 이물질을 제거하여 농축 시키고자 하였다. 그리고 마지막으로 수온의 상승 등으로 먹이생물의 영향을 최소화 하고자 3차 처리 후 냉각기를 설치하여 농축된 먹이생물을 안전하게 보관하여 이용하고자 하였다.

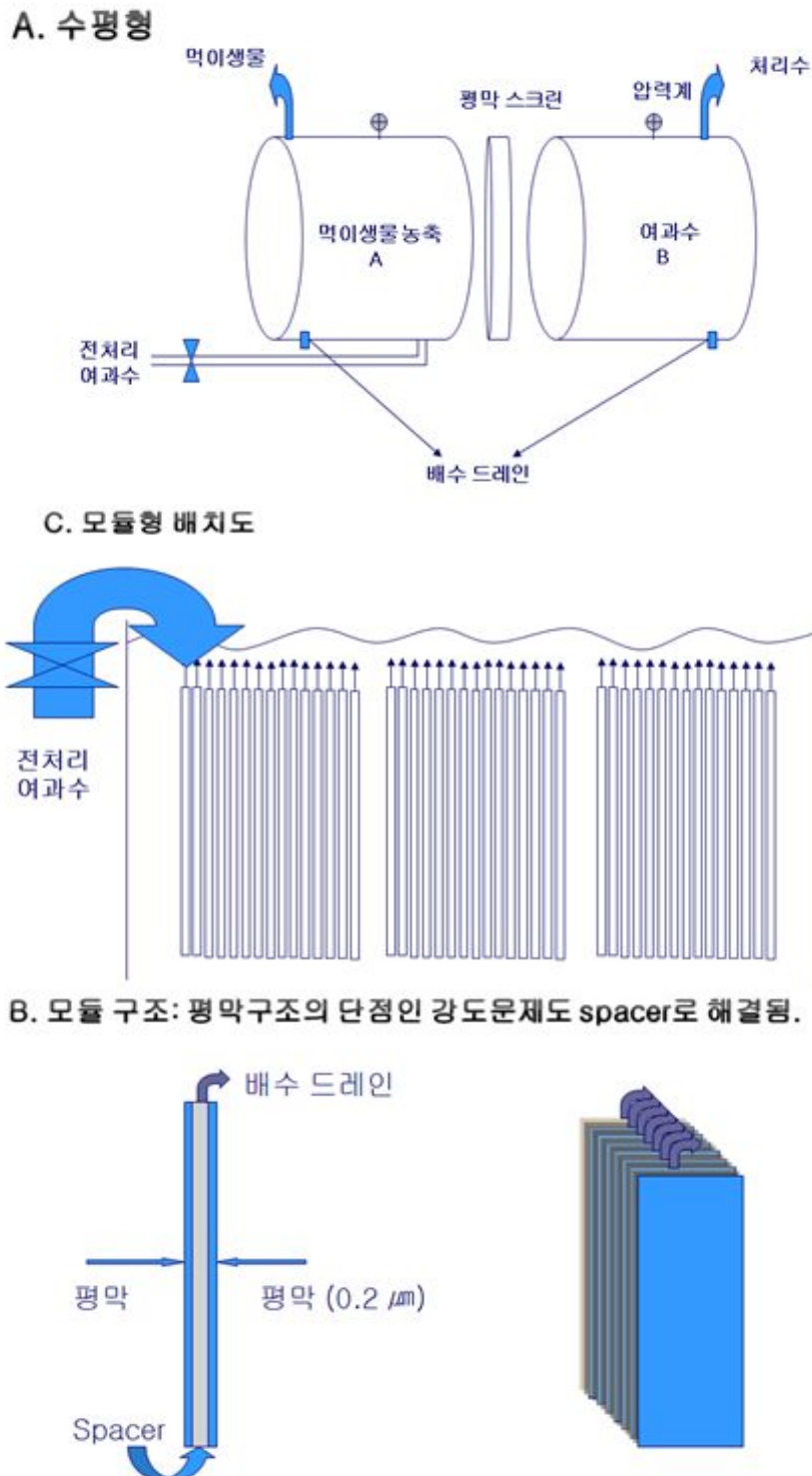


그림 3-4-34. 농축시스템

농축기의 필터는 중공사막, 평막, 하드타입 등이 있다. 중공사막은 같은 부피일 때, 단면적이 넓은 장점이 있지만 역세 시간이 길고, 막이 약해서 파손되기 쉬운 약점이 있으며 평

막은 사용 사례가 없어 결과 예측이 어렵고, 파손될 위험성이 있다고 추정 되지만, 철망 등으로 평막 앞부분에 안전장치를 첨부하였을 경우 막의 파손을 막을 수 있으며 관리가 쉽고, 역세시간이 짧은 장점을 가지고 있어 생산량을 극대화 시킬 수 있다.

농축기의 3가지 초기 안으로는, 그림 3-4-34의 A인 수평형으로 막의 면적이 제한되어 생산량이 한정적이지만 먹이생물을 농축하여 일정 압력이상이 되면 자동적으로 배출되어 먹이생물을 생산한다. B는 수평형의 단점을 개선한 모듈구조로 다단 평막 스크린을 채택하여 여과면적을 증대 시키고 강도 또한 공극을 가진 합성수지 spacer 양면에 평막을 부착하여 안정하며 이러한 판을 15개 병렬로 연결함으로 수평형을 보완하는 방법이다. 이 경우 C의 모듈형 배치도와 같이 모듈형을 용량에 따라 용이하게 증설하여 생산량을 용이 하게 증가시킬 수 있을 것으로 보여진다.

### 3-5절. 바지락 중간육성방법에 관한 연구

#### 1. 바지락 치패의 바닥식과 수하식 육성 방법 비교

##### 가. 이론적, 실험적 접근방법

바지락은 대표적인 여과섭식형의 이매패로 수중의 식물성 플랑크톤, 유기물, 박테리아 및 심지어 로티퍼까지 매우 넓은 먹이 스펙트럼을 갖고 있으며, 체중의 3~5%를 섭식하는 것으로 알려져 있다 (Sorokin and Giovanardi, 1995). 이와 같은 사실은 바지락이 다량의 먹이원을 필요로 한다는 점이며, 따라서 현재 우리나라에서 시행되고 있는 바지락 양식법인 천해양식법은 바지락 성장에 최적의 환경을 제공하고 있는지에 대한 조사가 필요하다. 따라서 가능하다면 보다 많은 먹이 환경에 바지락을 노출시킬 수 있는 양식방법의 개발이 바지락의 성장을 촉진시키는데 유용한 방법이 될 것으로 사료된다. 이러한 관점에서, 현재 시행되고 있는 천해양식법은 발달된 조간대 저질에서 바지락을 양식하기 때문에 1일 2회씩 나타나는 간조 시 공기 중에 노출되며 이때 먹이 공급의 중단이 나타난다. 더구나 동계와 하계에 우리나라는 기온의 급격한 변화가 생성되며, 특히 이 시기에 간조가 되면 조간대 바지락은 급격한 환경 변화에 노출되게 된다는 단점을 갖고 있다 (이 등, 2005). 이러한 단점을 극복하기 위한 방법으로 수하식 양성법이 대안으로 이용될 수 있다. 수하식 양성은 조간대의 바닥식 양성 방법과 비교하여 바지락이 조석에 관계없이 수중에서 먹이를 섭취 할 수 있다는 장점을 갖고 있으며, 또한 조간대에 비해 계절과 관계없이 물리적으로 안정된 수중에서 서식한다는 장점 때문에 생리적으로도 안정된 환경을 제공 받을 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 본 연구는 이러한 수하식 양성법의 장점이 실제 바지락의 성장과 질병 감염 및 폐사에 적용될 수 있는지를 확인하기 위하여 수행되었다.

##### 나. 연구내용

###### (1) 시료 채집

본 연구에 사용된 바지락 치패는 2011년 6월 7일 충청남도 홍성군 서부면 궁리에 위치한 바닥식 양식장 (36°34'53.40"N, 126°26'46.57"E, 그림 3-5-1A.)에서 자연 발생된 치패 4,000 개체를 채집하여 실험실로 옮겨 설치된 수조에 보관 후, 2011년 6월 16일 경상남도 거제시 장목면 장목리에 위치한 한국해양연구원 남해연구소 연안 (36°59'36.01"N, 128°40'26.09"E, 그림 3-5-2A.)의 조간대 (바닥식)와 조하대 (수하식)로 이식하였다. 수하식과 바닥식에 이용된 바지락 치패의 크기는 서로 유사한 크기로 선별하였으며, 두 양성장지의 거리는 약 100 m 정도로 근접시켜 해양환경이 서로 최대한 유사한 조건이 되도록 설계



하였다 (그림 3-5-2B). 자세한 이식 방법은 아래와 같다.



그림 3-5-1. 2011년 6월 7일 충남 홍성 지역 조간대에서 치패 채집 모습 및 채집된 치패. 치패 채집 지역 지도 (A), 채집지역 조간대 전경 (B), 치패 채집 모습(C), 채집된 치패 (D, E, F)

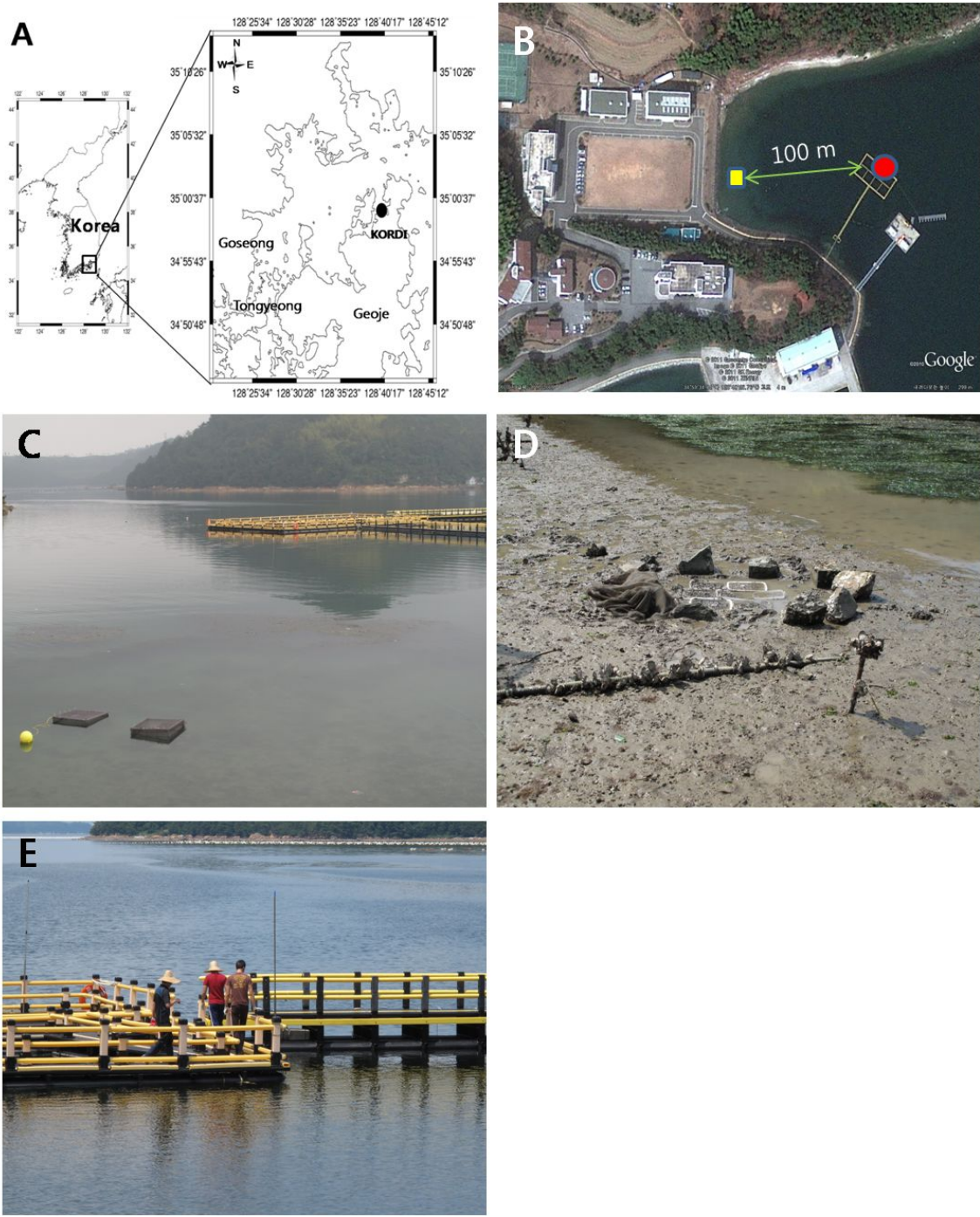


그림 3-5-2. 양성 실험 수행 지역. 지도 (A), 위성사진 (B), 실험지역 전경(C), 바닥식 양성 장소(D), 수하식 양성장(E).

## (2) 양성장 설치

치패 양성은 바닥식 양성 방법과 수하식 양성 방법 두 가지를 이용하였다. 바닥식 양성 방법은 간조 시 바닥이 드러나는 곳을 선정하여 1 m<sup>2</sup>넓이의 지역을 깊이 20 cm까지 파내어 그 지역에 서식하던 타 생물들을 제거 하였다. 그 후 플라스틱 바구니 (25 cm x 18 cm x 7.5 cm) 7개에 주변 사니질의 흙을 채워 넣고 그 안에 치패를 각각 300개체씩 투여한 후 지표면과 동일한 높이로 바구니를 묻었다 (그림 3-5-3A). 실험 중인 바지락의 유실을 막기 위해 바구니 위의 지면을 망목 5 mm의 그물로 덮고 (그림 3-5-3B), 그 위에 조류 및 갑각류 등 기타 해적동물로부터 보호하기 위해 망목 5 mm의 그물로 덮인 1 m x 1 m x 1 m 의 크기로 정육면체의 보호망을 설치하였다 (그림 3-5-3C-D).

수하식 양성 방법은 망목 2 cm인 직육면체 (100 cm x 80 cm x 50 cm) 철제 골격의 cage (그림 3-5-4A-E) 내부에 자체 제작한 사육용 플라스틱 바구니 (25 cm x 18 cm x 7.5 cm) 7개를 고정하여 각각 치패 300개체씩 넣고 사육 하였다 (그림 3-5-4B-D). 사육용 플라스틱 바구니의 육면 전체를 전기인두를 이용하여 지름 5 mm인 구멍을 촘촘히 뚫어 해수의 유통을 원활하게 하였으며, 나일론 재질의 실타래를 촘촘히 채워 넣고 그 사이에 바지락을 넣어 수류에 의한 바지락의 이동을 최소화하였다 (그림 3-5-4C). 또한 바구니의 덮개를 덮고 고정하여 바지락의 유실을 방지하였다 (그림 3-5-4D). 이후 사육 cage를 수표면 아래 2 m 지점에 매달아 사육하였다 (그림 3-5-4F).

시료 분석은 6월 중순부터 8월 하순까지는 매 2주마다, 9월엔 1회 등 총 4개월에 걸쳐 수행되었으며, 채집시 각 실험군 (수하식 양성시설과 바닥식 양성시설)으로부터 40개체씩 시료를 무작위로 채집하여 분석에 이용하였다.

## (3) 수하식과 바닥식 양성 바지락 치패의 성장과 비만도

실험실로 옮겨온 바지락 치패는 각장, 각고, 각폭, 습중량, 패각중량, 총중량을 측정하여 성장률을 조사 하였다. 각장, 각고, 각폭은 Vernier calipers를 이용하여 0.01 mm까지 측정하였고, 습중량, 패각중량, 총중량은 전자저울을 이용하여 0.001 g까지 측정하여 소수점 셋째 자리에서 반올림 하였다.

비만도 측정은

(1) 비만도=습중량/패각중량 으로 측정 하는 방법과

(2) 비만도=(습중량/각장 x 각고 x 각폭) x 1,000

으로 측정하는 방법 등 2가지를 사용 하였다.





그림 3-5-3. 조간대에 설치한 바닥식 양성 cage. 저질을 파낸 후 치패를 묻은 모습(A), 치패 유실 및 해적생물 침입 방지를 위해 그물을 덮은 모습(B), 바닥 양성용 cage 설치 모습(C), 설치 완료된 바닥식 양성장(D).

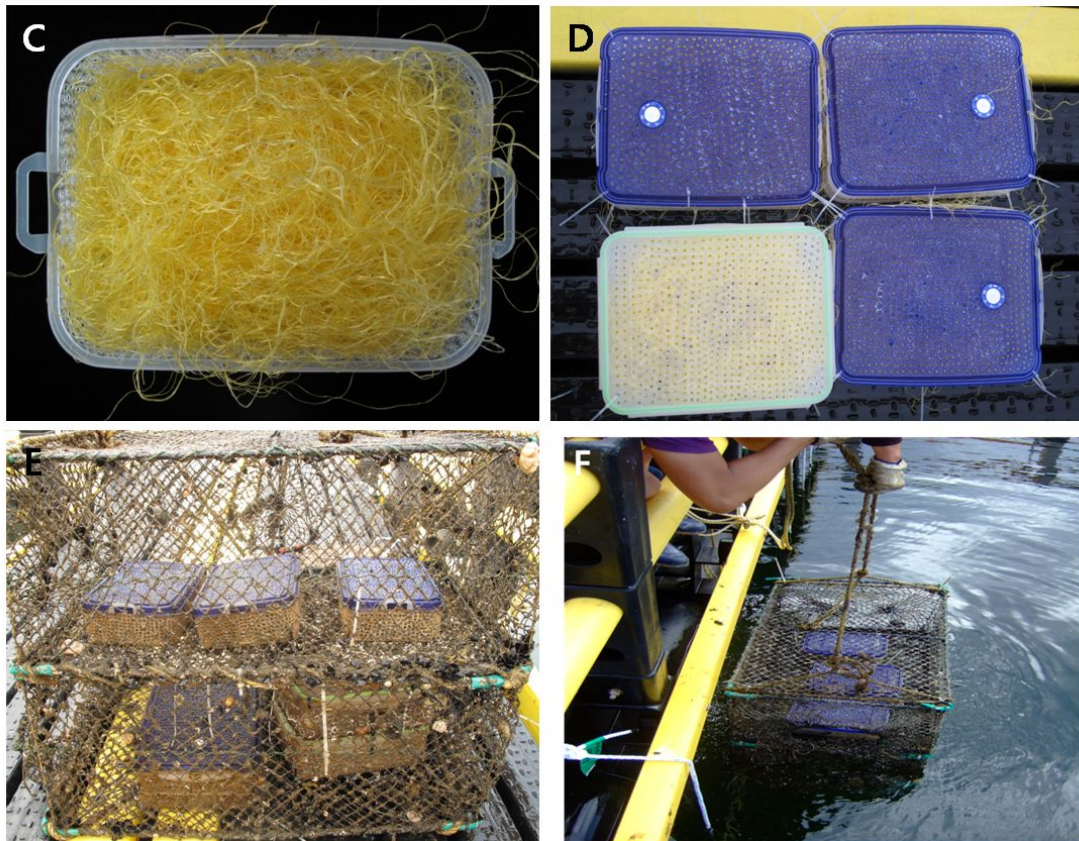
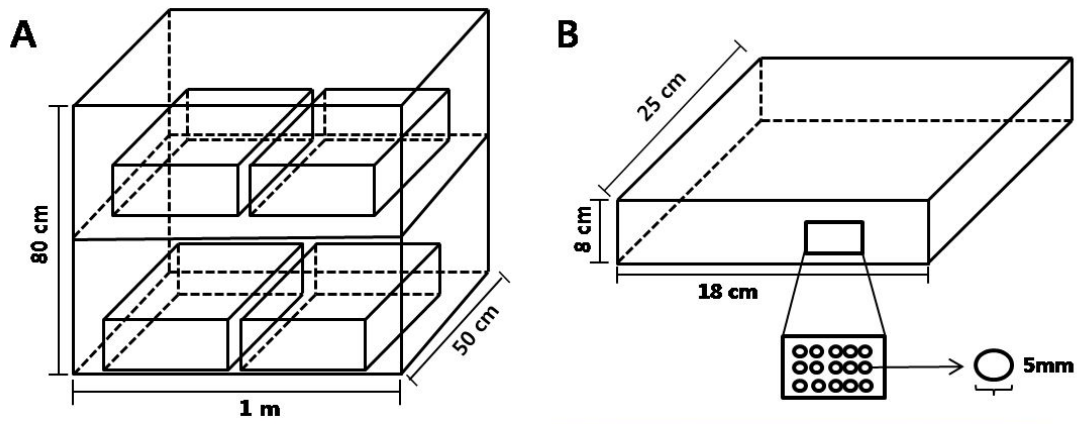


그림 3-5-4. 수하식 양성용 내부 및 외부 cage. 수하식 내외부 cage 모식도(A), 수하식 양성용 내부 cage 모식도(B), 해수의 유통에 의한 바지락의 이동 방지를 위해 내부 cage에 넣은 나일론 실타래(C), 치패 유실 및 해적생물 침입 방지를 위해 뚜껑을 덮은 모습(D), 수하식 양성시설(E), 수하식 cage 설치 모습(F).

#### (4) 누적 폐사율, *Perkinsus olseni* 감염 현황 및 성 성숙도 측정

채집일 마다 각 양성장의 바지락을 실험실로 40개체씩 옮겨와 개체 측정 후 20개체는 *P. olseni* 감염도 조사, 20개체는 생식주기 조사를 위한 조직절편 제작에 사용 하였다.

*P. olseni*의 감염도 조사는 Ray의 FTM 배양 방법을 이용하여 바지락 조직 내에 영양 체 상태로 존재하는 *P. olseni*를 휴면포자로 유도하였고, Choi의 방법에 따라 2M NaOH lysis 방법을 통해 감염도를 조사 하였다 (Ray 1952, Choi et al., 1989). FTM배지 제작 방법으로는 thioglycollate medium 29.8 g과 sodium chloride 20 g을 증류수 1 L에 넣고 교반 하면서 황금 색으로 변할 때 까지 가열한 후 15 mL conical tube에 10 mL씩 분주 하였다. 그 후 고압증기 멸균기를 이용하여 멸균 시킨 후 밀봉하여 실온의 암실에서 식힌 후 사용 하였다. FTM 배지에 패각을 제외한 나머지 조직을 넣고, 곰팡이와 세균의 번식을 억제하기 위해 10 mL의 에탄올과 메탄올에 nystatin 10 mg과 chloramphenicol 10 mg을 넣어 잘 섞은 후 각 tube에 20  $\mu$ L씩 주입 하여 실온의 암실에서 2주간 배양하였다. 감염도 측정을 위해 각 Tube를 5분간 2,000 rpm으로 원심분리 하여 상층의 FTM 배지를 제거하고, 2M NaOH를 넣어 50°C의 water bath에서 1시간 배양하여 휴면포자를 제외한 나머지 조직을 분해하였다. 그 후 5분간 2,000 rpm으로 원심분리 하여 상층의 2M NaOH용액을 제거한 후 tube속 용액이 10 mL가 되도록 0.01M PBS를 첨가 하였다. Tube를 vortex를 이용하여 교반 후 혈구계수판을 이용하여 0.4  $\mu$ L당 존재하는 휴면포자를 4차례 반복 계수하여 평균값을 구한 뒤 1개체 당 존재하는 *P. olseni*의 수와 조직 1 g당 *P. olseni*의 수를 산출 하였다.

성 성숙도 조사는 조직학적 관찰을 통해 실시하였다. 바지락 조직을 Davidson 용액에 2일간 고정 후 70% 에탄올로 치환 하였다. 그 후 생식소, 소화맹낭, 아가미를 포함한 부분을 5 mm 두께로 자른 후 자동조직처리기(LEICA TP 1010)를 이용하여 조직을 탈수하였으며, 포매기(LEICA EG 1160)를 이용하여 paraffin block에 봉입하였다. 파라핀 block은 5  $\mu$ m 두께로 박절한 후 slide glass에 부착하였으며, Mayer's hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색하였다. Canada balsam으로 봉입 후 광학현미경을 이용해 생식소 부분을 관찰하였다.

#### (5) 치폐 사육 수역의 수온, 염분 및 플랑크톤량 변화

실험 지역의 환경변화를 모니터링 하기 위해 수질자동측정기를 이용해 수온과 염분 및 식물성플랑크톤 (Fluorescence Spectral Unit, FSU) 양을 4월부터 8월말까지 측정 하였다.

### 다. 연구결과 및 고찰

#### (1) 수하식과 바닥식 양성 양성 바지락의 성장률 및 비만도



실험 시작일인 2011년 6월 16일 바지락의 평균 각장은  $11.61 \pm 1.46$  mm, 각고  $7.58 \pm 0.99$  mm, 각폭  $3.17 \pm 0.66$  mm, 총중량  $0.42 \pm 0.13$  g이었다. 그러나 실험 종료일인 2011년 9월 27일 수하식 바지락의 경우 28.97 mm까지 성장한 반면 바닥식 양성 바지락의 경우  $18.03 \pm 2.03$  mm에 불과하여 수하식 양성이 바닥식 양성에 비해 160%의 성장이 양호한 것으로 나타났다 (그림 3-5-5A). 각고는  $20.49 \pm 1.94$  mm와  $12.60 \pm 0.99$  mm (그림 3-5-5B), 각폭은  $13.39 \pm 1.39$  mm와  $7.35 \pm 0.71$  mm (그림 3-5-5C), 껍데기중량은  $1.39 \pm 0.29$  g와  $0.21 \pm 0.05$  g (그림 3-5-6A), 습중량은  $2.06 \pm 0.28$  g,  $0.53 \pm 0.10$  g (그림 3-5-6B), 총중량은  $3.45 \pm 0.52$  g,  $0.74 \pm 0.15$  g (그림 3-5-6C)으로 확인 되었다 (표3-5-1).

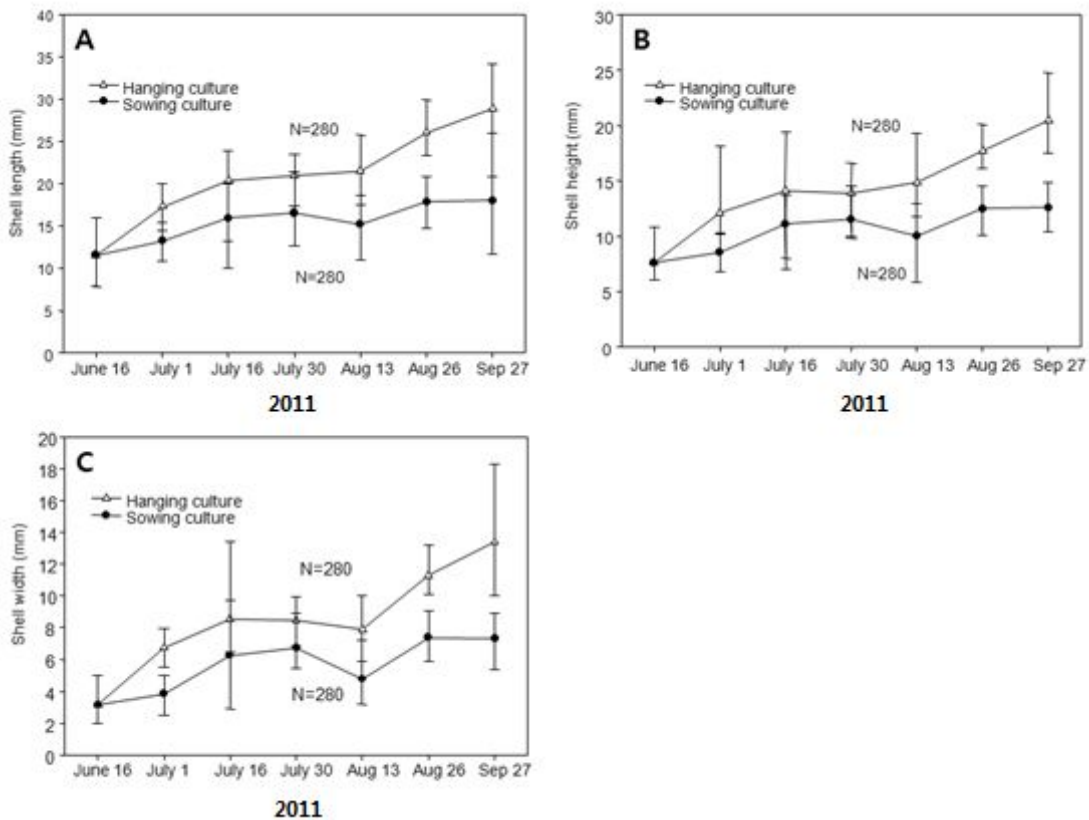


그림 3-5-5. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 패각 성장 비교. 각장(A), 각고(B), 각폭(C)

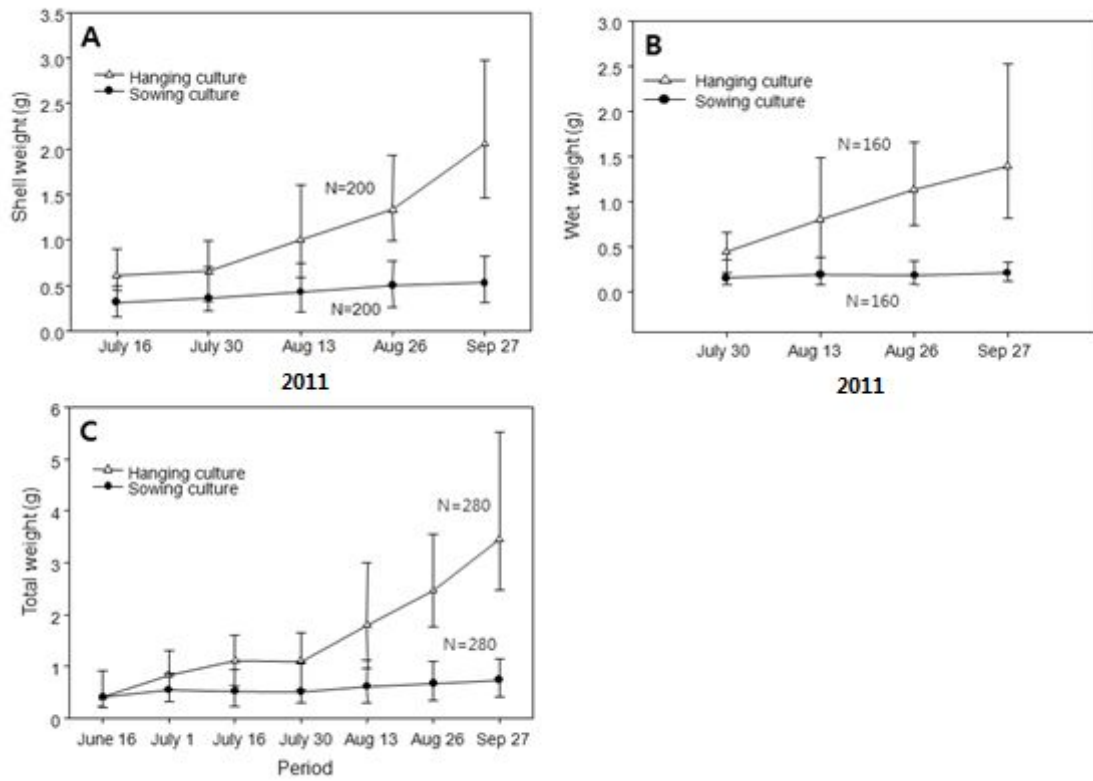


그림 3-5-6. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 패각 중량 비교. 패각중량(A), 습중량(B), 총중량(C) 비교



표 3-5-1 채집 날짜별 수하식과 바닥식 양성 바지락의 체장 및 체중 변화

	Shell length (mm)		Shell height (mm)		Shell width (mm)		Wet weight (g)		Shell weight (g)		Total weight (g)	
	Hanging	Sowing	Hanging	Sowing	Hanging	Sowing	Hanging	Sowing	Hanging	Sowing	Hanging	Sowing
June 16	11.61±1.46	11.61±1.46	7.58±0.99	7.58±0.99	3.17±0.66	3.17±0.66	-	-	-	-	0.42±0.13	0.42±0.13
July 01	17.33±1.17	13.27±1.30	12.11±1.37	8.50±0.96	6.73±0.55	3.84±0.58	-	-	-	-	0.84±0.18	0.56±0.13
July 16	20.47±1.70	15.99±1.95	14.08±1.62	11.09±1.39	8.54±1.06	6.27±1.14	-	-	-	-	1.11±0.21	0.53±0.16
July 30	21.05±1.54	16.55±1.72	13.87±1.48	11.51±1.02	8.47±0.76	6.75±0.67	0.66±0.14	0.37±0.09	0.44±0.10	0.15±0.05	1.10±0.24	0.52±0.14
Aug 13	21.57±1.86	15.23±1.68	14.87±1.82	9.98±1.39	7.90±1.01	4.79±0.82	1.00±0.25	0.43±0.11	0.80±0.24	0.19±0.0	1.80±0.49	0.62±0.18
Aug 26	26.11±1.34	17.86±1.51	17.73±0.81	12.50±1.06	11.29±0.83	7.38±0.84	1.33±0.20	0.50±0.12	1.13±0.23	0.18±0.05	2.47±0.41	0.68±0.17
Sep 27	28.97±1.93	18.03±2.03	20.49±1.19	12.60±0.99	13.39±1.39	7.35±0.71	2.06±0.28	0.53±0.10	1.39±0.29	0.21±0.05	3.45±0.52	0.74±0.15

비만도는 습중량/패각중량 으로 측정된 결과 수하식 양성장의 바지락의 경우 7월 30일부터 8월 26일까지 증가하다가 실험 종료일인 9월 27일에 감소하는 수치를 나타내었으며, 바닥식 양성장의 바지락은 7월 30일부터 8월 13일까지 소폭 증가 하였으나 8월 26일 감소했다가 실험 종료일인 9월 27일 다시 소폭 상승하는 수치를 나타내었다. 두 양성장의 비만도 비교 결과 수하식 양성장이 높은 수치를 나타냈다 (그림 3-5-7A). 또 다른 방법으로 비만도 조사 (습중량 x 1000/각장 x 각고 x 각폭)를 측정된 결과 7월 30일부터 8월 13일까지 상승하였다가 8월 13일부터 8월 26일까지 하락하였으며 수하식의 경우 9월 27일까지 감소하였으나 바닥식의 경우 소폭 상승하였다. 이 결과 역시 측정하였을 때 또한 수하식이 바닥식보다 높은 수치를 나타내었다 (그림 3-5-7B).

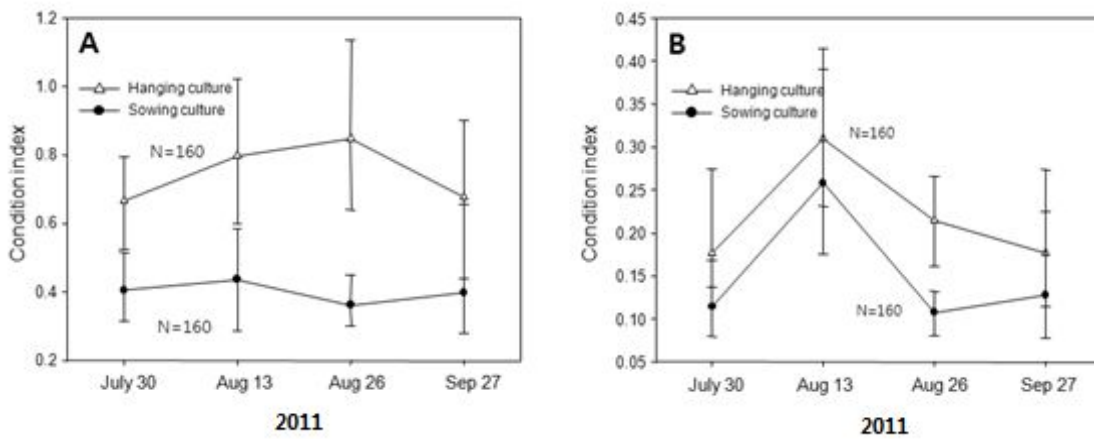


그림 3-5-7. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 비만도 비교. (A; 습중량 / 패각중량, B; 습중량 x 1,000 / 각장 x 각고 x 각폭)

실험 결과 각장, 각고, 각폭, 패각중량, 습중량, 총중량, 비만도 모두 바닥식 양성 보다 수하식 양성에서 높은 수치를 나타냈으며, 수하식 양성장에서 약 1.5배 이상 높은 성장률을 나타내는 것으로 확인 되었다 (그림 3-5-8).

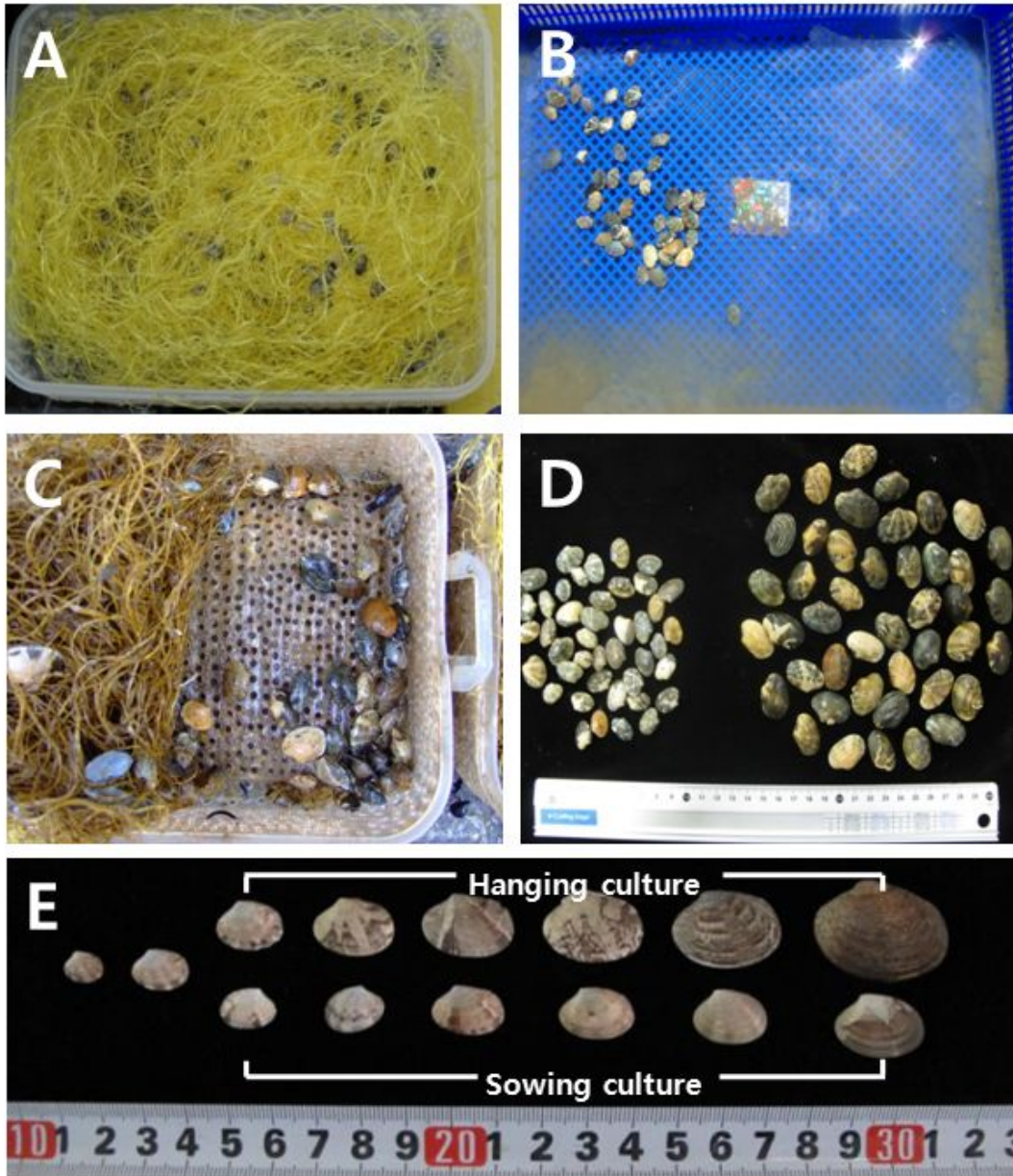


그림 3-5-8. 수하식 양성 바지락의 성장 결과. 내부 cage에 나일론 실타래를 충전한 모습 (A), 바닥식 양성장에서 채집된 바지락(B), 수하식 양성장에서 채집된 바지락(C), 바닥식과 수하식 바지락의 크기 비교(D), 실험 과정 중 수하식과 바닥식 양성 바지락의 성장 비교(E).

## (2) 수하식 양성장의 부착 생물 서식 현황

수하식 cage 시설에 다양한 부착 생물이 관찰 되었으며 부착 개체 수는 cage의 위치에 따라 다르게 나타났다 (그림 3-5-9A, 3-5-9B). 부착 생물 중 지중해 담치와 주름미더덕의 개체수가 높은 것으로 확인 되었다. 지중해 담치는 6월 16일에는 외부 cage에서 21개체가 확인 되었고, 7월 1일 54개체, 7월 16일엔 89개체, 같은 달 30일엔 660개체, 8월 13일 437개체, 8월 26일엔 841개체, 조사 마지막 날인 9월 27일엔 1,028개체가 부착되어 있었으나, 내부 cage의 경우 같은 기간 5개체 (7월 1일), 4개체 (7월 16일), 7개체 (7월 30일), 3개체(8월 13일), 6개체 (8월 26일), 4개체(9월 27일)에 불과 하였다 (표 3-5-2, 그림 3-5-9C-F). 주름미더덕은 외부 cage에서만 6월 16일 3개체, 7월 1일 6개체, 7월 16일 7개체, 7월 30일 8개체, 8월 13일 6개체, 8월 26일 4개체, 9월 27일 3개체가 관찰되었고, 내부 cage에서는 관찰되지 않았다 (표 3-5-3, 그림 3-5-10).



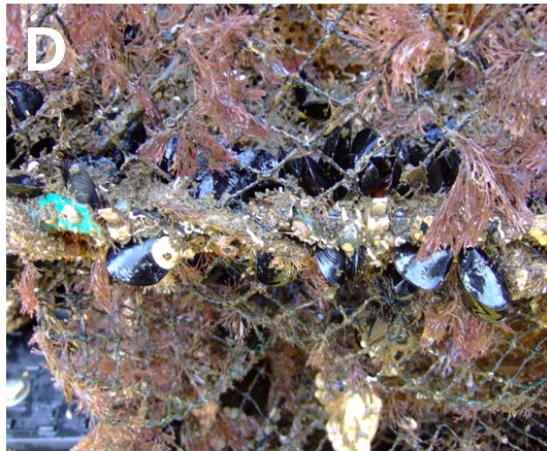
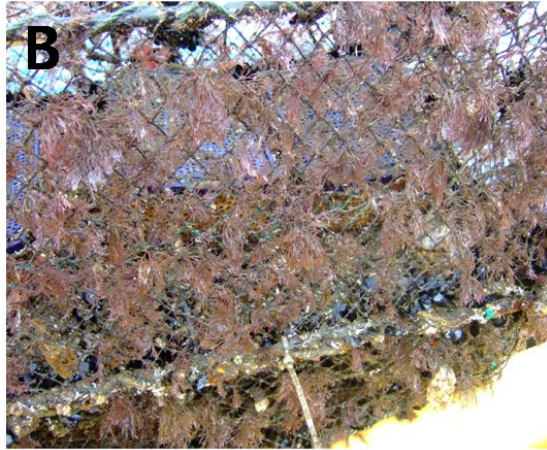


그림 3-5-9. 다양한 부착생물이 부착된 수하식 양성 외부 cage의 모습





그림 3-5-10. 수하식 양성 내부 cage 바깥쪽에 부착한 지중해담치

표 3-5-2. 수하식 양성 시설 중 외부 cage와 내부 cage에 부착한 지중해담치의 개체 수 비교

Period Cage type	June 16	July 1	July 16	July 30	Aug 13	Aug 26	Sep 27
Outer cage	21	54	89	661	437	841	1028
Inner cage	0	5	4	7	3	6	4

표 3-5-3. 수하식 양성 시설 중 외부 cage와 내부 cage에 부착한 주름미더덕의 개체 수 비교

Period Cage type	June 16	July 1	July 16	July 30	Aug 13	Aug 26	Sep 27
Outer cage	3	6	7	8	6	4	3
Inner cage	0	0	0	0	0	0	0

### (3) 누적 폐사율

실험 기간 동안 두 양성 방법의 누적 폐사율을 조사한 결과 수하식 양성과 바닥식 양성 모두 폐사율이 증가하였으나 바닥식의 경우 7월 1일부터 지속적으로 증가하여 연구 종료 시점인 9월 말에는 누적폐사율이 약 27%까지 증가한 반면, 수하식 바지락인 경우 같은 기간 동안 15%에 머물러 수하식 양성법이 바지락의 생존율을 높이는 양성 방법인 것으로 나타났다 (그림 3-5-11A).

### (4) *Perkinsus olseni* 감염 현황

*P. olseni*의 감염률 및 감염도를 조사한 결과 실험 시작일인 2011년 6월 7일부터 7월 1일까지는 수하식과 바닥식 양성장 모두 *P. olseni*가 관찰되지 않았으나 7월 30일 바닥식 양생장의 바지락에서 30%의 감염률을 나타냈다. 그 후 바닥식 양생장의 바지락의 경우 7월 30일 85%, 8월 13일 90%, 8월 26일 85%, 9월 27일 100%로 감염율이 급격히 증가하였다. 수하식 양생장의 경우는 바닥식 양성 바지락보다 약 1개월 이후인 8월 13일 처음으로 10%의 감염률을 나타냈으며, 8월 26일 5%, 9월 27일 70%의 감염률을 나타냈다 (그림 3-5-11B). *P. olseni*의 감염도는 바지락 1개체당 감염도 (cells/clam) 조사 결과 바닥식 양성 바지락의 경우 7월 16일 수십~수 백개의 총체가 발견되었으나 이후 급격히 증가하여 8월 13일에는 70만 개 이상 검출되는 바지락 치패도 관찰되었으며, 조사 종료 시점인 9월 말에는 100만개 이상 검출되는 개체도 확인되었다. 바닥식 양성 바지락의 경우 8월 중순부터 9월 말까지 대부분의 바지락에서 10만개 이상의 총체가 검출되었다 (그림 3-5-11C). 또한 바지락 습중량 1 g 당 총체 수로 표현한 감염도 조사결과 감염도는 8월 중순 급격히 증가하여 30만 개체 이상 검출되는 경우가 빈번히 나타났다 (그림 3-5-11D). 그러나 수하식에 의해 양성된 치패의 경우 *P. olseni*의 감염은 최초 검출이 7월 중순이었음에도 불구하고 8월 하순까지 감염도는 극히 미미하였으나 조사 종료 시점인 9월 하순경 일부 개체들에서 급격히 증가하였다 (그림 3-5-11C). 그러나 이 경우에도 바지락 1 g 당 총체 수로 환산한 결과 바닥식 양성 바지락에 비해 현저하게 낮게 측정되었다 (그림 3-5-11C). 따라서 *P. olseni* 감염은 수하식양성 바지락이 바닥식에 비해 *P. olseni* 감염 시기가 늦고 감염률과 감염도가 현저하게 낮은 것으로 확인되었다. 이와 같은 현상은 병리조직학적 관찰에서도 확인되었다.



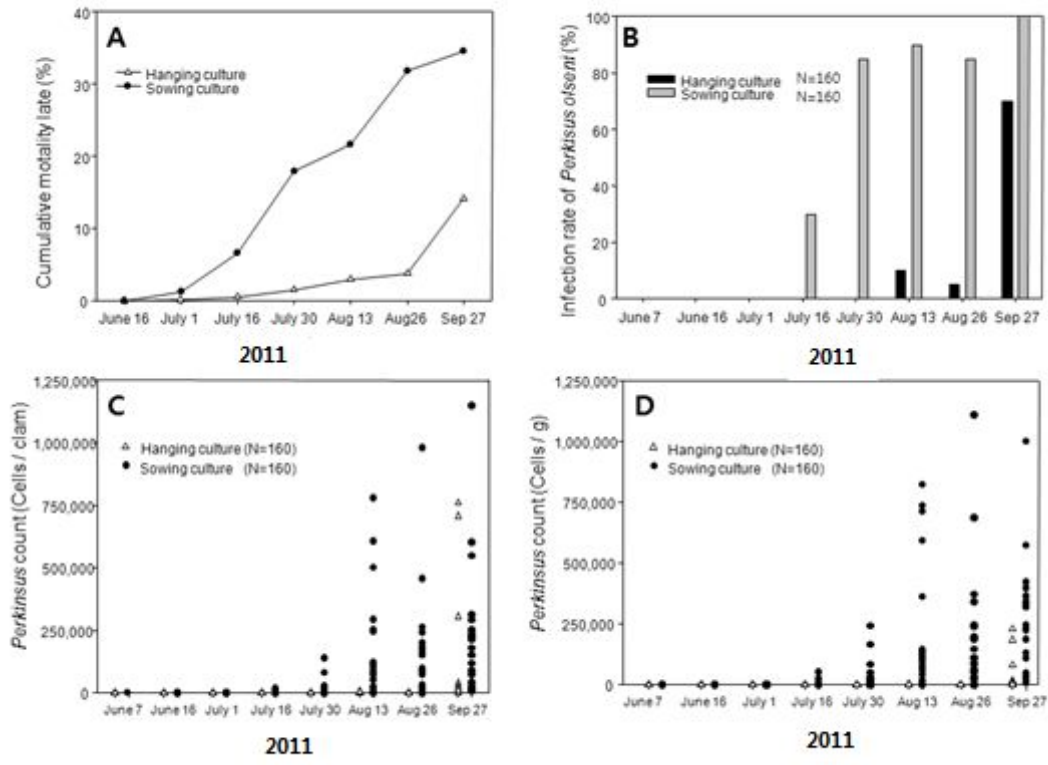


그림 3-5-11. 수하식과 바닥식 양생 바지락의 누적폐사율과 *P. olseni* 감염. 누적폐사율(A), *P. olseni* 감염률(B), *P. olseni*의 감염도 (C; Cells / clam, D; Cells / g)

표 3-5-4. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 누적 폐사율 비교

Culture type \ Period	Period						
	June 16	July 01	July 16	July 30	Aug 13	Aug 26	Sep 27
Hanging	0	0.15	0.50	1.50	2.93	3.73	14.16
Sowing	0	1.23	6.59	17.95	21.63	31.80	34.53

표 3-5-5. 수하식과 바닥식 양성 바지락의 *P. olseni* 감염률 비교

Culture type \ Period	Period						
	June 16	July 01	July 16	July 30	Aug 13	Aug 26	Sep 27
Hanging	0	0	0	0	10	5	70
Sowing	0	0	30	85	90	85	100

## (5) 생식주기

바지락의 조직 절편을 제작하여 H&E 염색 후 생식소를 관찰 한 결과 수하식과 바닥식에 의해 양성된 바지락 치패의 성 성숙 발달 상태가 다른 것으로 관찰되었다 (그림 3-5-12). 생식소의 성 성숙지수는 초기성숙단계, 후기성숙단계, 완전성숙단계, 부분적 산란단계 및 생식소 방출단계로 나누어 분류하였다 (그림 3-5-13, 그림 3-5-14). 실험 시작일인 6월 16일 치패의 성 성숙지수를 확인한 결과 초기성숙단계 78.57%, 후기성숙단계 21.43%로 확인되었다. 약 2주 후인 7월 1일 수하식 양성장의 바지락은 100% 후기성숙단계로 확인되었으나, 바닥식은 초기성숙단계 50%, 후기성숙단계 50%로 관찰되어 수하식 바지락의 성성숙이 바닥식 양식에 비해 조기에 발달하고 있음이 관찰 되었다. 이러한 현상은 이후 지속적으로 나타나 수하식의 경우 후기성숙단계가 7월 말까지 지속된 반면, 바닥식의 경우엔 이보다 1개월 늦은 8월 말까지 후기성숙단계의 치패들이 관측되었다. 이에 따라 생식소의 주된 완전성숙기는 수하식의 경우 7월 말부터 8월 말까지의 기간이었으나, 바닥식의 경우엔 8월 말부터 9월 말까지 1개월 정도 늦게 나타났다. 또한 생식소 방출기는 수하식이 7월 말부터 시작된 반면 바닥식은 8월 말부터 나타났다.

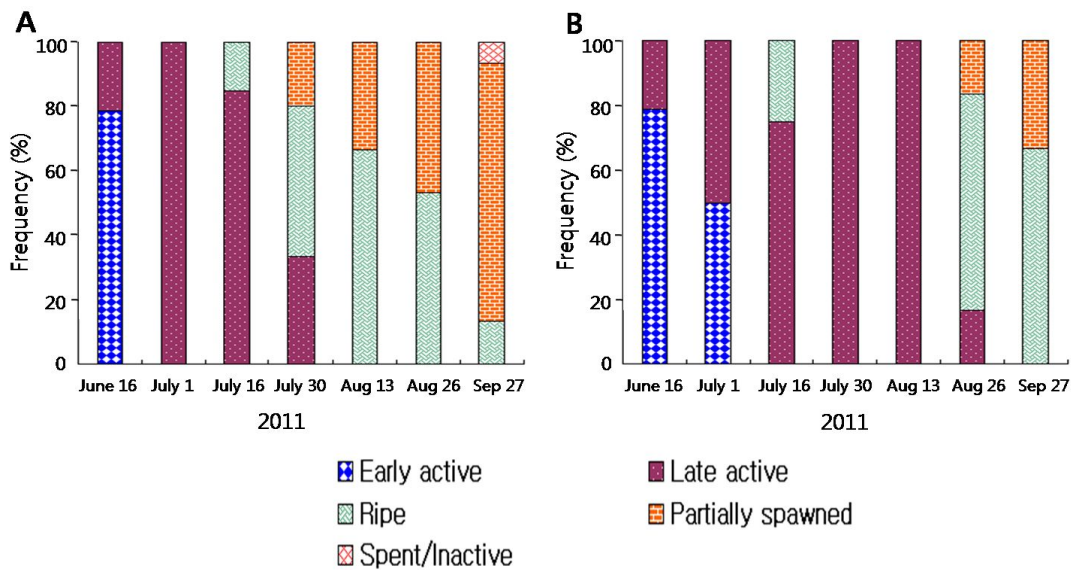


그림 3-5-12. 수하식과 바닥식 바지락의 생식주기 비교. 수하식 (A), 바닥식 (B)

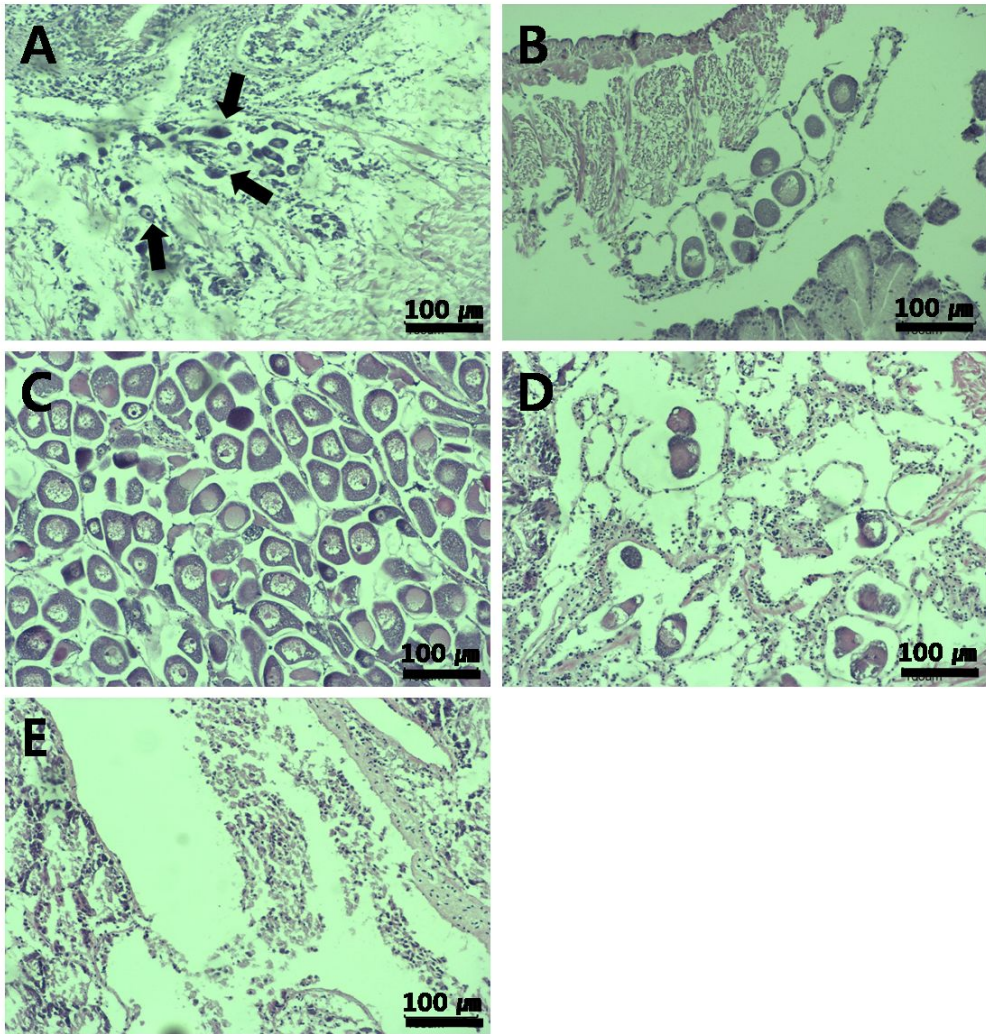


그림 3-5-13. 바지락 난모세포의 성숙단계 (A; Early active, B; Late active, C; Ripe, D; Partially spawned, E; Spent/Inactive)



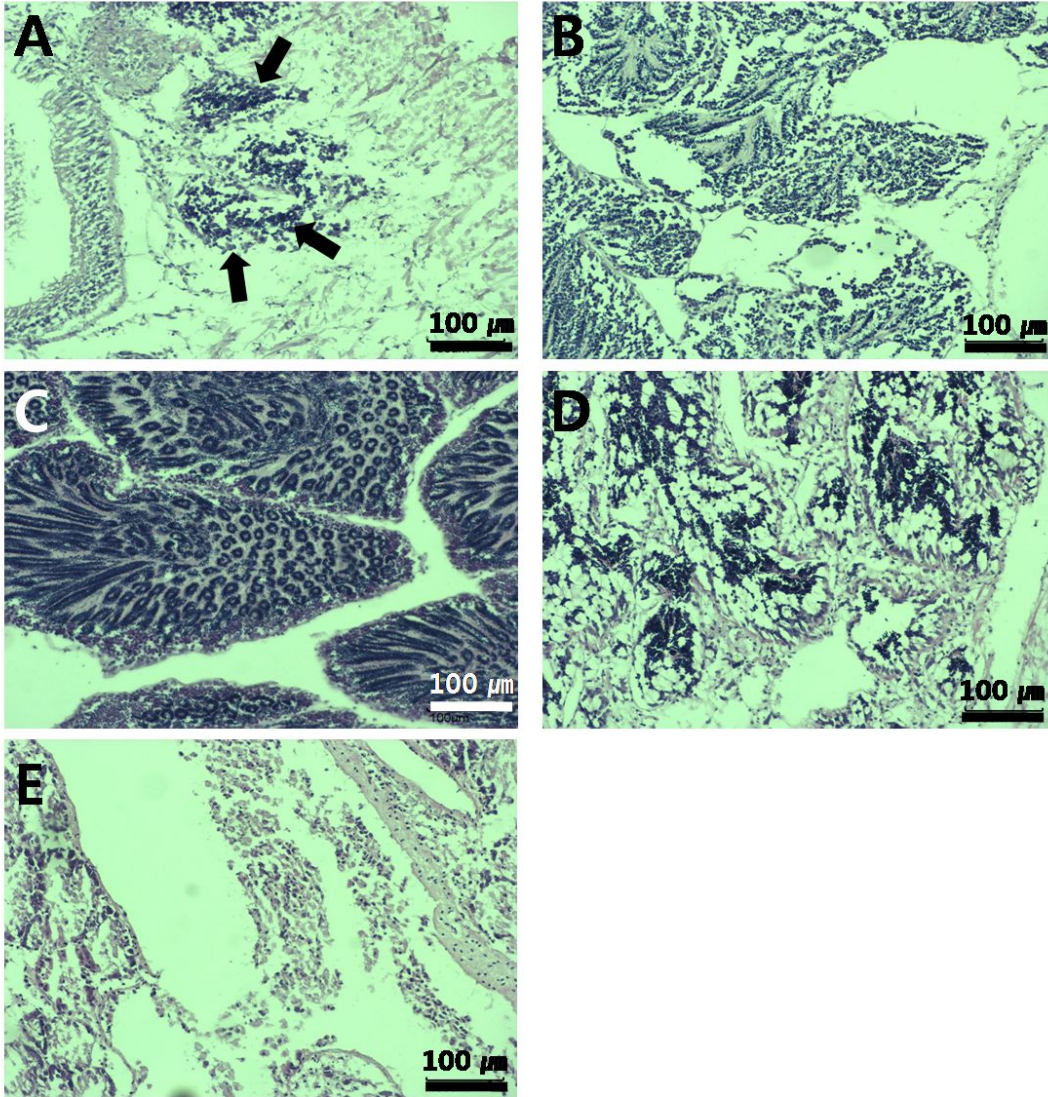


그림 3-5-14. 바지락 수컷 생식세포의 성숙단계 (A; Early active, B; Late active, C; Ripe, D; Partially spawned, E; Spent/Inactive.)

### (6) 치패 양성 해역의 수온, 염분 및 Chlorophyll 농도

실험 지역의 수온은 4월부터 8월 말까지 측정되었다. 4월에는 15°C 이하의 수온을 형성하고 있었으며 이후 지속적으로 상승하여 6월에는 20°C를 선회하였고 7월과 8월에는 25°C의 수온을 유지 하였다 (그림 3-5-15A). 염분은 4월초부터 6월 중순까지 30 psu를 유지하였으나 이후 지속적으로 감소하여 7월 중순경에는 23 psu까지 하락하였다. 이는 장마와 관련된 담수의 유입에 의한 것으로 추정되며, 이후 다시 상승하여 8월에는 26-29 psu의 염분을 유지하였다. FSU는 측정 시기마다 편차가 급격히 변화 하였으나 4월부터 7월 중순까지는 비교적 높은 값 (3.5 FSU 이상)을 유지한 반면 조사 하반기인 7월 말부터 8월 말까지 급격히 하락하여 1.5 FSU 이하를 나타냈다 (그림 3-5-15B).

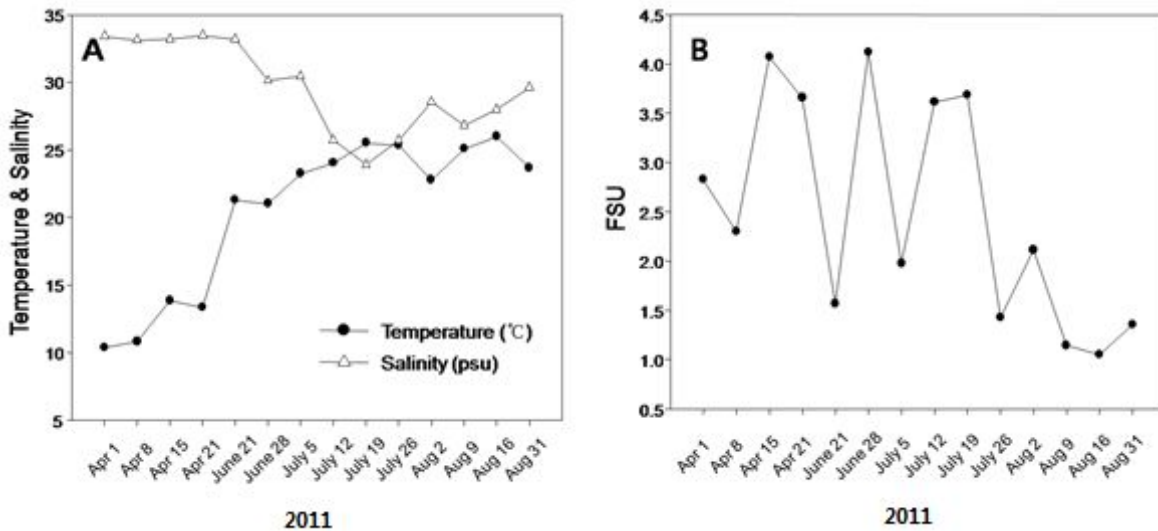


그림 3-5-15. 실험 지역의 수온, 염분 및 플랑크톤 변화. 수온 및 염분 (A), 식물플랑크톤 FSU (B)

## (7) 결론

본 연구결과 수하식 치패의 경우 성장 및 비만도가 바닥식에 비해 우수하며 질병에 대한 감염율과 감염도가 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. 또한 수하식이 폐사율도 낮은 것으로 나타나 바지락 양성에 있어 바닥식보다 효율적인 것으로 조사되었다. 생식소 발달 또한 수하식 양성이 바닥식 양 성장에 비해 1개월 정도 빠르게 진행되는 것으로 나타났으며, 이와 같은 현상은 바지락의 먹이이용 능력의 차이에 의해 나타나는 것으로 추정된다. 즉, 먹이 이용 능력이 상대적으로 우수한 수하식에서 성장과 생식소 발달이 빠르게 발달 되는 것으로 사료된다. 수하식 바지락의 생식소 조기 발달은 치패의 조기 생산으로 이어지기 때문에 본 과제의 1차년도 연령별 바지락의 성장 연구에서 밝힌 바와 같이 겨울철에는 치패 성장이 일어나지 않음을 고려할 때 부화 후 당해연도 겨울전까지 치패의 성장이 빠른 수하식 바지락이 그렇지 못한 바닥식 바지락에 비해 이듬해 성장이 빠를 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 세계적으로 현재까지 본 연구와 같이 바지락 치패의 수하식과 바닥식 양성 방법에 따른 성장 및 생식소 발달 비교 연구가 보고된 바 없기에 향후 추가 연구가 진행된다면 바지락의 성장을 촉진시킬 수 있는 중요한 단서를 제공할 수 있을 것으로 기대된다. 수하식 중간 양성을 위한 적지조사는 실시하지 못하였다. 하지만, 수하식 중간양성을 위한 적지의 가장 기본적인 조건은 해류의 영향이 거의 없어야 하며, 먹이환경이 풍부해야 한다는 것이다. 또한 조석간만에 의해 노출되지 않는 지역이어야 할 것이다. 바지락이 먹이섭취를 하는데 있어서 해류는 이러한 먹이섭취의 기회를 줄일뿐더러 해류로 인해 바지락이 먹이섭취 행동자체를 하지 않을 수 있기 때문이다. 그렇기 때문에 바지락 치패 중간 육성장은 이러한 해류의 영향이 거의 없고, 먹이환경이 좋은 남해안지역이 적당하다고 판단된다.



### 3-6절 인공 종묘생산의 산업화 적용 및 경제성 분석

#### 1. 먹이생물 생산비 저감을 위한 방안

바지락 인공종묘 대량생산을 위해 반드시 충분한 먹이 생물이 공급되어야 한다. 먹이 생물을 전문화된 설비 없이 현장에서 바로 적용될 수 있는 단계별 먹이생물 배양 방법과, 먹이생물 배지에 사용되는 값비싼 시약 대신에 저렴한 비료를 사용하여 원가절감을 할 수 있는 개량형 배지를 개발하여 생산비를 절감하였다.

f/2배지의 경우  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , vitamin B12 (cyanocobalamin), Biotin, Thiamine·HCl의 여러 가지 시약이 들어가며, 주요 영양분인  $\text{NaNO}_3$ 는 75mg/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 는 5 mg/L로 소요되, f/2 배지를 1 ton 만들 때 총 80 g이 사용된다. 그러나 본 개량 배지는 시약종류를 단순화하고 주요 영양분인 N, P영양분도 비료를 사용하여 10 g/ton 이내를 사용하며, 가격도 요소비료 (1,500원/kg), 복합비료 (2,800원/kg)로 다른 시약보다 5~10 배가량 저렴하여 주요 영양분만 비교해도 40~80배의 비용 절감을 할 수 있다.

이 기술은 식물플랑크톤을 먹이원으로하는 이매패류 뿐 아니라 전복, 굴 등 다른 패류와 해삼양식에도 활용될 수 있고 최근 양식업계의 구조개선에 따라 먹이생물 수요가 증가함에 따라 하나의 큰 사업으로 자리 할 수 있다.

#### 2. 기질에 따른 효율적인 채묘방법 개발

바지락 인공종묘 생산 과정에서 D형 유생기, 각정기 과정을 거쳐 착저를 하게 되는 유생, 중간 육성장으로 옮기기 위한 효율적인 채묘방법을 개발하였다. 이 방법은 성장 변이과정이 유사한 다른 이매패류의 육성과정에 적용할 수 있으며, 종묘 생산과정 중 패각이 부서지거나 유실되는 비율을 감소시키고 수조를 양호한 수질로 유지시켜 줄 수 있다. 또한 크기별 치패의 관리를 하여 먹이생물의 비율을 달리하여 생산량을 증가시킬 수 있다.

본 과제에서는 원생동물과 기생충 등의 해적생물로 인해 대부분 폐사하여 위 채묘방법에 따른 경제성을 말하기는 어려우나 이 채묘 과정을 통해 일부 원생동물 및 해적생물의 피해를 저감할 수 있었다.



## 제 4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절. 1차년도

구분	세부연구개발 목표	달성도	관련분야에의 기여도
1차 년도	우량 모패 확보를 위한 바지락의 건강도 및 질병감염도 조사	100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>우량 모패 선정시 면역학적 진단 기술 개발 및 최적화</li> </ul>
	전국바지락 모니터링	100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>바지락 건강도 및 질병감염도 조사 기술 확립</li> <li>전국 바지락의 건강도와 비만도 정보 수집</li> </ul>
	인공종묘 채묘기술개발	95 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>바지락 인공 종묘 채묘 기술 확보 (유생발달에 따른 채묘방법 확립)</li> </ul>
	대량먹이생물 배양	100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>먹이생물 최적 배양 조건 및 배양액 확립</li> <li>4종의 최적 먹이 생물 확보</li> <li>실험실과 양식 현장에서의 먹이생물 대량 배양 기술 개발</li> </ul>
	천적생물 제거	90 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>바지락 종묘생산시 유해생물 제거 기법 확립 (KMnO<sub>4</sub> 처리, 수조교환)</li> </ul>

## 2절. 2차년도

구분	세부연구개발 목표		달성도	관련분야에의 기여도
2차 년도	바지락 인공종묘 대량생산 시스템 개발	바지락 순치를 통한 조기 성 성숙 유도 가능성 파악	100 %	• 실내 사육 수조를 이용한 바지락 성 성숙 유도 기술 확보
		우리나라 바지락의 유전학적 특성 규명	100 %	• 바지락 집단 구별을 위한 Microsatellite marker 개발 및 제작 기술 확립
		바지락과 아기바지락 유전학적 비교	100 %	• 바지락과 아기바지락의 구별을 위한 형태 분류 key 및 유전학적 특성 규명 유전자 발굴
		전국바지락 모니터링	100 %	• 바지락 건강도 및 질병감염도 조사 기술 축적 • 전국 바지락의 건강도와 비만도 정보 수집
	먹이생물 대량 배양 및 농축기술 개발	먹이생물 대량 배양 및 자연발생 먹이생물 대량 확보 및 먹이생물 성분 분석	95 %	• 수온 및 해수 변화에 대한 먹이생물 배양법 확립 • 1차년도 먹이생물 대량 배양법 확립
		먹이생물 배양 및 공급방법 개발	100 %	• 대량 먹이생물 공급을 위한 펌프 시설 설비와 수동 공급법 확립
		먹이생물 농축시스템 기술 확립	90 %	• 다단 평막 스크린을 응용한 농축시스템 제안
		치패 생산, 선별 및 치패 크기별 사육관리 방법 개발	95 %	• 바지락 치패 생산을 위한 최적 먹이 공급 비율 확립
	유전적 다양성이 다른 바지락 집단 치패의 질병감염 특성	유전적 다양성이 다른 바지락 집단 치패의 질병 감염 특성 비교	100 %	• 지역별 바지락의 질병 감염에 대한 면역력 및 폐사율 측정 기술 확보
		바닥식과 수하식 바지락 중간육성 방법의 비교	100 %	• 수하식 바지락 치패의 성장 및 생존율 조사를 통한 수하식 양성 방법의 우수성 입증 • 수하식 양성 시 부착생물의 부착을 최소화 시킬 수 있는 양성기 개발

### 3절. 3차년도

구분	세부연구개발 목표		달성도	관련분야에의 기여도
3차 년도	바지락 인 공종묘 대 량생산 시 스템 개발	순환여과 수조를 이용한 바지락 순치	100 %	• 바지락 산란 유도 및 유생사육 기술 확보
		전국 바지락 모니터링	100 %	• 바지락 건강도 및 질병감염도 조사기술 축적 • 전국 바지락의 건강도 및 비만도 정보 축적
		유전적 다양성이 검증된 건강한 모패의 성숙관리	100 %	• 우리나라 바지락 집단과 외국 바지락 집단 구별을 위한 분자적 microsatellite marker 확보
		바지락과 아기바지락 유전학적 비교	100 %	• 바지락과 아기바지락 4종의 유전자 (48개) 등 록
	먹이 생물 대량 배양 및 농축기 술 개발	먹이생물 생산의 안정성 유지 연구	100 %	• 수온에 따른 먹이생물 대량 생산 방법 개발
	바닥식 양 성 바지락 양성장에서 의 질병 감 염 연구	바닥식 양성 양성과 수하식 바지락 치패의 질병감염 비교	100 %	• 바닥식 양성 바지락 치패의 질병 감염이 수 하식에 비해 조기에 발생하며 그 감염율과 감염도가 높음을 규명.



## 제 5장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1절. 우량 모패 확보 기술 및 바지락 성 성숙 유도

이번 연구는 바지락 인공종묘 생산에 있어 3년간 우리나라 전 연안의 조간대에 서식하는 바지락의 번식량 및 비만도를 조사하여 바지락 인공종묘 생산 시 고려해야 할 우량 모패 집단의 선별에 대한 우량 바지락 모패 서식지에 관한 기초 자료를 수집할 수 있었다. 또한 조직학적 관찰을 통한 바지락 생식소 발달 단계의 관찰 결과는 성 성숙 시기에 따른 바지락 모패 선정 기준을 제시하였고, 이 결과를 바탕으로 바지락 양식어민들의 인공 종묘 생산 시 중요한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 3년간 각 지역별 바지락 포자충에 관한 연구를 진행하면서 바지락 포자충에 감염된 지역의 정보를 어민들이 활용할 수 있을 것이다. 우량 바지락 모패의 성 성숙 시기를 실내사육수조를 이용한 conditioning 실시하여 바지락의 산란시기를 조절할 수 있는 기술을 확립하였고, 확보된 기술은 추후 바지락 양식 어민들에게 인공 종묘 생산 기술로 보급될 수 있을 것이다. 또한, conditioning 기술은 바지락뿐만 아니라 우리나라 주된 이매패류 종을 대상으로 활용될 수 있으며, 산란 시기의 인위적인 조절 기술은 양식현장에서 활용되어 더 나아가 이매패류 양식 산업에 기여할 수 있을 것이다. 또한, 바지락 conditioning시 최적 수온 및 먹이생물의 공급량에 관한 정보는 인공 산란 유도 기술에 중요한 자료로 활용될 것이다.

### 2절. 건강한 바지락 모패 선정을 위한 분자 marker 기술

우리나라 바지락 혈구의 발현 유전체 유래 microsatellite marker를 성공적으로 제작하여 우리나라 바지락 개체군내 이들 유전자의 다양성을 처음으로 확인하였다. 또한, 우리나라 바지락과 외국바지락(일본, 중국, 홍콩)과의 집단 비교시에도 집단별로 구별할 수 있는 유용한 marker임을 확인하였다. 현재 우리나라 바지락 양식은 우리나라 서해안에서 집중적으로 이루어지고 있으며, 일부에서는 중국의 종패가 유입되어 국내 바지락 종내 외래종의 유전자 혼입과 더불어 고유 바지락종의 멸종, 열성개체 생성 및 여러 질병의 전파가 우려되고 있다. 따라서 이번 연구로 개발된 분자 marker를 이용한 외국산 바지락 유입 및 불법 양식 규제를 위한 유용한 기초 자료로 제공될 것이다.

바지락종의 형태학적 분류는 서식지에 따라 크기, shell의 형태, 패각의 다양한 무늬 패턴들이 존재하여 동일종 또는 이종으로 분류되는 경우가 종종 보고되고 있다. 그러나, 이번 연구는 국내에서 서식하는 특히 제주도에 서식하는 바지락은 아기바지락과 바지락이며, 이들은 서로 다른 서식지에 존재하고 있음을 형태 및 유전학적 특성을 이용하여 최초로 규명하였다. 또한, 해산이매패류의 유전학적 분석에 일반적으로 단일 유전자(18S rDNA, ITS, 또는 COI)를 이용하여 분석하는 경우가 많으나, 3종의 핵내와 1종의 미토콘드리아에 존재하는 유전자를 동시에 비교함으로써 바지락종의 형태학적 분류



의 난점을 분자생물학적 기법의 응용을 응용함으로써 해산 이매패류의 분류에 기초적인 자료로 활용될 것으로 생각된다.

### 3절. 먹이생물 대량 배양 및 인공종묘 생산 기술

본 연구에서는 모패 선정에서 중간양식과정을 순차적으로 소개하여 바지락 인공종묘 생산을 구체화 하였다. 이 과정을 통해 바지락 산란 시 적정 세포 밀도와 단계별 변이과정의 시간을 제시하였고 착 저 단계에서 발생하는 원생동물의 영향을 최소화 할 수 있는 방법을 여러 차례 시도하여 이를 절충할 수 있는 방법을 제시할 수 있었다. 또한 인공종묘 생산과정에서 각 유생시기별 채묘기술을 개발하였다. 단, 바지락 인공종묘의 대량생산이라는 수익성 있는 목표치에 미치지 못하는 못하였으나 지금도 지속적인 연구를 수행하고 있는 과도기적 시기에 많은 정보와 기술을 제공하고 이와 같은 시행착오를 되풀이 하지 않을 수 있는 역할을 할 것이라고 생각된다. 본 기술은 다른 이매패류의 종묘 생산에도 응용할 수 있으며 특히 바지락 보다 패각이 두껍고 단단한 꼬막, 피꼬막, 백합, 모시조개 뿐 아니라 향후 수산업적으로 가치가 높은 이매패류의 종묘 대량 생산에도 직접적인 활용이 가능 할 것으로 보인다. 바지락 인공종묘 생산이라는 지침서를 작성하여 어민들에게 기술을 전수하고 활용할 수 있다.

패류 (바지락 외 이매패류) 종묘 생산에 가장 필요한 항목 중 하나인 먹이생물의 대량 생산방법을 제시하여 식물플랑크톤을 먹이원으로 이용하는 이매패류 뿐 아니라 전복, 굴 등 다른 패류와 해삼양식에도 활용될 수 있다. 최근 양식업계의 구조개선에 따라 먹이생물 수요가 증가함에 따라 하나의 큰 사업으로 자리 할 수 있다.

또한 본 연구에서는 먹이생물의 생산비 저감을 위해 저렴한 비료 등을 이용하여 개량형 배지를 만들고 대량 생산까지의 시간을 단축하기 위한 단계별 먹이생물 생산 방법을 제시했다. 단계별 먹이생물 방법은 양식현장에서 전문화된 설비 없이 실용화 하도록 나타났다. 이를 통해 먹이생물 생산의 원가를 절감하고 어민들도 쉽게 접근 할 수 있도록 하였다. 또 바지락 유생의 성장단계별로 필요한 먹이의 선호도를 제시하여 바지락 종묘 생산의 중요 역할을 했다. 바지락 성패의 생산량을 증대시키면 기업화가 가능하며, 가공과 유통분야를 결합시켜 국내시장의 활성화와 국외 시장도 개척이 가능하다.

## 제 6장. 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보

### 1절. 미국 하와이 Pacific aquaculture & coastal resources center (PACRC) 방문

2010년 6월, 미국 하와이 힐로지역에 위치한 Pacific aquaculture & coastal resources center (PACRC)를 방문하였다 (그림 6-1-1). PACRC는 하와이 힐로대학 내 위치하고 있는 연구소로서, 이곳의 설립 목적은 유용 가능한 해산 이매패류 양식 자원을 개발 보호하는 것이다. 이번 연구팀이 방문할 당시 PACRC는 흑진주 조개 자원 보호에 관한 연구로서 흑진주 인공종묘 치패를 생산하고 있었으며 생산된 치패는 다시 본국으로 수출을 하고 있었다. 한국의 경우, 국립수산과학원 패류연구 센터에서 바지락 치패를 실험적으로 육상수조에 산란 시켜 3~4 mm 까지 양성시킨 사례가 있으나 대량생산은 이뤄지지 않고 있다. 따라서, 이번 PACRC 방문 목적은 이곳의 이매패류 치패 생산 과정을 살펴보고 현재 우리가 실행하고 있는 바지락 종묘생산 방법과 비교함으로써 문제점을 보완하고 그 해결책을 찾아보고자 하였다.

#### 1. PACRC 주요 시설 및 시스템

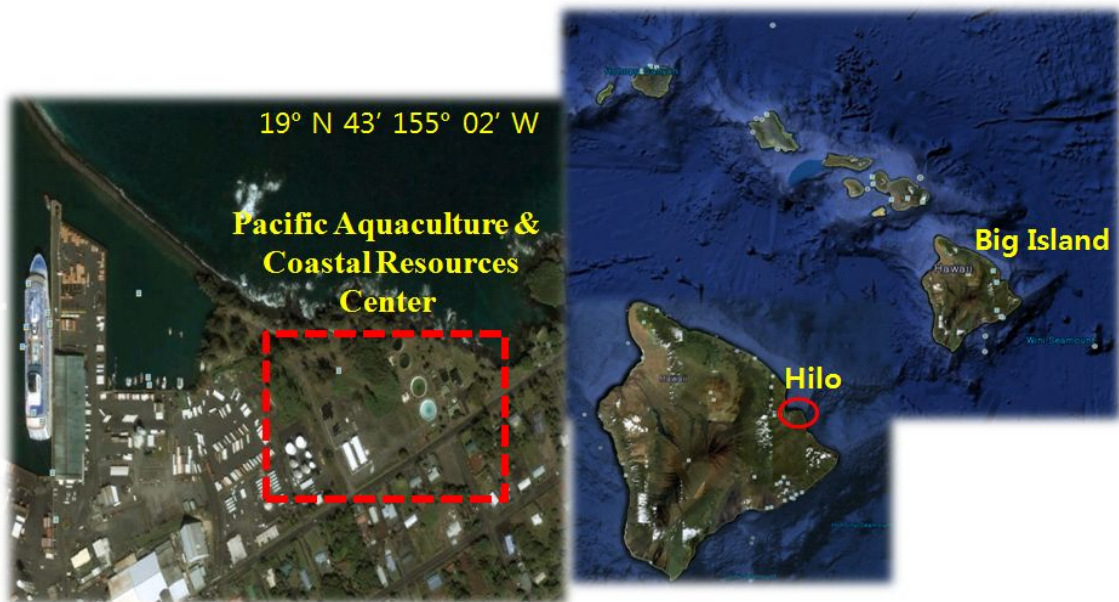


그림 6-1-1. 하와이 힐로에 위치한 Pacific aquaculture & coastal resources center

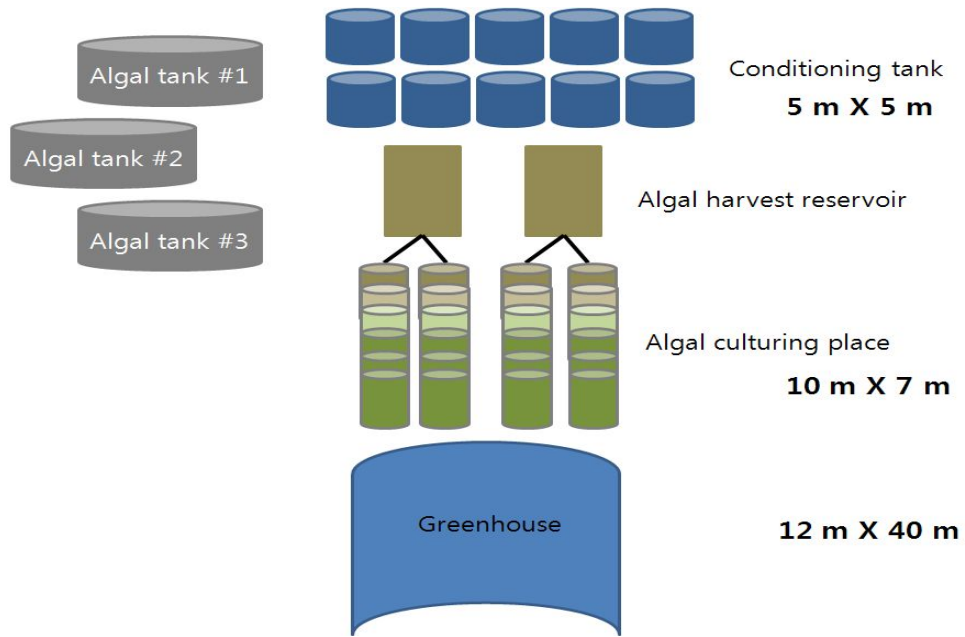


그림 6-1-2. PACRC안에 있는 패류양식장의 전경

이곳의 패류양식장은 하우스 1동과 식물플랑크톤 배양장, 순치 사육실로 구성되어 있고 (그림 6-1-2), 하우스 내부에는 3톤 규모의 부화장 4개, 유생실험 탱크 10개, 원종배양실 및 산란장이 포함되어 있다 (그림 6-1-3).

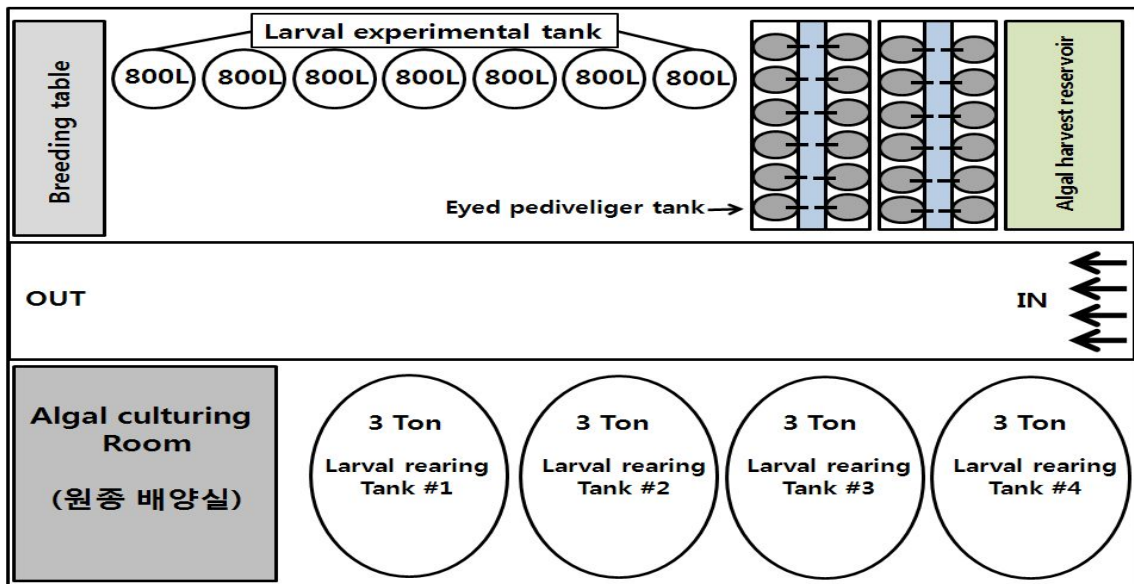


그림 6-1-3. 하우스 내부 도면도

3톤 사육조의 구성은 그림 6-1-4와 같다. 부화조에 공급되는 해수는 0.9 L/10 sec의 속도로 유량계를 통하여 조절되며, 먹이생물 공급량은 시작 시 30 mL/10 sec씩 공급되며 매주 15 mL씩 증가시키며, 공급량 역시 유속계로 조절이 가능하다.

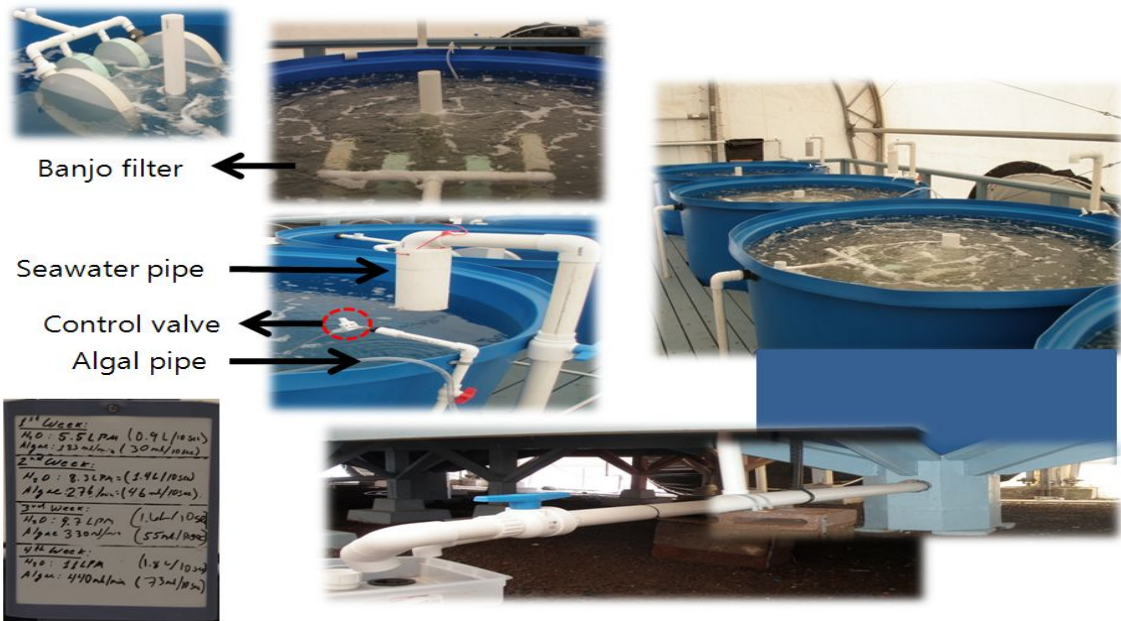


그림 6-1-4. 하우스 내부에 있는 3톤 규모 사육탱크

유생사육 탱크는 600 L 탱크 10개로 구성되어 있으며 3톤 사육조와 마찬가지로 각 탱크별로 해수 공급 및 먹이 공급은 유속계를 통하여 조절할 수 있는 시스템으로 설치가 되어 있다 (그림 6-1-5).

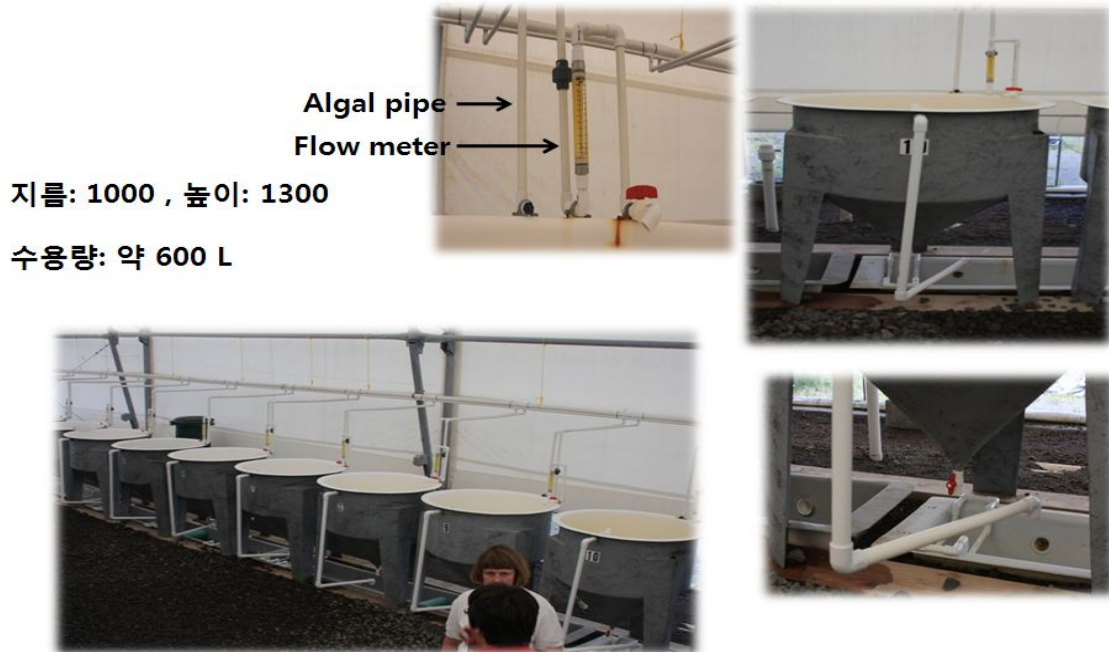


그림 6-1-5. 유생실험 탱크의 전경 및 구성 요소

하우스 내부에는 이패매류의 인공산란 유도탱크가 위치하고 있으며, 수온자극에 의한 산란을 유도한다. 산란유도 탱크는 그림 6-1-6과 같으며 바지락의 경우 평균 사육온도보다 7~10°C 높은 해수를 공급해 산란유도를 실시한다.





**Length: 80 cm**

**Height: 200 cm**

**Deep: 130 cm**

**Volume: 480 L**

그림 6-1-6. 이매패류의 인공산란 유도탱크

PACRC에서는 400 L 규모의 비닐 팩에서 *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Pavlova* 등의 먹이생물 (식물플랑크톤)을 배양하고 있다. 초기 1/4정도 배양된 식물플랑크톤을 첨가하여 실외조건하에서 2일정도 지나면 광합성을 통해 식물플랑크톤이 증가하는데, 이후 1/4정도의 해수를 첨가하고 2일이 지나면 수확하게 된다. 먹이생물이 일정 수위에 이르면 수표면 부근에 출수밸브를 통해 외부로 공급되며, 먹이생물 공급량은 새롭게 공급되는 해수의 양에 비례한다. 출수밸브를 통해 모아진 먹이생물은 저장탱크로 모이게 되며 유생 사육탱크로 공급된다 (그림 6-1-7).

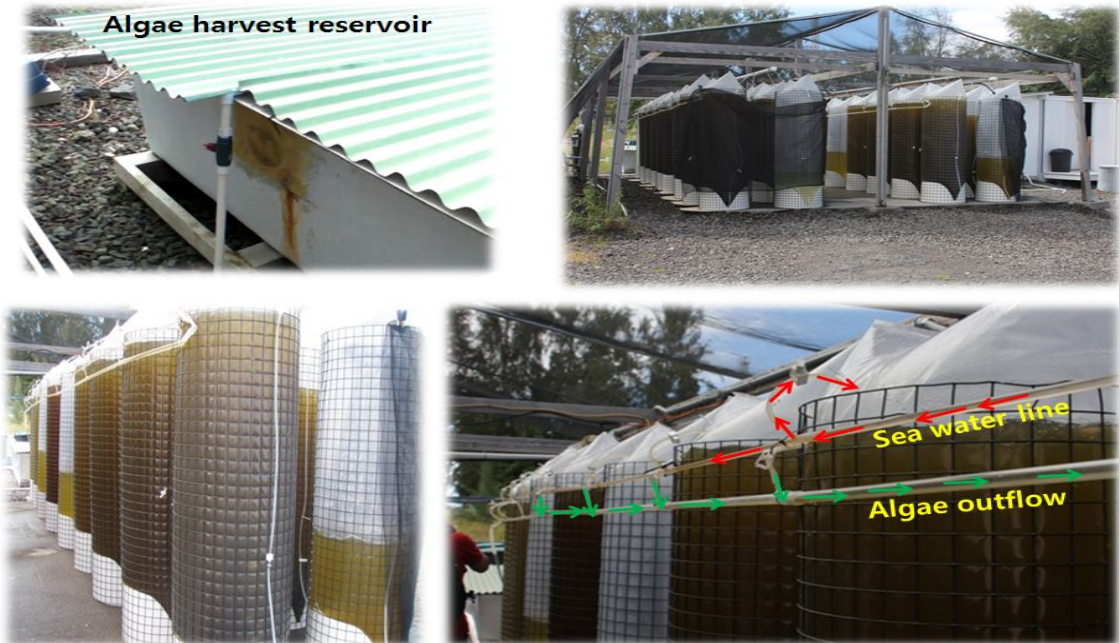


그림 6-1-7. 식물 플랑크톤 배양장의 전경 및 식물플랑크톤 저장소

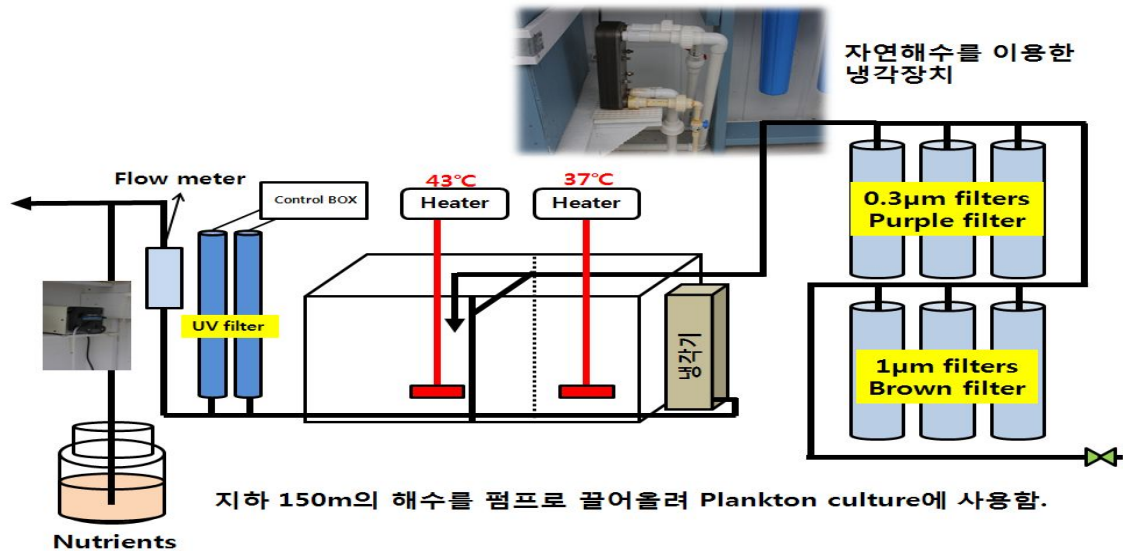


그림 6-1-8. 먹이생물 배양에 필요한 해수 필터 시스템

## 2. 고찰

Pacific aquaculture & coastal resources center (PACRC)의 역할은 태평양 연안의 유용 가능한 해산 이매패류 양식 자원의 개발 및 보호에 있다. 이곳에서 생성된 치패는 미국 동부 워싱턴 연안에 살포하여 자원량을 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있다. PACRC가 하와이에 위치한 이유 중에 가장 큰 이유는 이매패류 종묘를 양식하는데 있어 해수의 질이 가장 중요하기 때문이다. 이곳은 지하 100 m에서 취한 해수를 이용하여 저온살균 및 카트리리지 필터를 통과한 해수를 이매패류양식에 사용하고 있었다 (그림 6-1-8). 바지락은 자연 폐사율이 높아 해수 속에 포함된 적은양의 박테리아 및 병원성 생물들이 폐사된 바지락유생을 숙수로 삼아 활동하기에 적합하기 때문이다. 따라서, 우리나라 이매패류의 양식 및 종묘 생산을 위해서는 먹이 생물의 배양 기술 및 대량 배양법의 확보도 중요하지만, 양질의 해수를 갖는 우리나라 연안 환경 수역 조사에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

PACRC는 먹이생물을 기르는데 있어서 배지자동공급 장치를 이용하여 일정량의 배지를 공급하는데, 이렇게 공급된 배지의 양만큼 먹이생물이 배출되어 저장소에 모이게 된다. 이렇게 모인 먹이생물을 cells/mL로 계산하여 1일 공급량을 계산하여 필요한 만큼 모패 및 치패에 공급을 할 수 있는 시스템을 적용하고 있었다. 현재 우리나라의 인공종묘 시스템을 보면, 먹이생물을 필요한 양만큼 계산하여 공급하기 보다는 과잉 공급하는 경향이 많다. 또한 먹이공급 및 배양하는데 있어 많은 시간과 노동력이 들어가고 있으며, 먹이생물의 과잉공급으로 경제적인 측면에서 손실이 크다. 이에 반해, PACRC에서는 이매패류 종묘 생산에 관한 매뉴얼을 확립하여 치패 크기에 따른 먹이공급량이 제시되어 있다. 따라서, 추후 우리나라 해산 이매패류의 종묘 생산시 원활한 먹이생물을 공급하기 위해서는 상기의 먹이생물배양 시스템을 도입하여 자동화된 설비를 갖추는데 유용한 정보로 활용될 것으로 생각된다.





## 제 7장 참고 문헌

- Ali, F., and K. Nakamuara. 1999. Effect of temperature and relative humidity on the tolerance of the Japanese clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve), to air exposure. *Aquaculture Res.* 30, 629-636.
- Allam, B., C. Paillard and S.E. Ford. 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapestis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat Org.* 47, 221-231.
- Auzoux-Bordenave, S., A.M. Vifario, F. Ruano, I. Domart-Coulon and D. Doumenc. 1995. In vitro sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *J. shellfish Res.*, 14, 469-475.
- Ashton-Alcox, K.A., and S.E. Ford. 1998. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue and Cell.* 30, 195-204.
- Bai, Z., Y. Yin., S. Hu., G. Wang., X. Zhang and J. Li. 2009. Identification of genes involved in immune response, microsatellite, and SNP markers from expressed sequence tags generated from hemocytes of freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Mar Biotechnol.* 11, 520-530.
- Bezemer, B., D. Butt, J. Nell, R. Adlard and D. Raftos. 2006. Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 627-636.
- Carlsson, J. and K.S. Reece. 2007. Eight PCR primers to amplify EST-linked microsatellites in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* genome. *Molecular Ecology notes*, 7, 257-259.
- Ceballos-Vazquez, B.P., M. Arellano-Martinez, F. Garcia-Dominguez and M. Villalejo-Fuerte. 2000. Reproductive cycle of the rugose pen shell, *Pinna rugosa* Sowerby, 1835 (Mollusca: bivalvia) from Bahia concepcion, Gulf of California and its relation to temperature and photoperiod. *J. Shellfish Res.* 19, 95-99.
- Choi, K.-S., E.A. Wilson, D.H. Lewis, E.N. Powell and S.M. Ray. 1989. The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. *J. Shellfish Res.* 8, 125-131.
- Choi, K.S. and K.I. Park. 1997. Report on the occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Korea J. Aquacul.* 10,227-237.
- Choi, K.S., D.H. Lewis, E.N. Powell and S.M. Ray. 1993. Quantitative measurement of using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture and using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).* *Aquaculture and Fisheries Management* 24, 375-398.
- Choi, K.S., E.N. Powell, D.H. Lewis and S.M. Ray. 1994. Instantaneous reproductive effort in female American oysters, *Crassostrea virginica*, measured by a new immunoprecipitation assay. *Biol. Bull.* 186, 41-61.
- Chu, F.L.E. 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, N., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent advances in marine biotechnology. Immunobiology and pathology.* Science Publishers, Enfield (NH), USA, pp. 1-42.
- Chung, E.Y., J.S. Lee, C.H. Lee and S.B. Hur. 2002. Reproductive cycle of natural population and

- artificial control of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* by the conditions of water temperature-feeding and starvation. Korean J. Malacol. 18, 83-91.
- Chung, E.Y., Y.B. Hur, M.S. Shin and Y.M. Kim. 2005. Reproductive biology of the female Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia:Veneridae) on the West coast of Korea. Korean J. malacol. 21, 1-11.
- Cullen, J.J. and E.H. Renger. 1979. Continuous measurement of the DCMU- induced fluorescence response of natural phytoplankton populations. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 53, 1-29.
- de Montaudouin, X. 1997. Potential of bivalves secondary settlement differs with species: a comparasion between cockle (*Cerastoderma edule*) and clam (*Ruditapes philippinarum*) juvenile resuspension. Marine Biol. 128, 639-648.
- Defossez, J.-M. and A.J.S. Hawkins. 1997. Selective feeding in shellfish: size-dependent rejection of large within pseudofaeces from *Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussatus*. Marine Biol. 129, 139-147.
- Degremont, L., P. Boudry, M. Report, J.F. Samain, E. Bedier and P. Soletchnik. 2010. Effets of age and environment on survival of summer mortality by two selectd groups of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture. 229, 44-50.
- Dittman, D.E., S.E. Ford and D.K. Padilla. 2001. Effects of *Perkinsus marinus* on reproduction and condition of the eastern oyster *Crassostrea virginica*, depend on timing. J. Shellfish Res. 20, 1025-1034.
- Dittman, D.E. 1993. The quantitative effects of *Perkinsus marinus* on reproduction and condition in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res. 12, 127.
- Domitilia, M., J. Sandra and L. Alexandra. 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linne, 1758). Aquacult. Int 17, 257-271.
- Domotor, S.L., K. Mountford and C.F. D' Elia. 1982. Autoradiograph detection of species specific thermal stress effects on natural phytoplankton assemblages. Mar. Environ. Res. 6, 27-35.
- Donaghy, L., C. Lambert, K.-S. Choi and P. Soudant. 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decusattus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. Aquaculture. 297, 10-24.
- Drummond, L., M. Mulcahy and S. Culloty. 2006. The reproductive biology of Manila clam, *Ruditapes philinarum*, from the North-West of Ireland. Aquaculture. 254, 326-340.
- Drummond, L., M. Mulcahy and S. Culloty. 2006. The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. Aquaculture. 254, 326-340.
- Duchemin, M.B., M. Fournier and M. Auffret. 2007. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture. 264, 73-81.
- Fischer-Piette, E. and D. Vukadinovic. 1977. Sute des révisions des Veneridae (Moll. Lamellibr) *Chioninae*, *Samaranginae* et complément aux *Vénus*. Mém Mus Nat Hist Nat, Paris, Série A. 106, 1-182.
- Flye-Sainte-Marie, J., P. Soudant, C. Lambert, N. Le Goic, M. Goncalvez, M.-A. Travers, C.

- Paillard and F. Jean. 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 377, 1-11.
- Gagnaire, B., M. Gay, A. Huvet, J.-Y. Daniel, D. Sulnier and T. Renault. 2007a. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *In vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat Toxicol.* 84, 92-102.
- Ganaire, B., P. Soletchnik, P. Madec, P. Geairon, O. Le Moine and T. Renault. 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture.* 254, 606-616.
- Gagnaire, B., P. Soletchnik, N. Faury, N. Kerdudou, O. Le Moine and T. Renault. 2007b. Analysis of hemocyte parameters in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in the field. Comparison of hatchery diploids and diploids from natural beds. *Aquaculture.* 264, 449-456.
- Gagne, F. C. Blaise, J. Pellerin, M. Fournier, M.J Durand and A. Talbot. 2008. Relationship between intertidal clam population and health status of the soft-shell clam *Mya arenaria* in the St. Lawrence Estuary and Saguenay Fjord (Quebec, Canada). *Environ. Int.* 34, 30-43.
- Goedken, M. and S. De Guise. 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 539-552.
- Galindo-Sánchez, C.E., C.I. Pérez-Rostro, J. La Rosa-Vélez, P.M. Gaffney and P. Cruz. 2007. Assessment of genetic diversity of the American oyster (*Crassostrea virginica*) in Veracruz, Mexico using microsatellite markers. *Aquaculture.* 272, S258-S259.
- Gouletquer, P., M. Wolowic, A. Latala, P. Geairon, A. Huvet and P. Boudry. 1999. Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat of *Crassostrea gigas* of French, Japanese, Spanish and Taiwanese origins. *Aquat Living Resour.* 12, 271-277.
- Hégaret, H., G.H. Wikfors and P. Soudant. 2003a. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: I. Haemocyte types and morphology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 237-248.
- Hégaret, H., G.H. Wikfors and P. Soudant. 2003a. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 249-265.
- Hégaret, H., P.M. da Silva, G.H. Wikfors, C. Lambert, T. De Bettignies, S.E. Shumway and P. Soudant. 2007. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquat Toxicol.* 84, 469-479.
- Helene, H., M.S. Patricia, H.W. Gary, L. Christophe, D.B. Thibaut, E.S. Sandra and S. Philippe. 2007. Hemocyte response of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquatic toxicol.* 84, 469-479.
- Helm, M.M. and N. Bourne. 2004. Hatchery operation: Broodstock conditioning, spawning, and fertilization. In: A. Lovatelli, editor. Hatchery culture of bivalve: A practical manual, FAO fisheries technical paper 471, Rome, Italy.
- Hiroko, I., H. Masami., U. Hironori, T. Takeshi, Y. Midori, I. hisoshi, and I. Tetsuji. 1999.

- Environmental characteristics of fishery grounds for the short necked clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). Bulletin of Fisheries and Environment of Inland Sea. 1, 15-37.
- Hur, Y.B., K.S. Min, T.E. Kim, S.J. Lee and S.B. Hur. 2008. Larvae growth and biochemical composition change of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, larvae during artificial seed production. Korean J. aquaculture. 21, 203-212.
- Jasim, M.dU. 2008. Quantitative reproductive ecology of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Korean waters. Ph. D. Thesis, University of Jeju, Jeju, Korea.
- Ji, J., H.J. Choi and I.Y. Ahn. 2006. Evaluation of Manila clam *Ruditapes philippinarum* as a sentinel species for metal pollution monitoring in estuarine tidal flats of Korea: Effects of size, sex, and spawning on baseline accumulation. Mar. Pollut. Bull. 52, 447-453.
- Johansson, M.W. 1999. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. Dev. Comp. Immunol. 23, 303-315.
- Kang, Y.S., Y.M. Kim., K.I. Park., C.S. Kim., K.S. Choi. and M. Cho. 2006. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. Dev. Comp. Immunol. 30, 1119-1131.
- Kang, C.K., Y.S. Kang, E.J. Choy, D.S. Kim, B.T. Shim and P.Y. Lee. 2007. Condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of the Manila clam, *Tapes philippinarum* in natural and newly created sandy habitats of the southern coast of Korea. J. Shellfish Res. 26, 401-412.
- Kang, C.K., M.S. Park, P.L. Lee, W.J. Choi and W.C. Lee. 2000. Seasonal variation in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bay of Korea. J. Shellfish Res. 19, 771-778.
- Kang, D.H., F.E. Chu, H.S. Yang, C.H. Lee, H.B. Koh and S.K. Choi. 2010. Growth, reproductive condition, and digestive tubule atrophy of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Gamakman bay off the southern coast of Korea. J. Shellfish Res. 29, 839-845.
- Kang, D.H., T.T.T. Ngo, K. JKoh and K.S. Choi. 2004. Seasonal changes in gonadal development of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* from Shi-Heung-Ri, Jeju, Korea. J. Aquaculture. 17, 81-88.
- Kang, S.G., S.K. Choi, A.A. Bulgakov, Y. Kim and S.Y. Kim. 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 282, 1-21.
- Keen, A.M. 1969. Veneridae. In: Moore RC (ed) Treatise of invertebrate paleontology. Geological society of America and university of Kansas Press Lawrence, N671-688.
- Keino. H., I. Sugiyama, T. Nishizawa and T. Suzuki. 2005. The study of relationship between burrowing behavior and energy consuming process of Japanese littlecock clam (*Ruditapes philippinarum*) at the stormy conditions in winter. Fisheries engineering. 42, 1-7.
- Kim, C.W. and S.B. Hur. 1998. Selection of optimum species of *Tetraselmis* for Mass culture. J. Aquaculture. 11, 231-240.
- Kim, H.J., I.S. Bang and K.I. Park. 2010. Effect of water temperature and salinity in the formation of prezoosporangia and zoosporangia of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni*, isolated from

- the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* on the west coast of Korea. Korean J. Malacol. 26, 211-215.
- Kim, W.S. H. Rumohr, M.K. Schmid and C.H. Koh. 1996, A rhythm in the rate of oxygen consumption by the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. J. Kor. Soc. Ocean. 31, 117-122.
- Kim, W.S., H.T. Hur, J.H. Lee, H. Rumohr and C.H. Koh. 1999. Endogenous circatidal rhythm in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). Mar. Biol. 134, 107-112.
- Kim, Y.K. and E.N. Powell. 2004. Surf clam histopathology survey along the Delmarva mortality line. J. Shellfish Res. 23, 429-441
- KOSIS. 2003. Statistic Database for Reclamation Extent. Retrieved from <http://kosis.kr/wnsearch/totalSearch.jpg>
- Labreuche, Y. C. Lambert. P. Soudant, V. Boulo, A. Huvet and J.-L. Nicolas. 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/30. Microbes Infect., 8, 2715-2724.
- Lambert, C., P. Soudant, G. Choquet and C. Paillard. 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* haemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. Fish Shellfish Immunol. 15, 225-240.
- Lee, Y.H., Y.J. Chang, H.K. Lim and G.S. Chung. 1996. Comparison of growth and survival rate in Shortnecked clams, *Ruditapes philippinarum* from different seeding production areas. J. Aquaculture. 9, 223-232.
- Limpanont, Y., H.S. Yang, K.I. Park and K.S. Choi. 2011. First report on the annual gametogenesis of *Heteromacoma irus* (Hanley, 1845) in a rocky intertidal area, northern Jeju island, Korea. J. Shellfish Res. 30, 39-46.
- Marina, D. and P.C. Alejandro. 2007. Influence of temperature on gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) with special reference to ingested food and energy balance. Aquaculture. 264, 398-407.
- Mckay, D. and C.R. Jenkin. 1969. Immunity in the invertebrate. Immunology. 17, 127-137.
- Mendoza, H.J., I. Faye. 1999. Physiological aspects of the immunoglobulin superfamily in invertebrates. Dev. Comp. Immunol. 23, 359-374.
- Molleda, M.I. 2007. Water quality in recirculating aquaculture system for Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) culture. The United Nations University, fisheries training program, Iceland.
- Ngo, T.T.T. and K.S. Choi. 2004. Seasonal changes of *Perkinsus* and *Cercaria* infections in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from Jeju, Korea. Aquaculture. 239, 1-4.
- Ngo, T.T.T., C.J. Franck, F.C. Berthe and K.S. Choi. 2003. Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Org. 56, 259-267.
- Ojea, J., A.J. Pazos, D. Martinez, S. Novoa, P. Garcia-martinez, J.L. Sanchez and M. Abad. 2008. Effects of temperature regime on broodstock conditioning of *Ruditapes decussates*. J. Shellfish Res. 27, 1093-1100.
- Ordas, M.C., B. Novoa and A. Figueras. 1999. Phagocytosis inhibition of clam and mussel haemocytes by *Perkinsus atlanticus* secretion products. Fish Shellfish Immunol. 9, 491-503.

- Ordas, M.C., A. Ordas, C. Beloso and A. Figueras. 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 597-609.
- Pardo, S., J.L. Romalde and J.L. Barja. 2010. Review of probiotic for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiol.* 145, 187-197.
- Park, K.I. 1999. Occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* and development of diagnostic methods. MS. Thesis, University of Jeju, Jeju, Korea.
- Park, K.I., A. Figueras and K.S. Choi. 2006. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. *Aquaculture.* 251, 182-191.
- Park, K.I., H.S. Yang, D.H. Kang and K.S. Choi. 2010. Density dependent growth and mortality of Manila clam *Ruditapes philippinarum* reared in cages in Gomso -bay, Korea. *Korean J. Malacol.* 91-95.
- Park, K.I., H.S. Yang, H.S. Kang, M.J. Cho, K.J. Park and K.S. Choi. 2010. Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. *J. Invertebra Pathol.* 105, 261-269.
- Park, K.I., J.K. Park, J. Lee and K.S. Choi. 2005. Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Dis. Aquat. Org.* 66, 255-263.
- Park, K.I., J.W. Choi and K.S. Choi. 2003. Quantification of reproductive output of the butter clam, *Saxidomus purpuratus* (Sowerby, 1852) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ocean Polar Res.* 25, 249-256.
- Park, K.I. and K.S. Choi. 2001. Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Aquaculture.* 203, 9-22.
- Park, K.I. and K.S. Choi. 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for study of reproduction in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): I. Quantifying eggs. *Aquaculture.* 241, 667-687.
- Ragone Calvo, L.M., G.W. Calvo and E.M. Burreson. 2003. Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture.* 220, 69-87.
- Ray, S.M. 1952. A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier in Oyster. *Science.* 116:360-361.
- Roger, F. and S. Manuel. 2010. Gonad development of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) a recalculating system: First step toward the development of conditioning and maturation protocols. *J. Shellfish Res.* 29, 303-308.
- Royer, J., C. Segueineau, K.I. Park, S. Pouvreau, K.S. Choi and K. Costil. 2008. Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture.* 277, 3136-320.
- Samuelsson, G., and G. Öquist. 1976. A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Physiol. Planta.* 40, 315-319.
- Shi, Y.K., Y. Kim, E.Y. Chung and S.B. Hur. 2001. Effect of the dissolved oxygen concentration

- on the physiology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. J. Korean Fish. Soc. 34, 190-193.
- Sorokin, Y.I. and O. Giovanardi. 1995. Trophic characteristics of the Manila clam (*Tapes philippinarum* Adams and Reeve). ICES J. MAR. SCI. 52, 853-862.
- Tirado, C. and C. Salas. 1998. Reproduction and fecundity of *Donax trunculus* L., 1758 (Bivalvia: Donacidae) in the littoral of Malaga (Southern Spain). J. Shellfish Res 17, 169-176.
- Toba, M. and Y. Miyama. 1991. Gonadal development and spawning induction in artificially conditioned Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Nippon Suisan Gakkaishi 57, 1269-1275.
- Tu, C.Y. S.W. Hung, L.T. Tsou, Y.C. Chang and W.S. Wang. 2007. Simultaneous flow cytometric assessment for cellular types and phagocytic abilities of the haemocytes of the hard clam, *Meretrix lusoria*. Fish Shellfish Immunol. 23, 16-23.
- Tun, K.S., Y.S. Shimizu, H. Yamanoi, T. Yoshinaga and K. Ogawa. 2008. Seasonality in the infection and invasion of *Marteilioides chungmuensis* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Org. 80, 157-165.
- Ueda, I. and T. Yamashita. 1997. 바지락 어장의 조성사례. 水産工學, Vol. 33, No. 3, 231-218(일본어논문).
- Usheva, L.N., M.A. Vaschenko and V.B. Durkina. 2006. Histopathology of the digestive gland of the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from southwestern Peter the Great bay, Sea of Japan. Russian J. Marine Biol. 32, 166-172.
- Winsted, J.T. 1995. Digestive tubule atrophy in eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791), exposed to salinity and starvation stress. J. Shellfish Res. 43, 201-218.
- Xu, T.-J., Y.-N. Sun., Y.-T. Yuan, Z. Liao and R.-X. Wang. 2010. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the hard-shell mussel, *Mytilus coruscus* (Mytilidae). Genetics and Molecular research. 9, 1388-1391.
- Yamamoto, M. 1997. 바지락 어장의 물리환경. 水産工學, Vol. 33, No. 3, 193-199(일본어논문).
- Yan, X, G. Zhang and F. Yang. 2006. Effects of diet, stocking density, and environmental factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philinarum* larvae. Aquaculture. 253, 350-358.
- Yang, H.S., D.H. Kang, H.S. Park and S.K. Choi. 2011. Seasonal changes in reproduction and biochemical composition of the Cockle, *Fulvia mutica* Reeve (1884), in Cheonsu bay off the west coast of Korea. J. Shellfish Res. 30, 95-101.
- Yang, H.S., K.J. Park and K.S. Choi. 2010. Pathologic survey on the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve 1850) from Haeju off the western coastal Yellow sea. Ocean Sci. J. 45, 93-100.
- Yu, H., and Q. Li. 2008. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). J. Heredity., 99, 208-214.
- Yu, Z., Y. Wang and D. Fu. 2010. Development of fifty-one novel EST-SSR loci in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* by data mining from the public EST database. Conservation Genet. Resour. 2, 13-18.
- Zhan, A.-I., Z.M. Bao, X.L. Wang and J.J. Hu. 2005. Microsatellite markers derived from bay



- scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags. Fisheries science. 71, 1341-1346.
- Zhang, G. and X. Yan. 2006. A new three-phase culture method for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, farming in northern China. Aquaculture. 258, 452-461.
- 국립수산진흥원. 1998. 바지락양식장의 지속적 생산에 관한 연구. 국립수산진흥원 연보 제29호, 65-69.
- 국립수산진흥원 남해수산연구소, 2001. 한국 남해안 양식생물 피해조사 보고서: 1997-2000. 224pp.
- 김도희, 이경선. 2008. 연안에서의 바지락 폐사 원인규명에 관한 연구. 2008년도 해양환경안전학회 추계학술발표회, 145-147.
- 박경일, 최광식, 최진우. 1999. 곰소만에 있어 바지락 포자충, *Perkinsus* sp.의 출현에 관하여. 한국수산학회지, 32: 303-309.
- 박광재, 박영제. 2005. 서해안 바지락, *Ruditapes philippinarum*의 폐사현황 및 대책. 한국패류학회 2005년도 전기학술대회 초록집
- 박성우, 이경희, 최동림. 2005. 양식 바지락, *Ruditapes philippinarum*의 *Perkinsus* sp. 검출현황과 현장조사. 한국어병학회지, 18(1): 49-58.
- 신윤경, 김윤, 정의영, 허성범. 2001. 용존산소의 변화에 따른 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)의 생리적 반응. 한국수산학회지, 34(3): 190-193.
- 유성규. 2000. 천해양식. 구덕인쇄사, 부산, 262pp.
- 이상호, 조양기, 유광우, 김영곤, 최현용. 2005. 서해안 갯벌의 온도변화. 한국해양학회지, 10, 100-112.
- 통계청. 2011. 어업조사결과.  
[http://kostat.go.kr/portal/korea/kor\\_ki/1/1/index.action?bmode=read&cd=S005009](http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_ki/1/1/index.action?bmode=read&cd=S005009)
- 최동림, 권정노, 박성우. 1998. 서해안 양식 바지락에 발생한 *Perkinsus* sp. 감염증과 신속 검출. 한국어병학회지, 11, 69-76.

# 제 8장 성과물

## 국내논문 2편

Korean J. Malacol. 25(2): 135-143, 2009

### 카드뮴에 노출된 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 의 세포성 면역 반응

박경일, 최민순, 박성우, 박관하, 최상훈, 윤종만

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

#### Cellular Immune Responses of the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Exposed to Cadmium Chloride

Kyung-Il Park, Min-Soon Choi, Sung-Woo Park, Kwan-Ha Park, Sang-Hoon Choi and Jong-Man Yoon

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea

#### ABSTRACT

The Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, has been considered as a sentinel species due to dominant distribution along the coast of Korea and well developed regulatory system. In order to develop and understand immune responses of the Manila clams, clams were exposed to 50 µg/L of cadmium chloride (Cd) for 8 days and monitored the cellular immune parameters of the hemocytes including blast cell composition, DNA damage, necrosis, apoptosis and hemocyte mortality using a flow cytometer. The results showed that all immune parameters analyzed in the present study increased remarkably compared to the controls and the increases were statistically significant. Apoptosis rate was higher than necrosis rate in the clams exposed to Cd suggesting that apoptosis was preferably induced by the concentration of Cd used in the present study. Our study indicates that the measurement of cellular immune responses of the Manila clam using flow cytometer will be a useful technique for assessment of heavy metal contamination in marine environment.

**Key words:** *ruditapes philippinarum*, cadmium chloride, flow cytometry, immune parameter, environmental monitoring.

#### 서론

이베페와 같은 고착성 해양생물은 그 산업적 중요성 외에도 최근 들어 해양환경의 건강도를 측정할 수 있는 모니터링 종으로서 그 가치를 인정받고 있다. 이들은 환경모니터링 종으로서 갖추어야 할 여러 특성들, 예를 들어 공간적 제약을 덜 받아 연안 해역에 널리 분포하며, 고착성이고, 척추동물과 유사하게 발달된 생체 조절 능력을 보유하고 있으며, 생물 농축 (bioaccumulation) 과 생리적 반응 등 환경변화에 대하여 민감하게 작용하면서도 생존률이 높다 (O'Conner, 2002; Rittschof and McClellan-Green, 2005). 이에 따라

"Mussel Watch Program"으로 대변되는 미국과 유럽의 대단위 해양환경 모니터링 사업에서 담치류와 굴류는 주요 지표 종으로 이용되고 있다 (Goldberg, 1986; Cajaraville *et al.*, 2002).

최근 들어 지표종의 선택에 대한 이해가 높아지면서 환경 모니터링에서 사용되는 굴과 담치류에서 탈피하여 지역 특성에 맞는 종을 선택하기 위한 시도가 진행되고 있다. 특히 굴이나 담치류는 부착 기질이 발달된 일부 지역에 한정되어 분포한다는 단점이 있다. 이러한 관점에서 사니질이 발달한 우리나라 조간대의 경우 바지락 (*R. philippinarum*) 은 환경모니터링에 있어 굴 (*Crassostrea* spp.) 과 담치류 (*Mytilus* spp.) 를 대체할 수 있는 종으로 제시되고 있다. 바지락은 우리나라 전 연안뿐만 아니라 중국, 일본 및 유럽의 조간대와 조하대에 높은 밀도로 서식하므로 채집이 용이하고 (Goulletquer, 1997), 외형적 특성이 타 이베페와 구별이 쉬우며, 중금속의 체내 농축정도가 담치나 굴류와 비교하여 유사한 경향을 보이기 때문에 환경오염 상태를 잘 반영 할 수 있다 (Ji *et al.*, 2006).

Received Jun 12, 2009 ; Accepted Jul 20, 2009  
Corresponding author: Kyung-Il Park  
Tel: +82 (63) 469-1882 e-mail: kipark@kunsan.ac.kr  
1225-3480/25208

# DENSITY DEPENDENT GRWOTH AND MORTALITY OF MANILA CLAM *Ruditapes philippinarum* REARED IN CAGES IN GOMSO-BAY, KOREA

Kyung-Il Park<sup>1</sup>, Hyun-Sung Yang<sup>3</sup>, Do-Hyung Kang<sup>2</sup> and Kwang-Sik Choi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Republic of Korea

<sup>2</sup>Korea Ocean Research and Development (KORDI), Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Republic of Korea

<sup>3</sup>Faculty of Marine Biomedical Sciences, College of Ocean Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea

## ABSTRACT

Density-dependant growth and mortality rate of Manila clam *Ruditapes philippinarum* reared in net cages was investigated in Gomso Bay, Korea where unusually high mortality of clams has been reported. For the experiment, four groups of clam cages were set up with a density of 2,000 clams/m<sup>2</sup> (group A), 1,000 clams/m<sup>2</sup> (group B), 500 clams/m<sup>2</sup> (group C) and 100 clams/m<sup>2</sup> (group D). Mortality and growth of clams in each experimental cage was monitored biweekly from May 2001 to September 2001. Highest mortality in group A was observed in late August, while highest mortality of rest groups was observed in early September. In September, the cumulative mortality in group A was 99%, while it was 93.2% in group B, 91.2% in group C and 88% in group D. Shell growth rate of clams in thecages was found to be density dependent; monthly shell length increase was 0.67 mm in group A, 1.33 mm in group B, 1.63 mm in group C and 1.71 mm in group D. Our study indicated that clam growth and mortality in the Bay is density dependent and the growth and survival rate is negatively correlated with the density.

**Key words:** Mortality, *Ruditapes philippinarum*, *Perkinsus olseni*, Growth rate, Density.

## INTRODUCTION

Manila clam (= littleneck clam or short-necked clam), *Ruditapes* (= *Tapes*) *philippinarum* is very common in sand beaches and tidal flats along the coasts of Korea. Clams are often commercially raised and considered to be one of the most important shellfishresources supporting the aquaculture industry in Korea(MIFAFF, 2010). Clam landings in Korea, however, have dramatically decreased since 1993: Manila clam landing from shallow-sea culture during the period of 2001-2009 was approximately 16,000 tons, which is only one fifth of the clam landings in

1990 (MIFAFF, 2010). Numerous investigations have reported mass mortality of clam in spring or fall depending on clam beds and the mortality is attributed to the decline of clam production in Korea (Choi *et al.*, 1996, Park *et al.*, 1999; DRMAFO, 2007).

Mass mortalities of *R. philippinarum* have been reported in Gomso Bay (Fig. 1) off the west coast of Korea in early fall (Park *et al.*, 2006). The fall

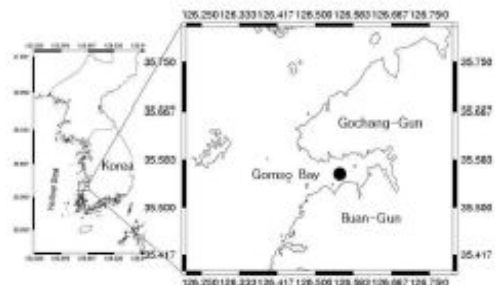


Fig. 1. Location of Gomso Bay in Korea.

Received Jan. 14, 2010; Revised Feb. 15, 2010; Accepted Feb. 22, 2010

Corresponding author: Kwang-Sik Choi  
Tel: +82-64-756-3422 e-mail: skchoi@cheju.ac.kr  
1225-3480/24340





## Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques

Kyung-Il Park <sup>a</sup>, Hyun-Sung Yang <sup>b</sup>, Hyun-Sil Kang <sup>b</sup>, Moonjae Cho <sup>c</sup>, Kwang-Jae Park <sup>d</sup>, Kwang-Sik Choi <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Aquatic Life Medicine, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Republic of Korea

<sup>b</sup> Faculty of Marine Biomedical Science (POST BK21) and Marine and Environmental Research Institute of Jeju (Cheju) National University, 66 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Republic of Korea

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, College of Medicine, Jeju (Cheju) National University, 66 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Republic of Korea

<sup>d</sup> Tidal Flat Research Institute of National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI), Kunsan, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 13 March 2010  
Accepted 28 July 2010  
Available online xxxxx

**Keywords:**  
*Perkinsus olseni*  
*Ruditapes philippinarum*  
Transmission  
Polyclonal antibody  
Fecal discharge  
Korea

### ABSTRACT

Molecular and immunological probes were used to identify various life stages of *Perkinsus olseni*, a protozoan parasite of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*, from a marine environment and decomposing clam tissue. Western blotting revealed that the antigenic determinants of the rabbit anti-*P. olseni* antibody developed in this study were peptides with molecular masses of 55.9, 24.0, and 19.2 kDa. Immunofluorescent assay indicated that the rabbit anti-*P. olseni* IgG was specific to all life stages, including the prezoosporangium, trophozoite, and zoospore. *Perkinsus olseni* prezoosporangium-like cells were successfully isolated from marine sediment collected from Hwangdo on the west coast of Korea, where *P. olseni*-associated clam mortality has recurred for the past decade. Purified cells were positively stained with the rabbit anti-*P. olseni* antibody in an immunofluorescence assay, confirming for the first time the presence of *P. olseni* in marine sediment. Actively replicating zoospores inside the prezoosporangia were observed in the decomposing clam tissue collected from Hwangdo. *P. olseni* was also isolated from the feces and pseudofeces of infected clams and confirmed by PCR. The clams released 1–2 prezoosporangia per day through feces. The data suggested that the fecal discharge and decomposition of the infected clam tissue could be the two major *P. olseni* transmission routes.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Perkinsosis is an epidemic disease that occurs in commercially important marine mollusks, including oysters, clams, and abalones. *Perkinsus marinus* and *P. olseni* are the two pathogens primarily responsible for perkinsosis (Perkins, 1996; Bondad-Reantaso et al., 2001; Office International des Epizooties, 2004; Villalba et al., 2004). Perkinsosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is caused by *P. olseni* and has been reported from tidal flats and sand beaches along the coastal Yellow Sea of Korea and China and in the Ariake Sound in Japan (Choi and Park, 1997; Hamaguchi et al., 1998; Park and Choi, 2001; Park, 2005; Liang and Liang, 2007; Park et al., 2008; Uddin et al., 2010). High levels of *P. olseni* infection often cause severe host tissue inflammation and interfere with the gametogenesis in clams (Villalba et al., 2005; Park, 2005; Park et al., 2006). According to Park and Choi (2001), *P. olseni* infection among Manila clam populations in Korean waters varies spatiotemporally, and the infection intensity and prevalence are often higher in commercial clam beds, which have a much higher clam

density than natural habitats. Mass mortalities of Manila clams in commercial clam beds in late summer or early spring have been reported in Korea, and extremely high levels of *P. olseni* in clams were partly responsible (Park et al., 2006). Recently, a new *Perkinsus* species was isolated and propagated from Manila clam in Japan and reported as *P. horshuensis* n. sp. (Dungan and Reece, 2006).


Auzoux-Bordenave et al. (1995) demonstrated the *P. olseni* life cycle as a trophozoite in infected host tissue, a prezoosporangium and a motile bi-flagellated zoospore (see also Villalba et al., 2004). As observed in *P. marinus*, the *P. olseni* prezoosporangium stage can be induced when infected host tissue containing trophozoites are placed in an anaerobic medium such as fluid thioglycollate medium fortified with antibiotics and salt (RFTM, see Ray, 1952 and Ray, 1966). Numerous zoospores are subsequently produced inside the prezoosporangia and released through a discharge tube when the prezoosporangia are placed in aerated seawater (Auzoux-Bordenave et al., 1995; Ahn and Kim, 2001; Park et al., 2005). However, the *P. olseni* prezoosporangium and zoospore stages have only been confirmed under laboratory conditions and have yet to be observed in the field.

In the early description of *P. marinus*, the first *Perkinsus* sp. described, studies have reported enlarged trophozoites in moribund

\* Corresponding author. Fax: +82 64 756 3493.  
E-mail address: skchoi@jejunu.ac.kr (K.-S. Choi).

# 국내 학술대회 발표 2편

Proceedings of the 2010 Autumn Meeting,  
the Korean Society of Oceanography




사단법인 한국해양학회  
**2010 추계학술발표대회 요약집**

2010년 11월 4일 (목)~5일 (금)  
부산대학교 장전캠퍼스

주최 : (사) 한국해양학회  
주관 : 부산대학교 해양시스템과학과  
후원 : 부산대학교 산학협력단, 부산대학교 해양연구소,  
부산대학교 BK21 연안환경시스템사업단

THE KOREAN SOCIETY OF  
**OCEANOGRAPHY**



한국해양학회  
The Korean Society of Oceanography

2010년도 추계학술발표대회  
2010년 11월 4일 (목)

[SD-03]

**Molecular phylogeny of two *Ruditapes* species *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes variegatus* (Sowerby) based on nuclear and mitochondrial DNAs**

강현실, 김봉규, 홍원기, 최광식  
(제주대학교 해양과학대학 해양생명과학과)

Manila clam *Ruditapes philippinarum* and variegated carpet shell *Ruditapes variegatus* belonging to the family Veneridae are commonly found in intertidal areas such as sandy, muddy or cobble flats in Korea, China and Japan. The veneroid clams have a wide range of morphological diversity depending on habitat, geographical location and food sources, resulting in a confusion of species identification within and between species. Several studies have analyzed to determine the molecular sequences of nuclear and mitochondrial DNA to identify the veneroid species. We investigated two nuclear (SSU rDNA, ITS) and one mitochondrial DNA (COI) of *R. philippinarum* and *R. variegatus* collected from coastal of Jeju to examine taxonomic affiliation of the two species. The complete or partial sequences of the SSU rDNA (1832-1833 bp), ITS (1250-1269 bp) and COI (709 bp) of the two species were determined and compared with sequences of other species in family Veneridae.

Our investigation indicated that the two populations of clams sampled from sandy flats in Sungsan and Seogwipo were identified as *R. philippinarum*, while the other two populations sampled in pebbles flats in Oedo and Geumneung were identified as *R. variegatus*. *R. variegatus* was significantly smaller than *R. philippinarum* in shell length, shell height and shell thickness ( $p < 0.0001$ ). In addition, the ratio of depression of a pallial sinus to shell length in *R. philippinarum* was a significantly high compared to the ratios of *R. variegatus* ( $p < 0.0001$ ). In the pairwise genetic distance and phylogenetic analysis, it demonstrated *R. philippinarum* formed a monophyletic clade with published sequences of other population of *R. philippinarum* as well as *R. variegatus*. The morphology as well as the genetic analysis carried out in this study indicates that two *Ruditapes* species are clearly different in genus *Ruditapes*.

78 2010년 추계학술대회 요약집

2010년도 한국수산과학총연합회 공동학술발표대회

## 발표요지집

일시 : 2010년 11월 12일 (금)  
장소 : 부산 BEXCO 컨벤션홀

주관 : 한국수산과학회, 한국어류학회, 한국어병학회  
한국어업기술학회, 한국패류학회  
후원 : 부산광역시, 한국과학기술단체총연합회

D-8


### 지역별 바지락 개체군의 질병 감염에 대한 특성 비교

<sup>1</sup>고대총<sup>1</sup>, 최광식<sup>2</sup>, 박경일<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>부산대학교 해양과학대학 수산생명과학과  
<sup>2</sup>제주대학교 해양과학대학 의생명과학부

- 연구의 배경 및 목적 : 패류질병은 적추동물과는 상대적으로 미발달된 면역학적 특성을 보유하고 있으며, 고부가가치의 생물이 아니기 때문에 치료제를 이용한 치치보다는 서식지 환경 개선을 통한 면역력의 증진을 통한 폐사율의 저감 방법이 대량 생산을 위해 권장되고 있다. 이러한 방법 중 특히 선별 육종을 통한 내병성 품종의 개발이 프랑스와 미국 등 일부 선진국을 중심으로 시도되고 있으며 제한적이지만 가시적 성과를 거두고 있다. 따라서 바지락과 같은 산업적 중요성이 높은 생물의 경우 이러한 우수한 유전형질의 개발을 통한 생산량 증대가 시도되어야 하나 이러한 방법을 이용한 신품종의 개발은 막대한 비용과 장기적 프로젝트의 결과로만 성공 할 수 있어 패류 연구 선진국에서도 극히 일부 종의 경우에만 시도되고 있는 실정이다. 이러한 점을 보완하여 현실적으로 보다 쉽게 접근 가능한 방법으로 는 질병 저항성을 가진 개체군을 발굴하는 것으로서 지역별 바지락 개체군을 확보한 후 이들의 질병 감수성과 저항성 등을 비교함으로써 특정 질병에 저항성이 높은 개체군을 선별할 수 있다. 따라서 본 연구는 우리나라 패류 중 물리학적/생태학적 특성이 다르게 나타나는 남해안, 서해안 및 제주 산 바지락을 대상으로 이들의 질병 감염에 대한 면역 반응과 사망율을 비교함으로써 특정 질병에 대한 저항성이 우수한 집단을 발굴하는데 목적이 있다.
- 실험방법 : 본 연구에 사용된 바지락은 남해안 (A), 서해안 (B), 제주 (C)에서 채집되었다. 모든 바지락은 최소 2개월 이상 실험실에서 적응되었으며, 이 때 사육 환경은 수온 24-26°C, 염분 30 ppt를 유지하였다. 공겨 미생물로 선대된 종은 *Vibrio tapetis*와 증남 태안 바지락에서 분리된 미생물 원생동물을 사용하였다. 면역력은 유세포분석기를 이용하여 혈림프액에서 추출된 혈구의 DNA 손상도, Apoptosis 및 necrosis를 측정하였고, 공겨 미생물 접종 후 5일 경과한 시점에서 나타난 바지락의 누락 사망률을 측정하였다.
- 결과 및 고찰 : *Vibrio tapetis*와 원생동물에 감염된 바지락의 면역력을 비교한 결과 A 바지락의 DNA 손상도가 가장 낮았고, apoptosis와 necrosis가 발생한 비율도 가장 낮게 나타났다. 공겨 미생물에 감염된 바지락의 폐사율은 C 바지락의 경우 원생동물과 *V. tapetis*에 감염되었을 경우 폐사율은 각각 50% 였으며, B 바지락의 경우 20%의 폐사율을 나타내었다. 그러나 A 바지락의 경우 이들 미생물에 감염되었을 경우에도 폐사가 전혀 일어나지 않아 상대적으로 B나 C 바지락에 비해 저항성이 높은 것으로 나타났다. 본 연구를 통하여 동일한 공겨 미생물에 노출된다 할지라도 면역반응과 사망률은 지역별 개체군에 따라 다르게 나타날 수 있음이 확인 되었으며, 이러한 차이는 유전적 차이에 의해 유발되었을 것으로 추정된다. 향후 본 연구 결과를 뒷받침 할 수 있는 다양한 추가 실험이 이어져야 할 것으로 사료되며, 본 연구 결과는 특히 바지락 도매 집단의 선별에 유용한 자료를 제공 할 수 있을 것으로 기대된다.



# 국제 학술대회 발표 4편



강경훈

## KSMB

November 18<sup>th</sup>, 2010  
Jeju Science Park, Elite building,  
Jeju, Korea

The 6<sup>th</sup> KSMB Annual Meeting &  
International Mini-symposium, 2010

“Development of Ecobiotechnology and  
Green Marine Compounds”

Organized by  
- Korean Society of Marine Biotechnology  
- Marine Bioprocess Research Center  
- Jeju National University, Aquatic Life Medicine  
- Marine & Environmental Research Institute  
of Jeju National University  
- Korea Basic Science Institute, Jeju center  
- University Industrial Technology Force  
- Brain Korea 21

Supported by  
- Suhyup Bank  
- Jeju Free International City Development Center

**P-32**  
**Sequence analysis of nuclear and mitochondrial DNAs in two *Ruditapes* species *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes variegatus* (Sowerby)**

Hyun-Sil Kang\*, Bong-Kyu Kim, Hyun-Ki Hong and Kwang-Sik Choi  
(Faculty of Marine Biomedical Science, Jeju National University)

Manila clam *Ruditapes philippinarum* and variegated carpet shell *Ruditapes variegatus* belonging to the family Veneridae are commonly found in intertidal areas such as sandy, muddy or cobble flats in Korea, China and Japan. The veneroid clams have a wide range of morphological diversity depending on habitat, geographical location and food sources, resulting in a confusion of species identification within and between species. Several studies have analyzed on determine the molecular sequences of nuclear and mitochondrial DNA to identify the veneroid species. We investigated two nuclear (SSU rDNA, ITS) and one mitochondrial DNA (COI) of *R. philippinarum* and *R. variegatus* collected from coastal of Jeju to examine taxonomic affiliation of the two species. The complete or partial sequences of the SSU rDNA (1832-1833 bp), ITS (1250-1269 bp) and COI (709 bp) of the two species were determined and compared with sequences of other species in family Veneridae. Our investigation indicated that the two populations of clams sampled from sandy flats in Sungsan and Seogwipo were identified as *R. philippinarum*, while the other two populations sampled in pebbles flats in Oedo and Geumneung were identified as *R. variegatus*. *R. variegatus* was significantly smaller than *P. philippinarum* in and length of depression of a pallial sinus and ratio of ( $p < 0.0001$ ). In the pairwise genetic distance and phylogenetic analysis, it demonstrated *R. philippinarum* formed a monophyletic clade with published sequences of other population of *R. philippinarum* as well as *R. variegatus*. The morphology as well as the genetic analysis carried out in this study indicates that two *Ruditapes* species are clearly different in genus *Ruditapes*.

69

2010 韓日·日韓 水産増養殖 SYMPOSIUM

2010 Korea-Japan, Japan-Korea Joint  
Symposium on Aquaculture

“Eco-friendly Aquaculture and Branding Aquaculture Industry”

**Program and Abstracts**

November 12-14, 2010  
Busan Exhibition & Convention Center (BEXCO), Busan, Korea

Organized by  
Aquaculture Chapter of The Korean Society of  
Fisheries and Aquatic Science  
Japanese Society for Aquaculture Research

Major Sponsor  
- Busan Metropolitan City (www.busan.go.kr)

Associate Sponsors  
- Suhyup Feed Co., LTD (www.suhyupfeed.co.kr)  
- Smile Feed Co., LTD  
- Dae Bong Live Feed P/C  
- Feeds and Foods Nutrition Research Center at PKNU (www.ffnrc.com)

**O-3**  
**Development and characterization of EST-linked microsatellite markers for Manila clam *Ruditapes philippinarum***

\*Hyun-Sil Kang, Bong-Kyu Kim, Hyun-Ki Hong and Kwang-Sik Choi  
(Faculty of Marine Biomedical Science (POST BK21) and Marine and Environment Research Institute, Jeju National University)

**Introduction**

The Manila clam or short-neck clam (*Ruditapes philippinarum*) is an important aquaculture species that inhabits on sandy or muddy tidal flats along the coastal areas in the world. Although this species have transplanted into several countries for aquaculture purpose, it is faced with several problems such as deterioration of habitat, an increase of infectious diseases, overfishing and the production declines. To resolve these issues, researchers have studied on genetic traits to conserve and manage for shellfish resources *R. philippinarum*. In this study, we developed eleven EST-linked microsatellite markers originated from Manila clam hemocyte cDNA library and characterized the genotypes of 115 clams sampled from Korea, China, Japan and Hong Kong.

**Materials and methods**

Nineteen microsatellite loci were obtained from EST database of *Perkinsus olseni* challenged Manila clam's hemocyte cDNA library analyzed by the screening of micro repeat motifs, and examined the PCR amplification for marker optimization. Eleven PCR verified markers were determined the polymorphism in 15 clams. Of the 19 markers, five markers (KR2, 6, 14, 17 and 19) showed a high allele number. Using these 5 markers, we investigated genetic distance and phylogeny to 115 clams. The genotypes were scored using Genescan and Genotyper (Applied biosystems). The number of alleles, observed heterozygosity, expected heterozygosity and Hardy-Weinberg equilibrium were calculated using POWER MARKER 2.0 software.

**Result and discussion**

Of the 19 microsatellite loci, eleven were successfully amplified in PCR as we expected and the remaining eight were rejected due to the nonspecific or no PCR output. Three loci (KR1, KR17 and KR 19) of the 11 markers were not amplified in some individuals, indicating that the null alleles are present in Manila clam. The characteristics of 11 microsatellite loci are as followed; the numbers of alleles per locus ranged from 3 to 11 with an average of 6.5. The observed heterozygosity was 0.0667 to 0.37692, while expected heterozygosity was 0.3571 to 0.8843. Significant departures from Hardy Weinberg equilibrium were found in two loci KR12 and KR17.

The genetic distance and phylogeny of 5 markers (KR2, 6, 14, 17 and 19) showed that Boryoung (Korea) and Yentai (Xiamen) was a phylogenetically closest than other populations. This finding suggested that the Boryoung population could be a transplanted strain derived from China. The EST-linked microsatellites used in this study were found to be a useful resource for population genetic of *R. philippinarum*.

# Programme & Abstracts Book



28 - 31 March 2011  
Paradise Hotel Busan, Republic of Korea

Hosted by MLTM  
Organized by KOC KORDI KORDI  
Sponsored by Diponegoro BILASAN EXPO 2012 KHOA SAPRODI WCI Greater Busan  
In collaboration with KMA CNU CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY PUSAN NATIONAL UNIVERSITY

## Nuclear and mitochondrial sequence analysis of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes variegatus* (Sowerby) in Jeju, Republic of Korea

Hyun-Sil Kang\*, Bong-Kyu Kim, Hyun-Ki Hong and Kwang-Sik Choi+  
Faculty of Marine Biomedical Science, Jeju National University  
66 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Republic of Korea  
+corresponding author: skchoi@jeju.ac.kr

*Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes variegatus* belonging to the family Veneridae commonly occur in sandy, muddy or cobble beaches in Jeju Island, Korea. In the present study, we investigated the phylogenetic relationship between *R. philippinarum* and *R. variegatus* by comparing sequences of nuclear DNA of small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) and an internal transcriber region (ITS) and the mitochondrial DNA of cytochrome oxidase I (COI) along with morphological features. *R. philippinarum* and *R. variegatus* were collected from a tidal lagoon in Sungsan, Seogwipo Harbor, a cobble beach in Oedo and a sand beach, Geumneung, in Jeju Island. For morphological comparison, shell length, shell width, shell thickness and length of the pallial sinus were recorded. For DNA analysis, total DNAs were extracted from adductor muscles and used as the template for PCR amplification. The amplified gene products were cloned into pGEM-T easy vector and the DNA sequences were determined by the modified dideoxy chain termination. Phylogeny and molecular evolutionary affinity of the two populations of clams was analyzed using MEGA 4.0 software based on Neighbor Joining (NJ) cluster. The ratio of depression of a pallial sinus to shell length of *R. philippinarum* was significantly higher than that of *R. variegatus* ( $p < 0.0001$ ), confirming the presence of *R. philippinarum* and *R. variegatus* in Jeju Island. In the NJ cluster, *R. philippinarum* and *R. variegatus* formed separate clades, suggesting that they are different species. The sequence of *R. philippinarum* analyzed in this study was also grouped with previously reported 18S, ITS and COI sequences of *R. philippinarum* elsewhere. Accordingly, the sequence of *R. variegatus* collected from Jeju was also grouped with 18S, ITS and COI sequences of *R. variegatus* reported from other studies. Conclusively, the two populations of clams sampled from sandy flats in Sungsan and Seogwipo were identified as *R. philippinarum*, whereas the other two populations of clams sampled from pebble beaches in Oedo and Geumneung were identified as *R. variegatus*. The present study indicated that there were two different species of clams distributed in Jeju Island and the two species inhabited different habitats such as sand or pebble beaches.

BETTER SCIENCE  
BETTER FISH  
BETTER LIFE

# THE 9<sup>th</sup> ASIAN FISHERIES AND AQUACULTURE FORUM

## BOOK OF ABSTRACTS

Organized by  
Shanghai Ocean University  
Asian Fisheries Society

### FROM MANILA CLAM *Ruditapes philippinarum* HEMOCYTE cDNA LIBRARY

Hyun-Sil Kang\*, Bong-Kyu Kim, Hyun-Ki Hong, and Kwang-Sik Choi  
Faculty of Marine Biomedical Sciences (Post BK 21) and Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University, 66 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Republic of Korea  
E-mail: hyunsk1010@jeju.ac.kr

Manila clam *Ruditapes philippinarum* is endemic to the Yellow Sea and considered to be one of the most important shellfish resources in the world. In this study, we developed eleven EST-linked microsatellite markers originating from a Manila clam hemocyte cDNA library and characterized the genotypes of 55 clams sampled from Korea. Nineteen microsatellite loci were obtained from an EST database of Manila clam hemocyte cDNA library by screening the micro repeat motifs of the ESTs. The results were confirmed using PCR amplification the markers were optimized. Of the 19 markers developed in this study, 11 PCR verified markers were chosen and applied to the analysis of polymorphism of 55 clams. The genotypes were scored using Genescan and Genotyper (Applied Biosystems) and the number of alleles, observed heterozygosity, expected heterozygosity, and Hardy-Weinberg equilibrium were calculated. Six loci (KR1, KR6, KR11, KR12, KR14, KR17 and KR 19) of the 11 markers were not amplified in some individuals, indicating that null alleles are present in Manila clam. The number of alleles of the 11 microsatellite markers developed in this study ranged from 7 to 24 with an average of 14.6. The observed heterozygosity was 0.1454 to 0.7636, whereas the expected heterozygosity was 0.3816 to 0.9155. The EST-linked microsatellites used in this study were found to be a useful tool to investigate population genetic of *R. philippinarum*.

### SS-41 ANATOMICAL DESCRIPTION OF *Peronia verruculatum* (GASTROPODA: PULMONATA: ONCHIDIIDAE) IN CHINESE MAINLAND

ZHANG Kun-xia\*, SHEN He-ding  
College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, NO 999,  
Hucheng Huan Road, Shanghai 201306, China  
E-mail: zhuks1203@hotmail.com

Onchididae are shell-less pulmonate gastropods, a group of euthyneuran gastropods found in the sea, fresh water and on land. Detailed description of the anatomy of members of this group might help us

understand better the evolution of euthyneuran gastropods from sea to land. Four genera are represented in China but have not been described in detail. The systematics of the group is in a state of confusion, and the internal anatomy of most species is still unknown in Chinese mainland.

In the present study, the anatomy of *Peronia verruculatum*, a marine species that lives in the middle and lower intertidal zone is described based on 50 specimens. The external morphological (mainly dorsal view and ventral view) and interior internal anatomy (mainly the digestive system, the reproductive system and the central nervous system) were efficiently delineated. The radula and the male reproductive organs (penial stalk and hooks, papillae and spines of accessory glands) are illustrated using scanning electron microscopy. In this paper, we describe the morphological characters of *P. verruculatum* in detail in order to provide reference for description of the other three genera of Onchididae in China.

### SS-42 STATUS OF ABALONE *Haliotis mariae* (Wood 1828) SEED PRODUCTION AND CULTURE RESEARCH IN THE SULTANATE OF OMAN

Armando C. Fermin\*, Khalif M. Al-Rashti  
Aquaculture Center, Ministry of Fisheries Wealth PO Box 627,  
1181 Muscat, Sultanate of Oman  
E-mail: amandy20@gmail.com

Abalone is a very valuable marine resource that provides livelihood and income for the local people living along the coasts of Mirbat, Sadah, Sharbat and Habhis in Dhofar region. For many years, Omani abalone *Haliotis mariae* (locally known as "a' sufalah") has been fished, processed by boiling and sun-drying and exported to other countries in the East and Southeast Asia. Between 1997 and 2006, fishery harvests fluctuated considerably ranging from a high of 57 metric tons (MT) to a low of 29 MT. The highest price of fresh abalone meat fetched US \$ 177 (1 Omani Rial = 2.50 US dollars) in 1997. Because of the high demand for abalone meat and corresponding high price, commercial harvesting has continuously increased since the 1980s. In effect, fishery landings decreased from 52 tons in 1988 to 42 tons in 1989 which prompted the government to shorten the fishing season from six months to two months during 1991. Increased fishing efforts due to shorter fishing season as well as undocumented harvests caused the harvest reports to dip further from 32 MT in 1998 to its lowest of 29 MT in 1999. The



# 국내 특허 출원 1건

## 관인생략 출원번호통지서

출원일자 2011.10.28  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(1)  
출원번호 10-2011-0110916 (접수번호 1-1-2011-0846308-38)  
출원인명칭 군산대학교산학협력단(2-2004-004440-9)  
발명자성명 박경일 최광식  
발명의명칭 부착생물 저장용 바지락 수하식 양성기

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
\* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
\* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.  
\* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내  
\* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
\* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.



# 바지락 인공종묘 생산 지침서 (부록)



연구수행기관

제주대학교/광주대학교/군산대학교/해양비전 21

2011. 10. 31

## 차례

1. 서론..... 1
2. 모패 순치 및 성 성숙유도..... 2
3. 산란유도..... 3
4. 유생 관찰..... 4
5. 유생사육..... 9
6. 유생성장.....10
7. 딱이생물 배양..... 12
8. 수하식 중간육성..... 16

# 1장 서론

바지락 (*Ruditapes philippinarum*)은 우리나라 전 연안에 서식하며, 굴과 더불어 산업적 가치가 높은 이매패류이다 (그림 1-a). 바지락 양식은 아시아의 경우 전통적으로 우리나라, 일본 및 중국에서 널리 양식되고 있으며, FAO 통계에 의하면 전 세계 바지락 생산량은 2006년 기준으로 연간 3,100,000톤에 육박하고 있다 (그림 1-b). 우리나라에서는 1990년 7만 톤을 생산한 이래로 그 생산량이 서서히 감소하여 최근에는 3~4만톤 정도를 유지하고 있다 (그림 1-c).

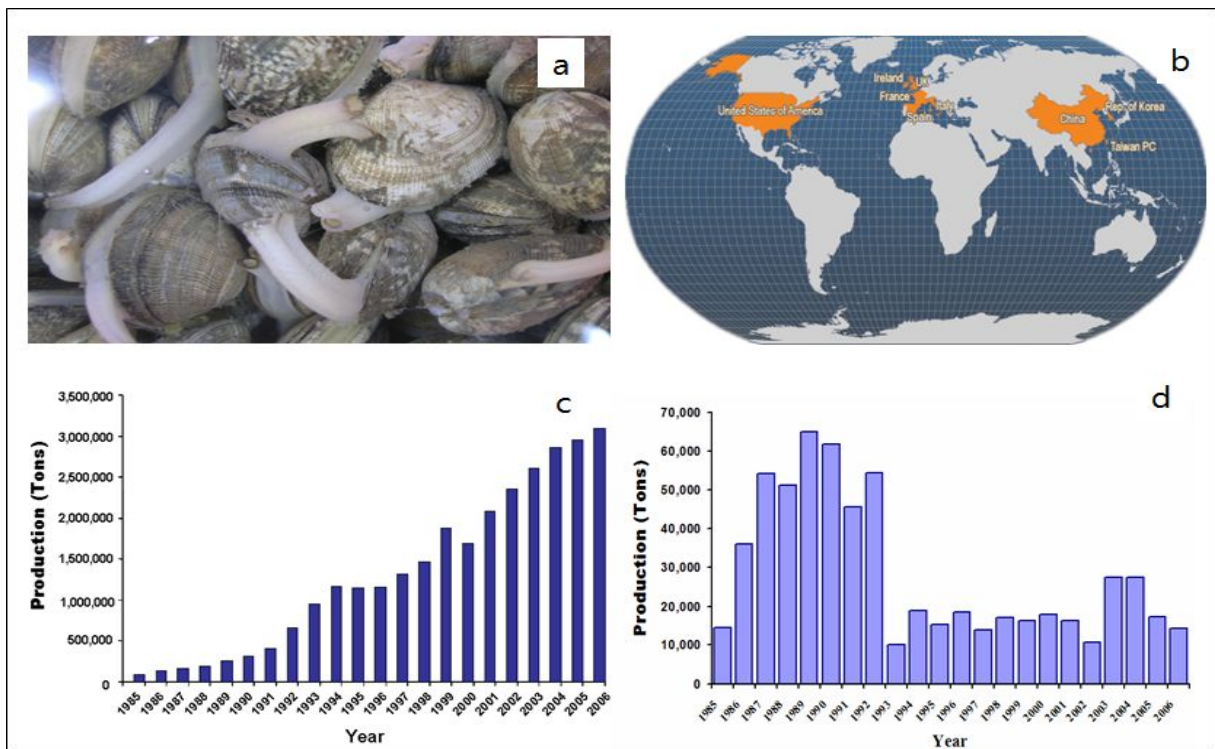


그림. 1 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)의 외부형태 (a), 세계적분포 (FAO 인용) (b), 세계 바지락생산량 (c), 우리나라 바지락 생산량 (d)

우리나라 바지락의 시장적 규모는 2,000억 정도로 추정되며, 바지락의 수요는 앞으로도 증가될 것으로 전망되고 있다. 그러나 최근 대규모 연안개발 및 환경변화, 질병 감염증가로 인해 자연채묘를 통한 바지락 종패 생산이 감소하고 있다. 생산량 감소는 수입량 증가로 연결되어 연간 3~4만 톤의 바지락이 외국으로부터 수입되고 있다. 바지락양식을 위한 치패는 대부분의 경우 양성장에서 자생적으로 공급되나 일부 지역은 종패 부족으로 외국에서 바지락치패를 수입하고 있는 실정이다. 그러나 수입산 종패의 공급은 그 물량이나 시기가 불안정하고 운송에 따른 생리적 활력 감소 등의 문제를 포함한다. 따라서 원활한 바지락양식을 위하여 바지

락 치패를 지속적으로 공급하는 일은 향후 바지락 양식산업에 있어 필수 불가결 한 사항이며, 치패의 인공적 대량 생산 기술 확보는 바지락종패의 원활 한 공급을 활성화 할 수 있을 것으로 예측된다.

## 2장 모패 순치 및 성 성숙 유도

자연산 바지락 모패를 이용하여 인공적으로 산란을 유도하기 위해서는 모패가 성적으로 성숙해야 한다. 자연적인 산란시기를 맞추기는 매우 어렵기 때문에 인공적인 시스템에서 온도 조절 및 먹이공급을 통해 바지락을 성숙시키기 위한 순치가 필요하다. 중국은 이미 바지락 치패를 대량생산해 상용화 단계에 있지만, 북방지역 (대련 이북)과 남방지역 (북건설 주변지역)의 치패 생산 방식은 큰 차이를 보이고 있다. 북방지역의 경우 육상수조에서 산란을 시키는 반면, 남방지역에서는 축제식 양식장에서 산란을 시키고 있다. 이는 기온이 낮은 북방지역의 경우 바지락 치패의 수정과 발생을 위한 수온을 유지하기 위해 실내 사육조에서 산란을 유도하고 있지만, 따뜻한 남방지역은 야외의 축제식 양식장을 이용한다. 우리나라의 경우 축제식 양식장을 이용한 방식을 사용할 경우 1년 중 제한된 기간에만 시도할 수 있으므로, 실내 사육조를 이용하는 방법을 취하는 것이 치패 대량생산에 있어 합리적인 방법이라 사료된다. 이처럼, 바지락 치패의 대량생산에 있어 온도조건은 인공공묘를 하는데 있어 중요한 부분이라고 강조하고 있다.

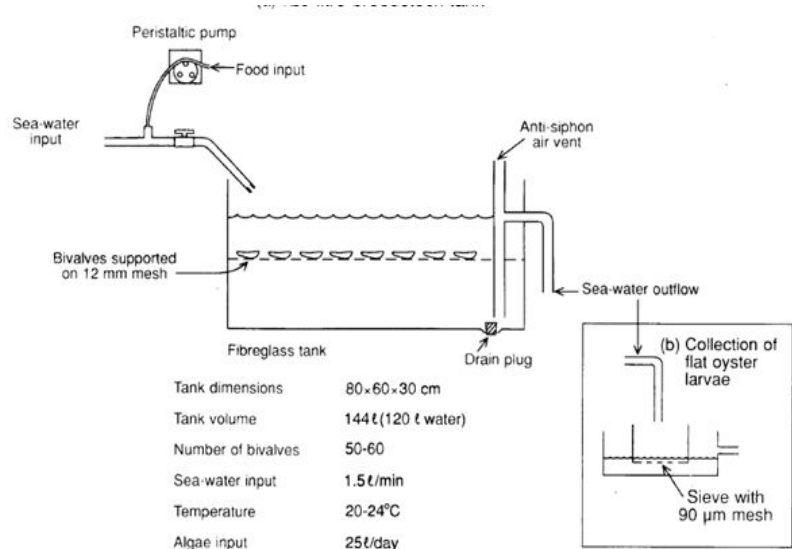


그림. 2 모패순치를 위한 시스템 모식도 (좌) 순환식. (우) 유수식 시스템

모패를 순치하는데 있어 유수식 과 순환식 두 가지로 사용할 수 있다 (그림. 2). 바지락에 있어 적정 염분은 25 psu이며, 수온은  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  이다. 유숙은 60개체 (20 g live weight)

또는 40개체 (30 g live weight) 기준으로 25 mL/min로 해수의 속도를 조절하여 공급한다. 순치시 먹이로는 *Tetraselmis suecica*, *Thalassiosira pseudonana* 그리고 *Skeletonema costatum* 이 사용되며, 먹이생물을 단독으로 공급하기 보다는 3종을 혼합하여 공급을 하는 것이 효과적이다. 먹이 공급량은 바지락 건조중량의 6%에 해당하는 먹이생물의 건조중량의 비로 계산하여 공급하는 것이 일반적이다. 이러한 계산은 먹이생물의 과잉 공급을 막으며, 과잉공급을 통한 먹이생물 생산비의 증가, 질병감염율의 증가를 막을 수 있는 장점이 있다. 순치 기간은 4~8주간 진행하며, 여름철에 주로산란을 하는 우리나라의 경우 이른 봄철에 시작하는 것이 적합할 것으로 사료된다.

### 3장 산란유도

바지락은 주로 자웅이체이며, 일부 자웅동체가 발견되기도 한다. 완숙한 바지락은 패각을 개각하여 외투막의 색의 유무로 암수를 구별 할 수 있는데, 외투막 표면의 색이 선홍빛을 띠는 개체가 수컷이고, 외투막 표면의 색이 우유빛을 띠는 개체가 암컷이다 (그림. 3).

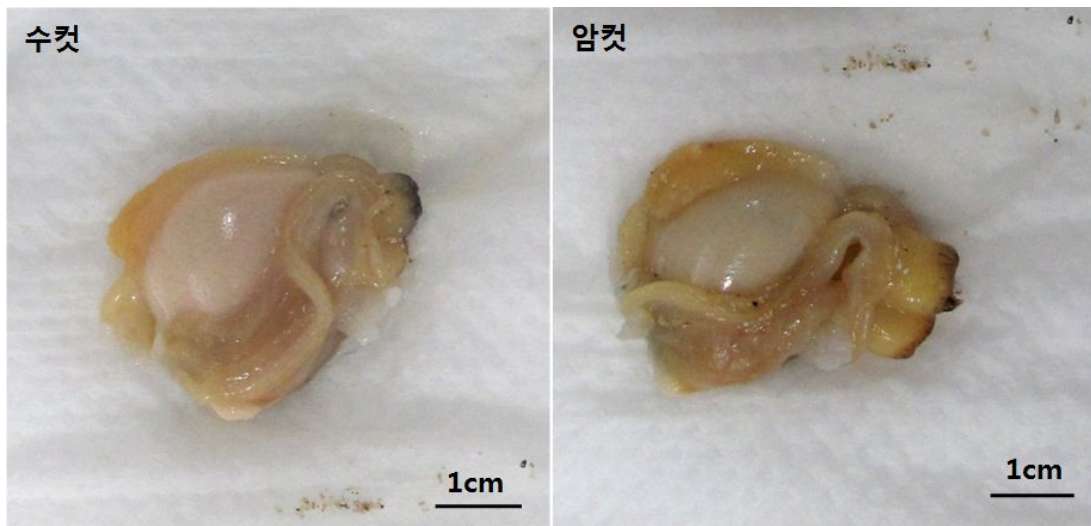


그림. 3 수컷바지락과 암컷바지락의 생식소 비교

외투막 표면을 바늘을 이용하여 흠집을 내어 살펴보면 수컷 바지락의 점도가 암컷 바지락에 비해 높다. 바지락의 순치는 (그림 3)과 같은 상태가 될 때까지 진행하며, 위의 상태가 가장 완숙한 시기의 바지락의 모습이다. 이시기가 되면 2~3일 이내에 산란이 이루어지는데, 바지락 모패의 산란이 임박하였다고 판단되면, 첫 번째 단계로 산란판에 올려놓고 4~5시간 동안 실외에 차광막을 쳐서 건조자극을 주어 산란을 유도한다. 두 번째 단계로 산란을 하지 않을 시에는 담수에 30분 정도 산란유무를 확인하고, -20℃ 냉장고에 약 30분가량 넣어 최종 자극을 주어 산란을 유도한다. 산란을 유도할 사육탱크의 수온은 23℃가 적당하며, 3 ppm의 EDTA, 비타민 0.1g을 첨가한다. 바지락 모패를 산란판에 끌고루 흐트린 후 사육탱크에 고정시킨다 (그림 4). 공기조절 밸브를 이용하여 탱크내에 산소가 충분히 공급되도록 조절한다. 바



지락은 주로 어두운 밤시간에 산란을 하며, 외부환경에 민감하게 반응하기도 한다.

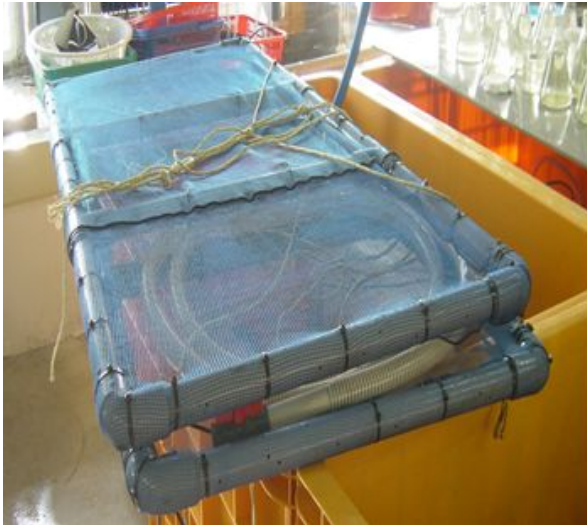


그림. 4 부화조에 산란판 설치 모습

바지락의 산란형태는 (그림 5)에 나타냈다. 문헌에 의하면, 바지락 개체군 산란의 시작은 수컷의 방정에서 시작된다고 하였다. 수컷의 방정 형태를 살펴보면, 새하얀 연기가 피어나는 듯하며, 암컷의 방난은 미세한 바지락 알이 방출되는 것이 육안으로 확인되며, 연속적으로 알을 뿜어내는 형태를 보인다. 부화조내의 수정란 밀도는 15-20 eggs/mL이 적당하며, 수정란 밀도가 2배이상 증가 시 수정란을 다른 사육탱크로 옮겨준다.



수컷의 방정



암컷의 방난

그림. 5 바지락 수컷 과 암컷이 산란하는 모습

## 4장 유생 발달

바지락 유생 발달 과정은 광학현미경과 전자현미경을 이용하였고, 광학현미경을 이용한 바지락 유생발달 단계는 (그림 6, 7)에 나타냈으며, 장방출주사전자현미경을 통한 유생발생 단계는 (그림 8, 9)에 나타냈다.

방난 된 수정난은 55~60  $\mu\text{m}$  크기였으며, 수정 후 1시간 경과되면서 극체가 형성된다. 이후 2 cell, 4 cell, 8 cell이 진행되면서 수정 약 5시간 후에는 gastrula stage가 관찰된다. 이 시기에는 prototroch가 발생하면서 자유유형을 하는 개체들이 관찰되며, 수정 약 19시간 후부터는 먹이섭이를 시작하는 D-larvae가 관찰된다. 특히, 먹이 섭이를 한 D-larvae의 소화맹낭에서는 섭이한 플랑크톤 (*Isochrysis galbana*, *Chaertoceros gracilis*)이 광학현미경상에서 관찰되며, 수정 2일 후 바지락 유생은 early D-shaped 단계가 되면서 velum이 형성된다. 4일 후 straight hinge veliger (124.7  $\mu\text{m}$ ), 10일 후 early umboned veliger (153.4  $\mu\text{m}$ ), 17일 후 late umboned veliger, 21일 후 foot이 발생하면서 pediveliger (217.8  $\mu\text{m}$ ), 36일 후부터 siphon이 발생되면서 post-larvae stage가 된다.

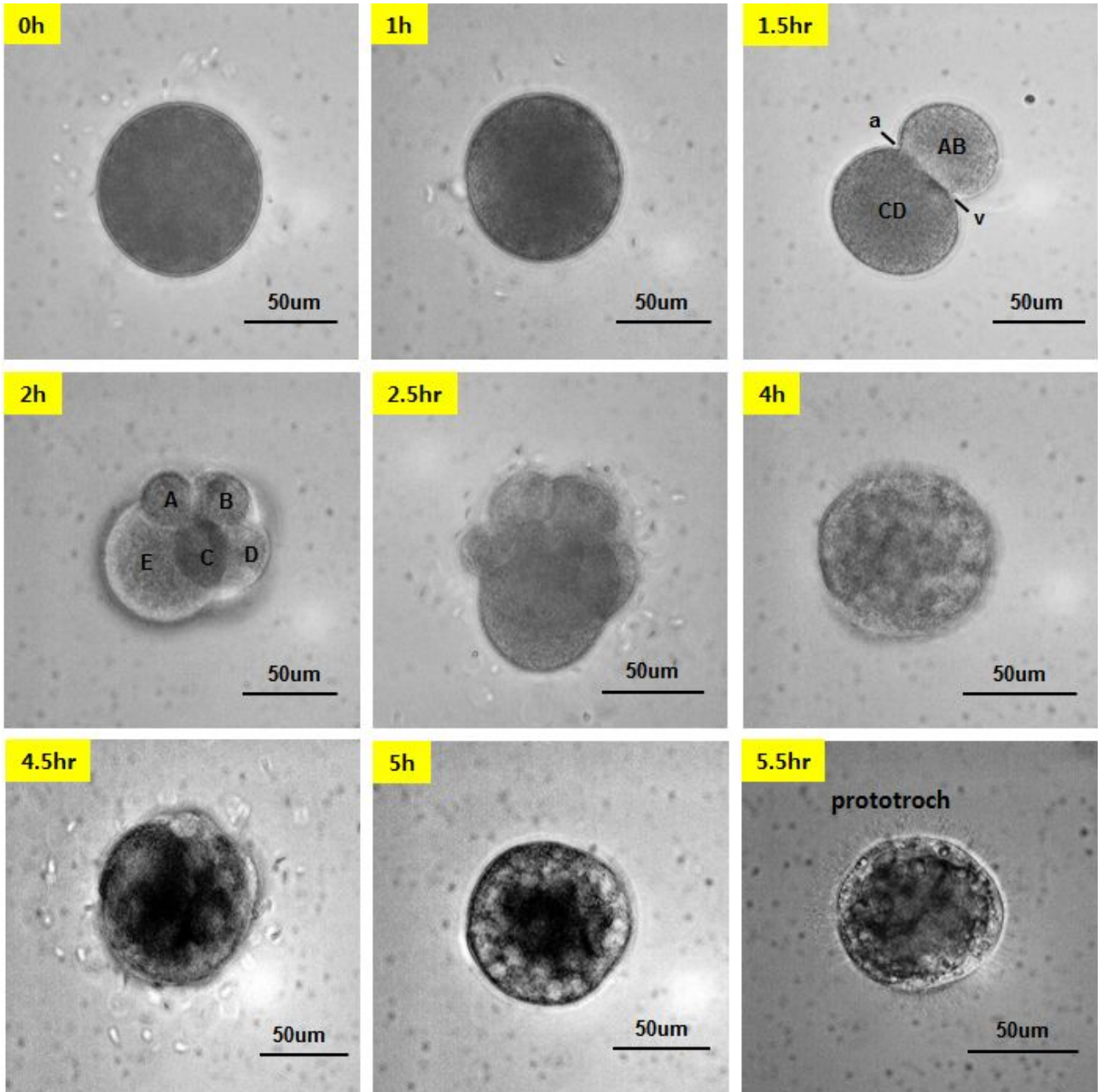


그림. 6 광학현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 I. 0h: 바지락의 수정란, 1h: 극체의 생성, 1.5hr: 2 cell, 2h: 4 cell, 2.5hr: 8cell, 4h: 포배기, 5h: 후기 낭배기, 5.5hr: 낭배기

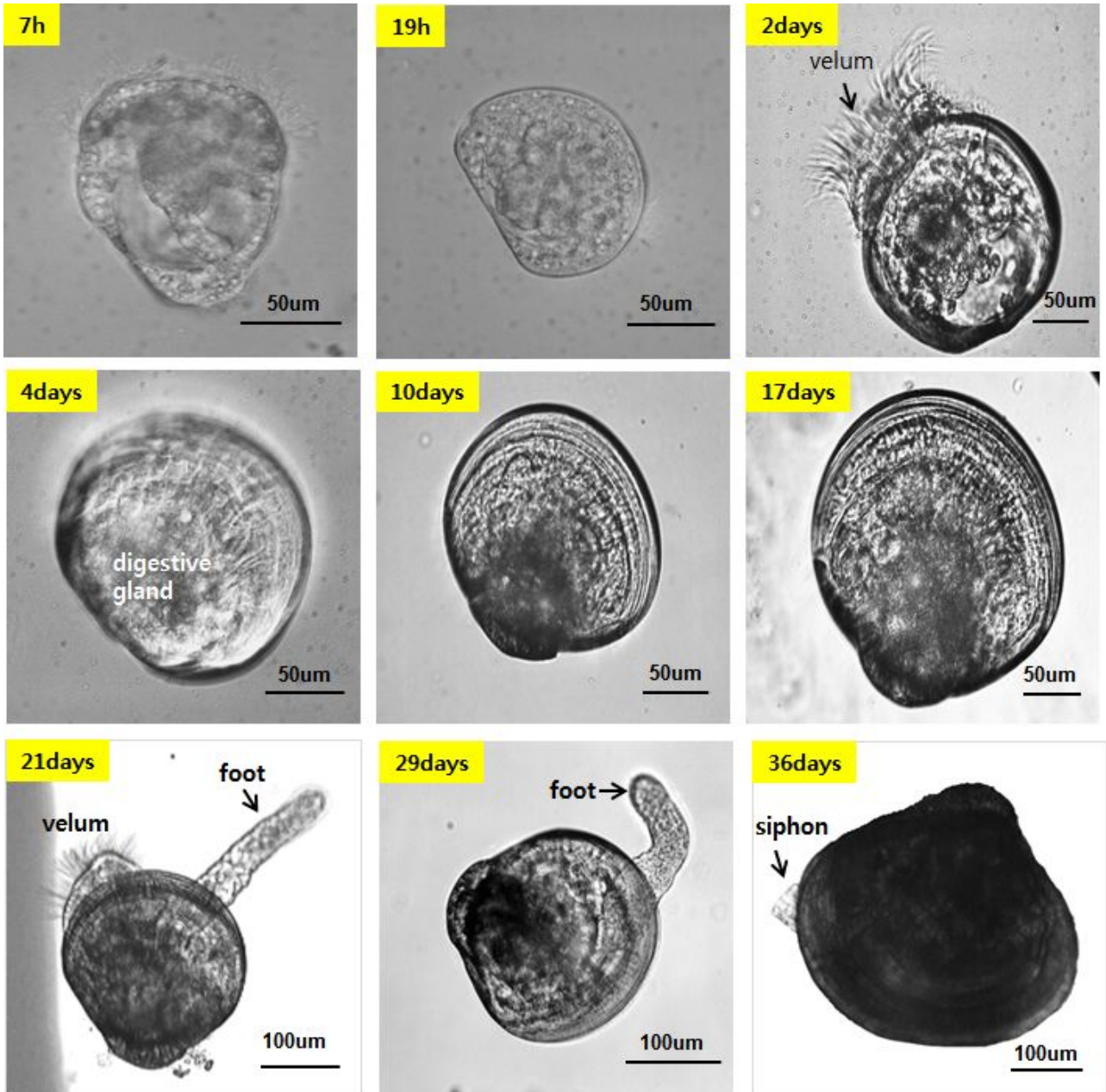


그림. 7 광학현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 II. 7h: 담륜자기, 19h: D상 유생기, 2 days: 초기 각정기, 10 days: 후기 각정기, 21 days: pediveliger 유생단계, 36 days: 초기 치패



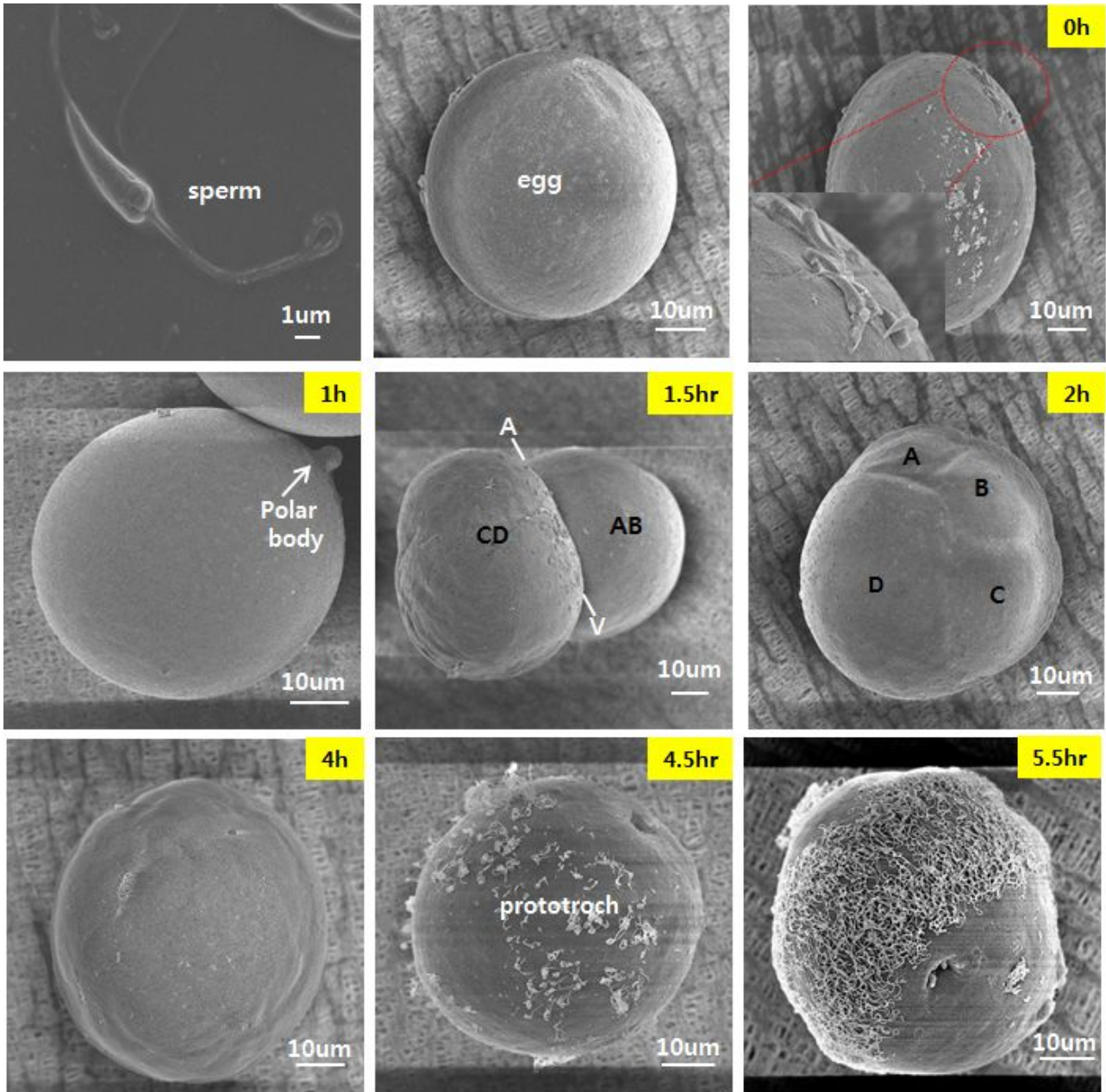


그림. 8 전자현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 I. 0h: 바지락의 수정란, 1h: 극체의 생성, 1.5hr: 2 cell, 2h: 4 cell, 4h: 포배기, 5h: 후기 낭배기, 5.5hr: 낭배기

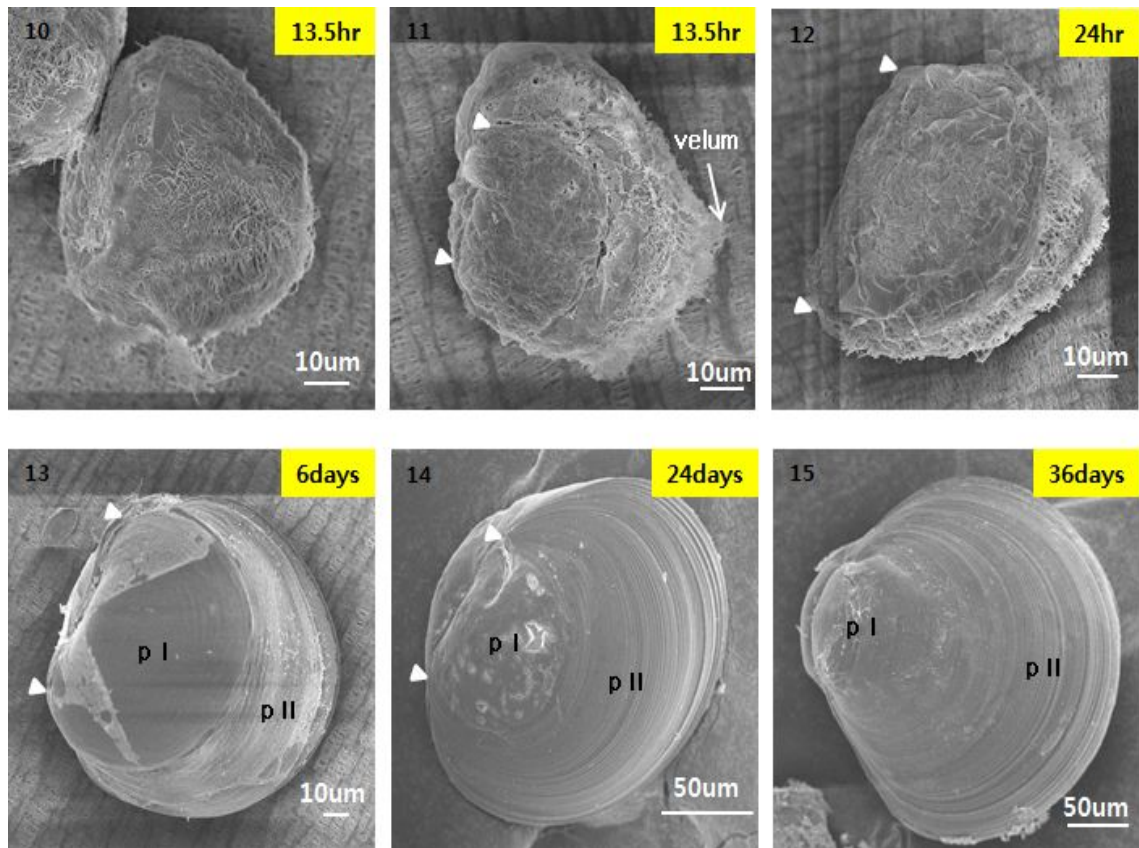


그림. 9 전자현미경을 이용한 시간경과에 따른 바지락 유생 발달 관찰 결과 Ⅱ. 13.5h: 담륜자 유생, 24 hr: D상 유생, 6 days: 초기 각정기, 24 days: 후기 각정기, 36 days: 초기 치패

## 5장 유생 사육

D-larvae 단계가 관찰이 되면 깔대기 모양의 사육탱크에서 약 20일간 pediveliger larvae가 관찰될 때까지 지수식으로 바지락 유생을 양성한다 (그림 10). 먹이 공급량은 사육 탱크 내 유생의 양과 크기에 따라 Helm and Bourne (2004)가 제시한 유생크기에 따른 *Isochrysis galbana* 공급량을 바탕으로 계산하여 *Isochrysis galbana* : *chaetoceros gracilis*를 1:1 비율로 공급한다 (표 1).

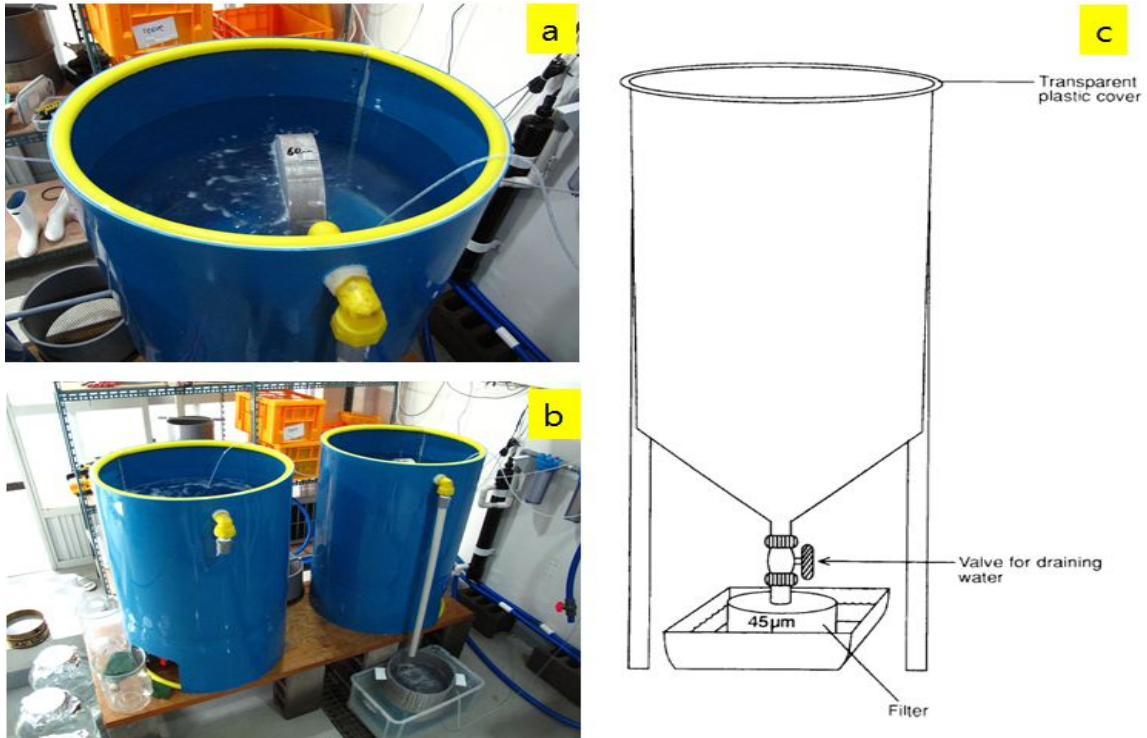


그림. 10 바지락 유생사육 수조 및 도면 (a) Banjo 필터가 설치된 유생 사육조, (b) 유생사육탱크 전경, (c) 깔대기 모양의 유생사육 수조 도면

표.1 Helm and Bourne (2004)가 제시한 바지락 유생크기에 따른 먹이생물량

Mean Shell Length (mm)	Cells ( <i>Isochrysis</i> equiv.) ingested per larva per day		
	<i>C. gigas</i>	<i>O. edulis</i>	<i>T. philippinarum</i>
100	2 800		4 400
110	6 700		6 000
120	10 600		8 000
130	14 500		10 200
140	18 400		12 800
150	22 300		15 700
160	26 200		18 900
170	30 100	19 200	22 300
180	34 000	28 200	26 000
190	37 900	37 300	29 900
200	41 900	46 300	29 100
210	45 800	55 400	21 900
220	49 700	64 500	14 900
230	53 600	73 500	
240	57 500	82 600	
250	61 400	91 600	
260	65 300	100 600	
270	69 200	109 800	
280	73 100	118 800	

해수는 하루 1회 전량 환수를 실시하며, 전날 해수에  $\text{CaCl}_2$ 를 1 g/L 첨가하여 24시간동



안 쪽기 후  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 0.5 g/L 첨가하여 중화 시킨 후 사용한다. 환수시 유생 크기에 따라 망목크기를 다르게 하여 분리하였는데, 망목의 크기는 Helm and Bourne (2004) 제시한 표에 의거하여 실시하였다 (표 2). 대량 사육 수조에서는 D형 유생단계 시 먹이생물을 1일 4회 공급 하도록 한다. 먹이생물은 *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros mulleri* 또는 이를 1:1로 하여 수조의 1/5가량을 공급한다.

표. 2 Helm and Bourne (2004)가 제시한 바지락 유생크기별 망목의 크기

Mesh aperture (μm)	Minimum size of larvae retained shell length (μm)
45	75
80	120
120	145
150	170
160	210
180	255
200	280
220	300

## 6장 유생의 성장

바지락의 성장은 발생 4일 후 유영활동을 활발히 하면서 급속히 성장을 한다. 이후 바지락 성장률은 pediveliger larvae 단계가 되면서 포복활동을 하며, 더디게 성장 한다. 이후 post-set 단계가 되면서 약 300 μm로 성장하며, 바지락의 형태를 다 갖추게 된다 (그림 11).

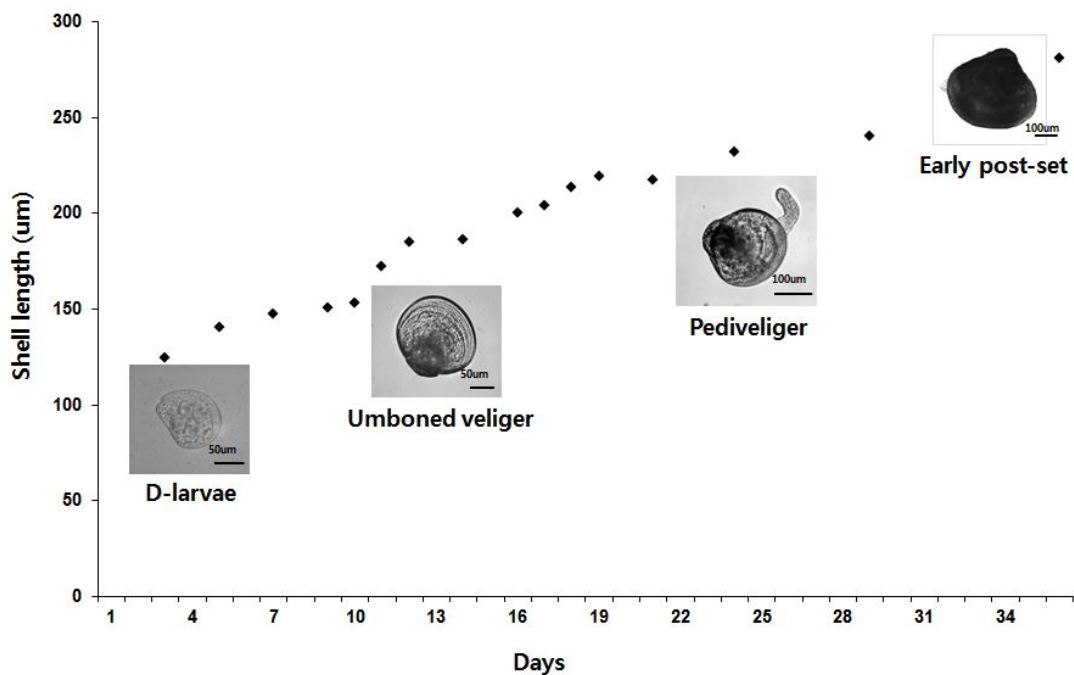


그림. 11 바지락 치패 성장률

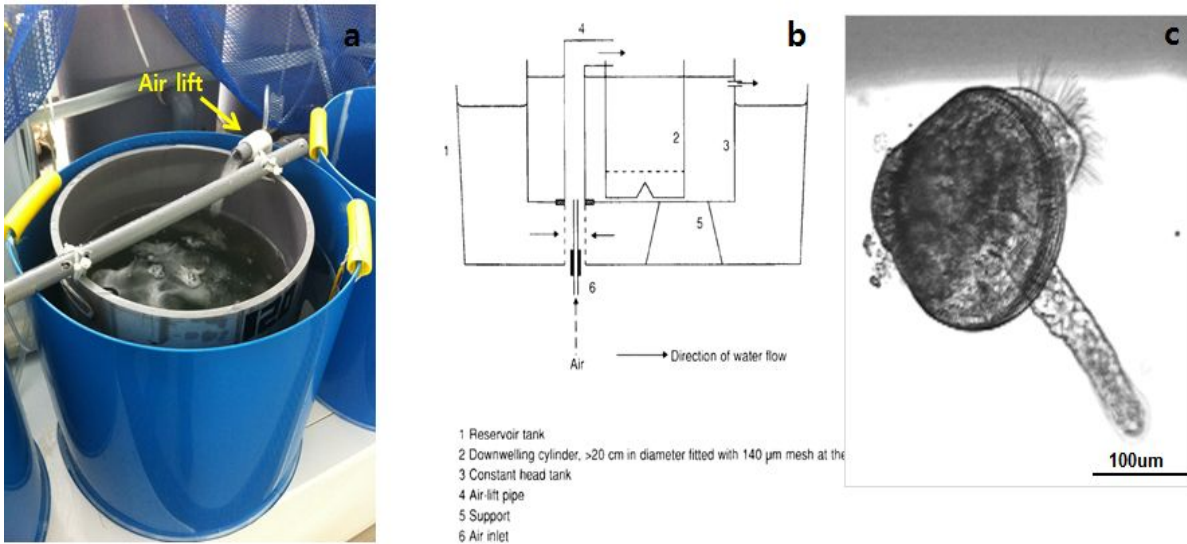


그림. 12 Pediveliger larvae 사육 탱크 (a) air-lift법을 이용한 사육탱크, (b) 사육탱크 모식도, (c) pediveliger larvae

바지락이 pediveliger larvae 단계가 되면 이전의 지수식 사육탱크에서 유수식 혹은 순환식 사육탱크로 옮겨 양성하게 된다 (그림 12). 일반적으로 pediveliger larvae 단계는 착저를 위해足の 발달 하며 부착할 수 있는 기질을 찾아 유영하는 행동을 하며, 이시기에는 굵은 모래와 같은 기질을 깔아 주어 바지락의 착생을 돕는다. D-larvae 단계에서 pediveliger larvae 단계로 넘어오면서 바지락은 평균 40% 이상의 자연 폐사율을 보이게 된다. 망목은 유생크기에 따라 바꾸어 주도록 하며 250 µm, 350 µm, 420 µm, 660 µm, 850 µm, 1000 µm 그리고 1500 µm를 이용한다. 사육탱크는 주기적인 세척을 통하여 잔여 먹이생물 및 치패 표면의 잔여물을 해수 또는 담수를 뿌려 세척을 한다. 3-4 주후 바지락 치패는 600 µm 까지 성장하며, 이시기의 유생은 원생동물 및 감염의 위험이 큰 시기로 사육수 관리에 주의를 요한다. 바지락 유생을 다른 사육 탱크로 옮기는 작업은 불가결 하다. 이러한 작업을 실시함으로 인해 죽은 개체와 분리가 용이하며, 유생크기별 분리가 가능해져 분리 사육이 가능해진다. 하지만, 유생 분리시 배출되는 사육수의 수압 및 알맞지 않은 망목크기와 같은 원인으로 인해 생존률에 오차가 생길 수 있으니 주의하도록 한다.

## 7장 먹이생물 배양

배양조건은 수온, 광량 및 포기 등을 필요로 한다. 먹이생물은 종에 따라 필요한 수온은 보통 18~24°C로 *Nitzschia* sp.는 낮은 수온, *Isochrysis galbana*, *Platymonas subcordiformis*는 수온이 높아도 먹이생물로 대량 배양된다. 광량은 자연광을 기준으로 하였으며 차광망을 이용해 맑은 날과 흐린 날의 광량을 조절하고 먹이생물조의 대기온도도 조절 할 수 있다. 보통 종묘생산 현장에서는 50~70%의 차광망 2겹을 이용해 조절한다. 현장에서 먹이생물을 배양하는 단계는 아래와 같으며 소독 및 세척과정을 자세히 기술하였다.

1단계: 원종배양 (250 mL, 500 mL) → 2단계: 소량배양 (2 L, 3 L) → 3단계: 확대배양 (중간배양 (20 L)) → 4단계: 확대배양 (60 L) → 5단계: 대량배양 (6 m<sup>3</sup>)

준비된 원종을 소량 배양하기 위해 3 L의 플라스크를 준비하고 담수로 2회 세척 후 20% 염산 100 mL를 첨가하여 플라스크의 입구부분까지 골고루 씻어 살균한다.

다음 과정으로 담수를 이용하여 플라스크를 세척 후 여과과정을 거친 깨끗한 해수를 플라스크에 넣고 끓이고 이후 식혀 사용한다. 배양액은 아래 표 3에 의해 만들어 3 mL 넣고 배지를 완성한다. 원종은 약 200 mL 접종 후 5일 후 최대 증식량을 보인다.

확대배양방법은 배양용기의 세척과 염산 소독은 동일하며 1 μm 여과백을 사용하여 여과한 해수를 채우고 염소 (CaCl<sub>2</sub>) 2g/해수 30L의 비율로 넣고 12시간 이상 용기 뚜껑을 닫고 소독하고 배양액 60 mL를 넣고 공기 주입량을 조절하여 하루 정치 후 중화제 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 용액 20 mL를 용기에 넣어주고 1차 배양플랑크톤 5 L를 접종한다.

마지막으로 대량 수조배양은 염소 (CaCl<sub>2</sub>)를 해수에 녹여 수조 바닥과 벽면을 깨끗하게 닦아 내고, 공기라인과 에어스톤을 문지르면서 깨끗하게 닦아 담수로 2~3차례 물을 뿌려 주면서 세척한다. 여름철의 경우 2시간 정도 말려준다. 여과된 해수가 들어오는 유입구에는 60 μm 망을 씌운 후 수조벽면의 수위 높이를 7/10까지 여과 해수를 채운다. 그리고 염소 (CaCl<sub>2</sub>)를 1톤당 50 g으로 하여 넣고 12시간 이상 정체 시킨 후 오전 10시를 전후로 표 4의 배양액을 제조하여 주입한다. 수조에 배양액을 넣을 때는 공기를 강하게 넣어 충분히 혼합을 시킨 후 배양액을 골고루 뿌려준다. 그리고 중화제 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>을 톤당 25 g을 넣고 30분 후 3차 배양 플랑크톤을 해수 2톤에 60 L가량을 접종하여 만든다. 환경 변화로 먹이생물의 배양이 늦어질 경우 표 3의 배양액을 용해시켜 사용한다.

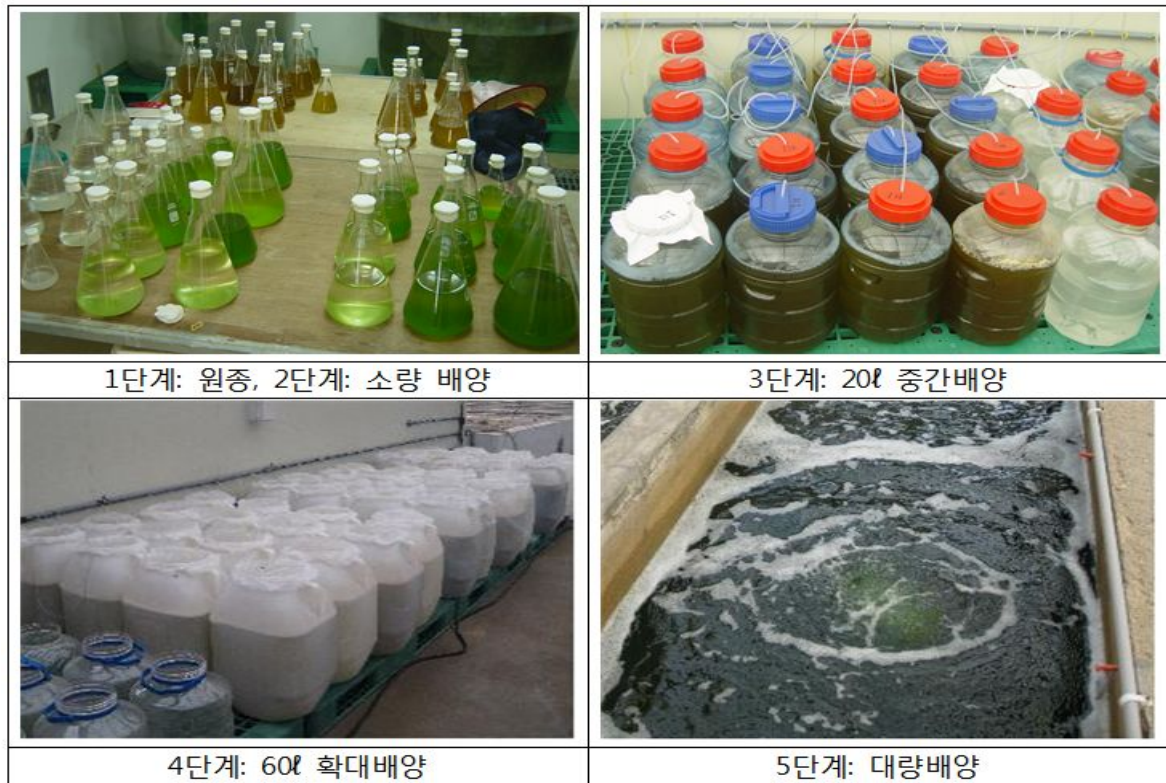


그림 13. 단계별 먹이생물 배양

표 3 먹이생물 배양액 제조 방법

종류	시약	중량	비고
배양액 1	KNO <sub>3</sub>	300 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g	
	FeSO <sub>4</sub>	8.0 g	
	MnSO <sub>4</sub>	1.0 g	
	EDTA~2Na	180 g	
	증류수&담수	3,000 mL	
배양액 2	증류수	3,000 mL	
	비타민 B1	캡슐 2개	
	비타민 B12	캡슐 2개	
배양액 3	증류수	3,000 mL	
	Na <sub>2</sub> SIO <sub>3</sub>	0.3 g	

\**Platymonas subcordiformis*. ~ 배양액 1을 넣는다.  
 \**Dicrateria inornata* ~ 배양액1과 배양액 2를 각각 넣는다.  
 \**Chaetoceros mulleri* ~ 배양액1과 배양액3을 각각 넣는다.

표 4 먹이생물 별 수조 대량 배양액 제조 방법 I

종류	시약	중량	비고
<b><i>Platymonas subcordiformis</i></b>	요소비료	20 g	
	복합비료	10 g	
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	
	MnSO <sub>4</sub>	0.1 g	
	EDTA~2Na	10 g	
<b><i>Dicrateria inornata</i></b>	요소비료	10 g	
	복합비료	8 g	
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	
	KNO <sub>3</sub>	10 g	
	EDTA~2Na	10 g	
<b><i>Chaetoceros mulleri</i></b>	요소비료	20 g	
	복합비료	10 g	
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	
	EDTA~2Na	10 g	
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	10 g	
<p>~ 상기 중량은 1톤 (1 m<sup>3</sup>)당 필요량</p> <p>~ <i>Platymonas subcordiformis</i>는 플랑크톤 활성이 좋을 때 요소와 복합으로 만으로 증식이 잘됨. 다른 종류도 마찬가지로 증식속도가 느림.</p> <p>~ <i>Platymonas</i> sp.는 피크 일 때 20만 cells/mL, <i>Dicrateria inornata</i>와 <i>Chaetoceros mulleri</i>는 각 400만 cells/mL가 됨.</p> <p>~ 배양액 만들때 <i>Chaetoceros mulleri</i>는 담수를 이용하고, 나머지는 해수를 이용.</p> <p>~ 모든 플랑크톤은 먹이로 활용 시 1차 배양만을 해야 함.</p> <p>~ 5일간 배양 시 피크가 나타나지 않을 때 먹이 배양하는 방법은 시약량을 50% 감소시킨다 (유생이나 치패 부화조 수질 악화 방지).</p>			

표 5 먹이생물 별 수조 대량 배양액 제조 방법 II

종류	시약	2차년도 중량	비고
<i>Platymonas subcordiformis</i>	요소비료	10 g	성장속도가 느리게 나타나 영양염을 감소시킴.
	복합비료	~	
	FeSO <sub>4</sub>	1.6 g	
	MnSO <sub>4</sub>	~	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g	
	EDTA~2Na	8 g	
<i>Isochrysis galbana</i>	요소비료	3.6 g	"
	복합비료	~	
	FeSO <sub>4</sub>	2 g	
	KNO <sub>3</sub>	10 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g	
	EDTA~2Na	8 g	
<i>Nitzchia sp.</i> (& <i>Chaetoceros mulleri</i> )	요소비료	10 g	"
	복합비료	~	
	FeSO <sub>4</sub>	1.6 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g	
	EDTA~2Na	8 g	
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	10 g	
<p>~ 상기 중량은 1톤 (1m<sup>3</sup>)당 필요량</p> <p>~ 요소와 복합사료 만으로도 증식이 잘된 <i>Platymonas subcordiformis</i>도 낮은 수온으로 인하여 플랑크톤 활성이 좋지 않아 배양 시약의 중량을 조절하였음.</p> <p>~ 5일간 배양 시 피크가 나타나지 않을 때, 먹이생물의 배양 방법은 시약량을 50% 감소시켰음 (유생이나 치패 부화조 수질 악화 방지).</p> <p>~ <i>Platymonas subcordiformis</i>는 피크 일 때 8만 cells/mL, <i>Isochrysis galbana</i>, <i>Nitzchia sp.</i>은 70~100만 cells/mL로 나타남.</p> <p>~ 배양액조제 시 <i>Chaetoceros mulleri</i>는 담수를 이용하고, 나머지는 해수를 이용.</p> <p>~ 모든 플랑크톤은 먹이로 활용 시 1차 배양만을 해야 함.</p>			

## 8장 수하식 중간육성 양성

수하식 양성은 조간대의 바닥식 양성 방법과 비교하여 바지락이 조석에 관계없이 수중에서 먹이를 섭취 할 수 있다는 장점을 갖고 있으며, 또한 조간대에 비해 계절과 관계없이 물리적으로 안정된 수중에서 서식한다는 장점 때문에 생리적으로도 안정된 환경을 제공 받을 수 있다. 바지락 치패가 1000  $\mu\text{m}$  정도로 성장하게 되면, 철제 골격의 cage에 내부에도 역시 cage를 만들어 바지락이 움직이지 않게 나일론 재질의 실타래를 촘촘히 채워 넣고 그 사이에 바지락을 넣어 양성 시킨다. 전반적인 수하식 양식방법에 대한 내용은 그림 14에 나타났다.

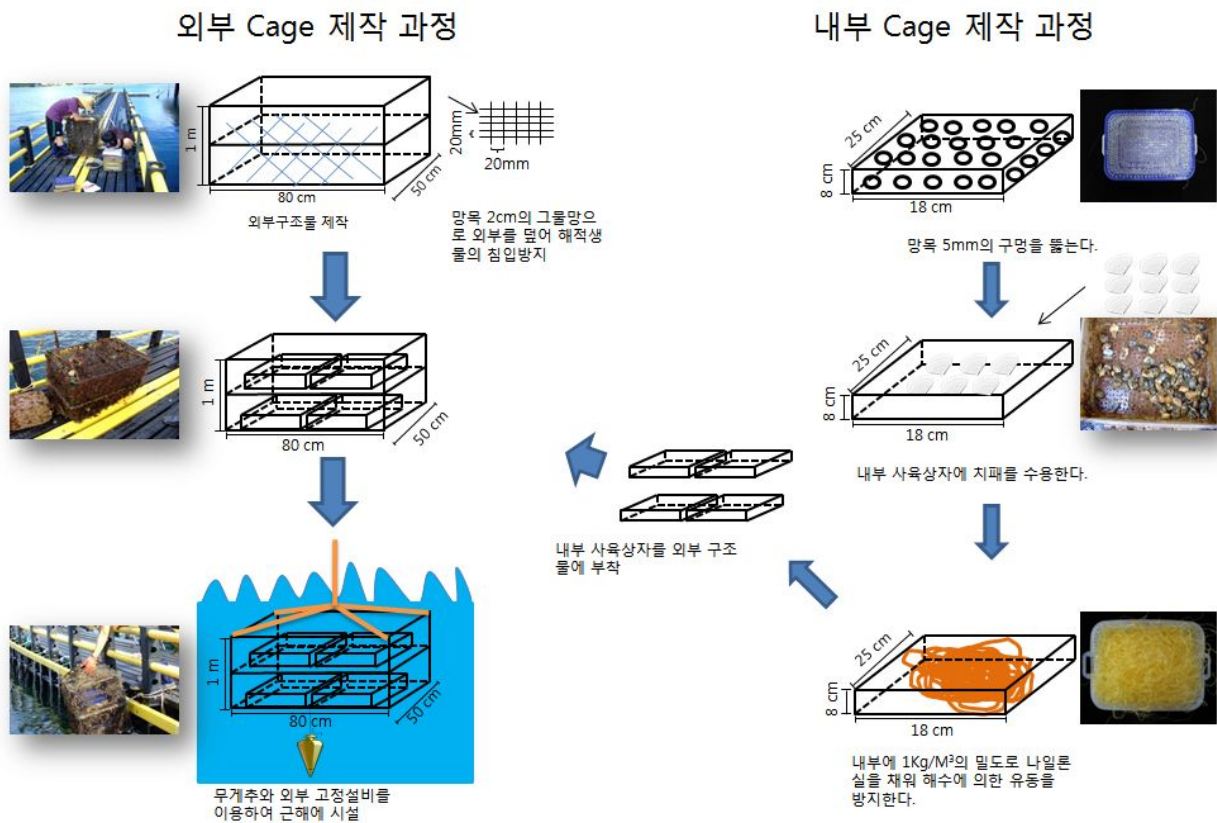


그림 14. 바지락 수하식 중간육성 단계