

보관 방법에 따른 Rotifer *Brachionus plicatilis* 내구란의 부화

윤주연 · 허성범*

부경대학교 해양바이오신소재학과/한국해양미세조류은행

The Hatching Rate of Resting Eggs of the Rotifer *Brachionus plicatilis* according to Preservation Method

Joo-Yeon Youn and Sung Bum Hur*

Korea Marine Microalgae Culture Center / Department of Marine Bio-materials
and Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

The rotifer *Brachionus plicatilis* is one of the most important food organisms in aquaculture. The resting eggs produced by mictic female rotifers are easily stored and hatched, making them useful as the starter for the mass culture of rotifers in marine larval culture. This study examined the optimum preservation method for resting eggs to ensure a high hatching rate. To produce resting eggs, the marine rotifer *B. plicatilis* was cultured with *Nannochloris oculata* (KMMCC 16). The resting eggs were harvested and cryopreserved using 5% and 10% methanol (MeOH), dimethylsulfoxide (DMSO), and glycerol as cryoprotectant agents (CPAs). The cryopreservation comprised slow or rapid freezing and the resting eggs were stored for one month in liquid nitrogen (-196°C). The resting eggs were also dried at different temperatures (30, 40, and 50°C) and for different times (1, 2, and 3 h). In general, the hatching rates of the resting eggs preserved with CPA were higher than those without CPA and the slow freezing method was better than the rapid freezing method. However, the optimum CPA concentration for the hatching rate of the resting eggs varied with the freezing method and kind of CPA, and the CPA also affected the viability of the resting eggs. Dried resting eggs had a high, rapid hatching rate over 80%. The moisture content of the resting eggs cryopreserved in liquid nitrogen affected the hatching rate. Drying at 30°C for 1 hour resulted in a high hatching rate of the resting eggs. In conclusion, drying at 30°C for 1 hour and preservation in liquid nitrogen with the slow freezing method, without CPA, is recommended for a high hatching rate (ca. 95%) of rotifer resting eggs.

Key words: *Brachionus plicatilis*, Cryopreservation, Dry, Hatching rate, Resting eggs

서 론

Rotifer *Brachionus plicatilis*는 느린 유영력으로 수중에 부유하고 무산소 환경에 잘 견디며, 고밀도 배양이 가능하다. 또 영양 및 항생 물질로 영양강화하여 자어에게 전달할 수 있는 장점이 있어 해산어의 종묘생산 시 가장 널리 이용되는 초기 동물먹이생물이다(Lubzens, 1987, Planas et al., 2004). 그러나 rotifer의 대량 배양시 높은 비용, 이온화되지 않은 암모니아, pH, COD의 증가에 따른 수질 변화(Yu and Hirayama, 1986) 및 유해 세균의 이상 증식은 rotifer의 갑작스런 폐사를 일으켜 안정적이고 경제적인 종묘생산에 문제가 되고 있다(Hayshi et al., 2007). 따라서 rotifer를 고농도로 배양한 후 농축 보관하여 종묘생산에 활용하면 효과적이다.

Rotifer의 보관 방법으로는 성체의 냉동법과 냉장법, 그리고

내구란의 동결보존법을 들 수 있으나 냉동법은 먹이효율이 낮고(Yamasaki and Hirata, 1982) 냉장법은 장기간 보관할 수 없는 문제점이 있다(Lubzens et al., 1990, Zhou et al., 2001). 또 rotifer의 종류에 따라 저온종(*B. plicatilis*)은 냉장보관이 가능하나 고온종(*B. rotundiformis*)은 4°C 미만의 저온에 보관이 불가능하여 적용하기 어렵다(Hagiwara et al., 1997).

Rotifer는 사육환경이 나빠질 경우 유성생식을 하여 내구란을 형성하는데 이 내구란은 Artemia cyst처럼 보관이 가능하고 쉽게 부화시켜 자어에 직접 공급할 수 있다(Hagiwara et al., 1997, Zhou et al., 2001). 따라서 내구란을 대량생산하여 보관하는 방법은 성체를 보관하는 방법에 비해 더욱 편리하고 효과적일 수 있다. 하지만 내구란도 장기간 실온 또는 냉장 보관할 경우 낮은 부화율이 문제가 되고 있다(Park and Hur, 1996a,b).

따라서 본 연구에서는 *B. plicatilis* 내구란의 동결보존법과 건조의 보관방법을 사용하여 내구란의 가장 높은 부화율을 유도하기 위한 최적의 보관 방법을 파악하고자 하였다.

*Corresponding author: hurs@pknu.ac.kr

재료 및 방법

*Brachionus plicatilis*의 내구란 생산

본 실험에 사용된 rotifer는 부경대학교 해양바이오신소재학과 유용플랑크톤자원 기탁등록보존기관(Culture Collection of Useful Marine Plankton, CCUMP)에서 보관중인 *B. plicatilis* (CCUMP 41) strain을 분양받아 실험에 사용하였다. 분양받은 rotifer는 5 L 유리용기에서 3 L의 규모로 28°C, 25 psu 및 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 연속조명하에서 통기배양하였다. Rotifer의 먹이로는 한국해양미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture Center, KMMCC)에서 분양받은 *Nannochloris oculata* (KMMCC 16)를 f/2 배지(Guillard and Ryther, 1962)로 대량 배양한 후 원심분리기(3,000 rpm, 25 min)로 세포만을 농축하여 이틀에 한번씩 충분한 양의 먹이가 유지되도록 공급하였다. Rotifer를 20일간 배양하여 밀도가 200 개체/mL에 도달하였을 때 먹이와 공기 공급을 중단하고 내구란이 형성될 때까지 실온에서 20일간 방치하였다. 형성된 내구란은 20 μm sieve를 사용하여 30 mL test tube에 수거한 후 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

보관 방법

Rotifer 내구란의 보관은 액체질소(LN₂)와 건조 방법으로 구분하였다. 액체질소에서의 보관 방법은 동결방지제(cryoprotectant agents, CPAs)로서 MeOH (methanol), DMSO (dimethyl sulphoxide, Me₂SO) 및 glycerol를 사용하였다. MeOH와 DMSO는 0.45 μm G/F 필터로 여과하여 멸균하였고 glycerol은 흡윤 멸균하여 준비하였다. 준비된 cryovial에 1.5 mL의 25 psu 해수와 내구란 50개체씩을 넣고 멸균한 CPAs를 각각 5%와 10% 첨가하였다.

액체질소에 보관하기 전 냉각방법으로는 빠르게 냉각시키는 방법과 천천히 냉각시키는 방법을 사용하였다. 빠르게 냉각시키는 방법은 각 샘플을 4°C에서 10분간 방치한 뒤 곧바로 액체질소에 보관하였고, 천천히 냉각시키는 방법은 1분에 1°C씩 내려갈 수 있도록 Mr. Frosty Freezing Container (5100-0001, Nalgene)를 이용하였다(Gwo et al., 2005). 이 방법은 실온에 보관중인 isopropanol 200 mL를 Freezing Container에 충전한 후 샘플을 넣고 -80°C에서 4시간 이상 보관 후 액체질소에 보관하였다. 그리고 액체질소에 보관할 때 CPAs의 첨가에 따른 내구란의 부화율을 비교하기 위해 대조구는 CPAs를 첨가하지 않았다.

건조 방법은 내구란 50개체씩을 멸균한 여과지에 수거하여 30°C incubator에서 1시간 동안 건조시킨 후 내구란을 두 그룹으로 나누어 한 그룹은 20°C에서 보관하고 다른 그룹은 액체질소에서 보관하였다. 액체질소에 보관한 방법은 Mr. Frosty Freezing을 이용하여 냉각시켰고 CPAs로는 첨가하지 않은 방법과 5%와 10%의 MeOH를 각각 첨가하여 보관하였다.

모든 샘플은 각 각의 보관방법으로 한 달간 보관 후 내구란 부화실험을 하였다. 액체질소에 보관한 샘플은 액체질소에서 꺼

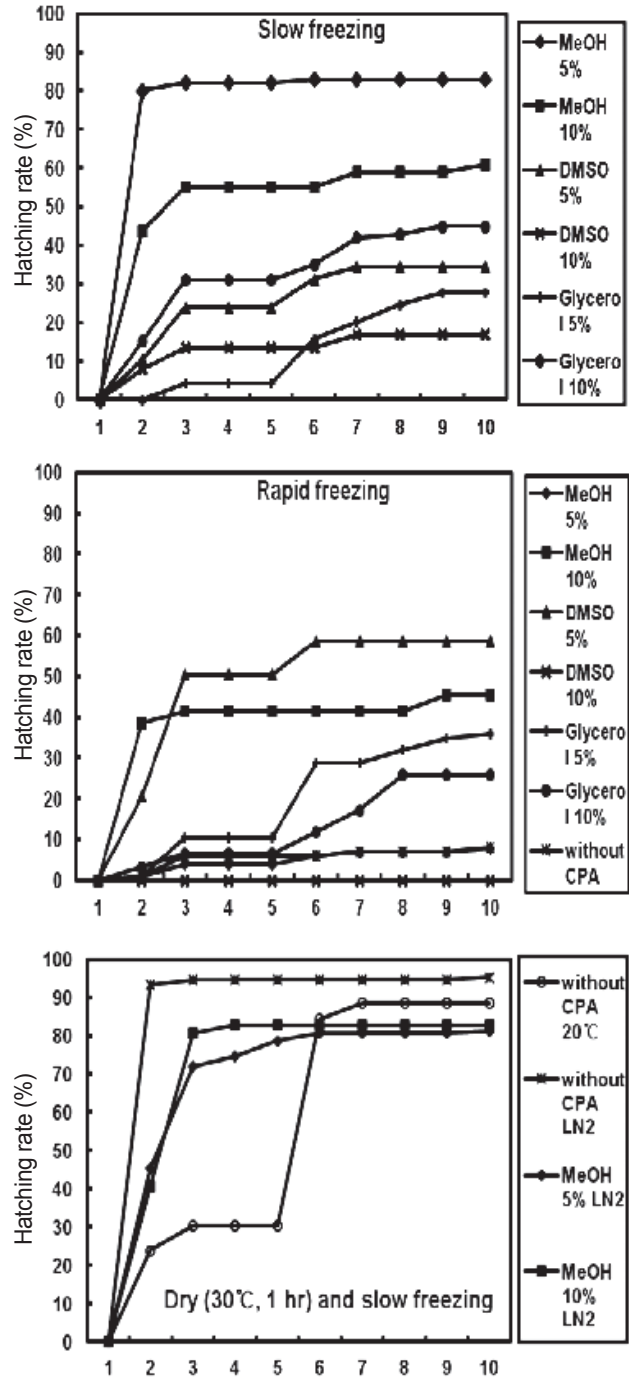


Fig 1. Daily variations of hatching rate of the resting eggs of *Brachionus plicatilis* preserved by slow freezing method with CPAs (up), rapid cooling method with CPAs (middle) and dry method (bottom) at 20°C and 25 psu for ten days. (CPA : cryoprotect agent, LN₂ : liquid nitrogen).

낸 즉시 35°C water bath에서 5분간 해동시켜 준비하였다. 이와 같이 서로 다른 방법으로 보관된 내구란 50개체를 24°C, 25 psu, 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 연속조명에서 3 mL multi-culture plate에 각각 1

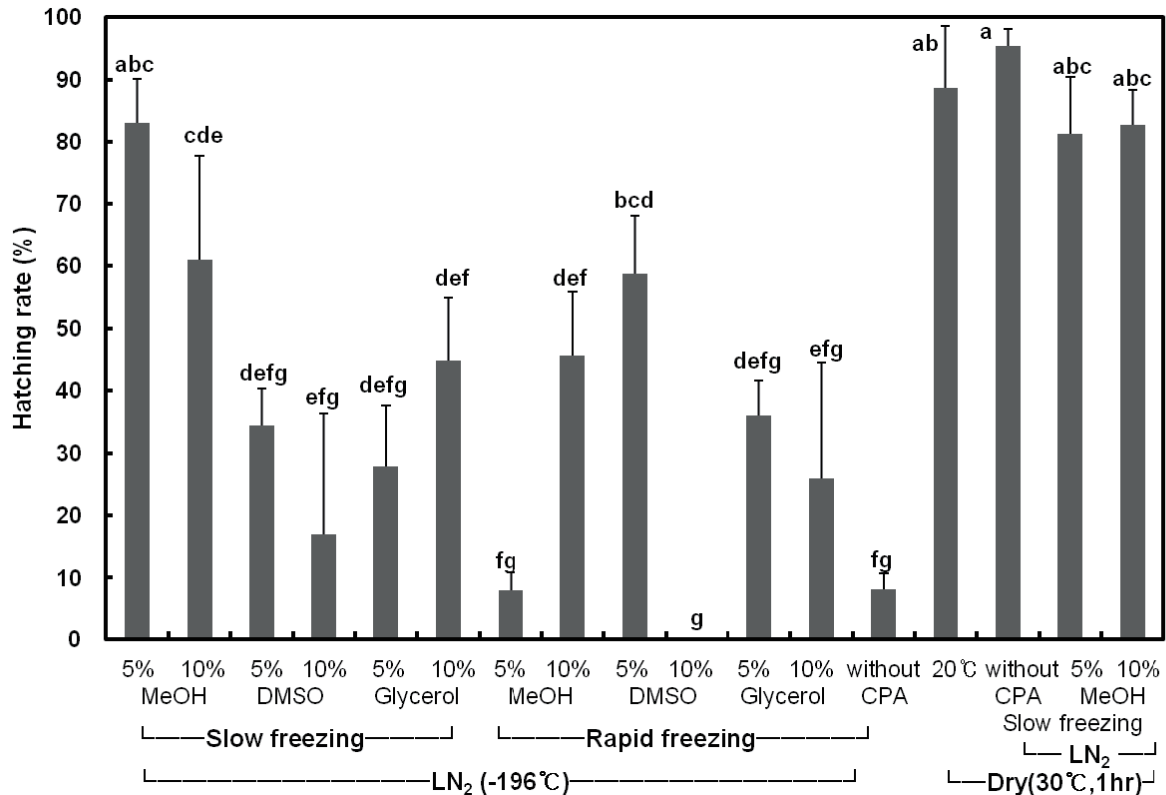


Fig 2. Final hatching rate of the resting eggs of *Brachionus plicatilis* preserved by different cryopreservation methods. The resting eggs were hatched out at 20°C and 25 psu for ten days. A different letter on the bar means a significant difference at $P < 0.05$ level. (CPA : cryoprotect agent, LN₂ : liquid nitrogen).

개체씩을 수용하여 10일간 매일 부화하는 rotifer를 현미경하에서 계수하였다. 각 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

건조 온도와 시간에 따른 내구란의 부화 실험

내구란 건조 시 온도와 시간에 따른 내구란의 부화율을 조사하였다. 여과지는 습윤 멸균 후 건조시켜 준비하고 내구란은 50개체씩 멸균한 여과지를 담은 petri dish에 수거하였다. 내구란을 담은 petri dish를 30°C, 40°C와 50°C 건조기에서 각각 1, 2, 3시간동안 건조시켰다. 건조시킨 내구란은 밀봉하여 20°C에서 24시간 동안 desicator에서 보관하였다. 부화율은 각 온도와 시간에 따라 건조된 내구란 50개체를 3 mL multi-culture plate에 1개체씩 수용한 후 25 psu의 여과해수로 24°C, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 연속조명에서 10일간 배양하며 매일 부화율을 조사하였다. 실험은 3반복으로 하였다.

한편 건조 온도와 시간에 따른 내구란의 수분함량 감소율을 측정하기 위해서 내구란 500개체를 멸균한 여과지에 수거한 다음 30°C, 40°C와 50°C의 건조기에서 각각 1, 2, 3시간동안 건조시켰고 2회 반복하여 수분함량 감소율을 측정하였다.

통계 분석

그 모든 실험 결과는 SPSS (SPSS Inc. version 17.0) 통계 패

키지를 통하여 one-way ANOVA-test를 실시 후 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성($P < 0.05$)을 검정하였다.

결 과

보관 방법에 따른 부화율

보관 방법에 따른 *B. plicatilis* 내구란의 부화율의 결과는 Fig. 1, 2와 같다. Freezing Container를 사용하여 천천히 냉각시킨 뒤 액체질소에 보관했던 방법 중 5% MeOH를 첨가한 경우 실험 2일에 80%의 부화율을 시작으로 6일에 83%의 최고 부화율을 보였다. 그러나 10% MeOH를 첨가시에는 실험 2일에 44%, 10일에 61%의 부화율을 보였으며 부화는 5% 첨가에 비하여 산발적이었다. 5% DMSO 첨가시에는 2일에 10%의 부화율을 시작으로 7일에 35%의 최고 부화율을 보였고, DMSO를 10% 첨가하였을 때는 7일만에 17%의 부화율을 보였으나 5% 첨가시 보다 절반에 가까운 낮은 부화율을 보였다. Glycerol의 경우 5% 첨가시 실험 3일에 4%의 부화율을 시작으로 9일만에 28%가 부화하였고, 10% 첨가시에는 2일에 15%, 9일만에 45%의 부화율을 보였다.

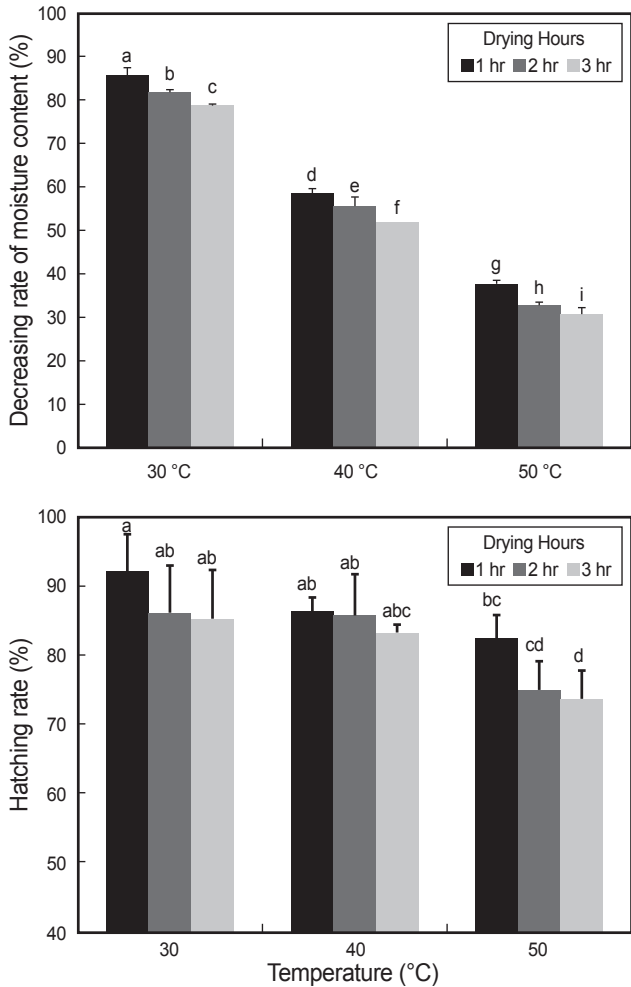


Fig 3. Decreasing rate of moisture content (up) of the resting eggs of *Brachionus plicatilis* resting eggs dried at different temperatures and hours and their hatching rate (bottom) at 24 °C and 25 psu for ten days. A different letter on the bar means a significant difference at $P < 0.05$ level.

천천히 냉각시킨 방법 중에서는 5% MeOH를 사용한 경우 83%의 부화율을 보여 DMSO나 glycerol보다 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). MeOH와 DMSO에서는 CPAs의 첨가 농도가 낮을수록 부화율은 높은 경향이었으나 glycerol은 반대의 경향을 보였다.

빠르게 냉각시켜 액체질소에 보관한 방법 중에서는 5% MeOH 첨가시 10일만에 8%의 매우 낮은 부화를 보였지만 10% 첨가시에는 실험 2일에 39% 부화율을 시작으로 9일에 46%로 유의한 높은 부화율을 보였다 ($P < 0.05$). 그러나 DMSO의 경우는 5% 첨가한 방법에서는 실험 2일에 21% 부화를 시작으로 6일에 59%의 부화율을 보여 전혀 부화되지 않은 10% 첨가에 비해 높은 부화율을 보였다.

Glycerol을 사용한 경우 5% 첨가시에는 부화가 산발적으로 일어났으며 10일에 36%의 부화를 보였고 10% 첨가시에는 실험

2일에 3%, 8일에 17%의 낮은 부화율을 보였다. 한편 대조구로서 CPAs를 첨가하지 않고 빠른 방법으로 냉각시킨 경우는 배양 10일에 8%의 가장 낮은 부화율을 보였다 ($P < 0.05$).

30°C에서 1시간 건조시킨 후 20°C에 보관한 경우 실험 2일에 24%, 5일에 30%의 부화율을 보이다 6일에 84%, 8일에 89%의 높은 부화율을 보였다. 건조시켜 CPAs 첨가없이 액체질소에 빠른 냉각방법으로 보관한 것은 실험 10일만에 95%의 가장 높은 부화율을 보였다. 30°C에서 1시간 건조시킨 뒤 5% MeOH를 첨가하여 천천히 냉각시킨 경우 실험 10일만에 81%의 부화율을 보였고, 10% MeOH를 첨가한 경우 실험 4일만에 83%의 부화율로 최종 부화율은 유의한 차이가 없으나 5% MeOH를 첨가한 경우에 비해 부화가 빠르게 일어났다.

건조 온도와 시간에 따른 내구란의 수분함량 감소율 및 부화율

건조 온도와 시간에 따른 내구란의 수분함량 감소율과 부화율은 Fig. 3과 같다. 30°C에서 1시간 동안 건조시킨 내구란은 건조시키지 않은 내구란에 비해 수분의 함량이 86%로 감소하였고 2, 3시간 건조시켰을 때에는 각각 81%와 79%로 감소하였다. 40°C에서 1, 2, 3시간 건조시켰을 때에는 각각 59%, 57%와 52%로 나타났고, 50°C에서는 각각 38%, 33%, 31%로 건조온도가 높고 시간이 길수록 수분함량은 유의하게 낮아지는 결과를 보였다 ($P < 0.05$).

건조 온도와 시간에 따른 내구란의 부화율은 건조온도가 높을수록 부화율이 감소하는 경향을 보였고 각 온도에서 건조시간이 짧을수록 부화율이 높은 경향이였다. 30°C에서 1시간 동안 건조시킨 내구란이 92%로 가장 높은 부화율을 보였고, 2시간 건조시엔 86%, 3시간 건조시엔 85%의 부화율을 보였다. 40°C에서 각 건조시간에 따른 내구란의 부화율은 1시간 동안 건조시킨 내구란이 87%로 가장 높은 부화율을 보였고 50°C에서 3시간 동안 건조시킨 내구란은 74%로 가장 낮았다 ($P < 0.05$).

고찰

동결보존은 living organism의 보관이 편리하고, 많은 종을 보관할 시 넓은 공간이 필요하지 않아 경제적이며, 장기간 보관할 수 있고(Poncet and Veron, 2003), 보관하는 동안 다른 종과의 형질 전환이 일어나지 않는다는 장점(Rhodes et al., 2006)이 있는 반면, 동결하는 과정에서 생긴 얼음 결정으로 인한 세포에 손상을 가져올 수 있다. 그러나 이러한 문제점은 동결방지제를 첨가함으로써 보완할 수 있다(Canavate and Lubian, 1995; Youn and Hur, 2009).

Rotifer 성체를 액체질소에 보존할 경우 해동 후 생존율은 2% 이하로 아주 낮다(King et al., 1983). 또 rotifer amictic female egg을 cleavage, invagination, symmetrical embryo, eyed 분열 4단계로 나누어 10% DMSO를 첨가하고 액체질소 (-196°C)에 넣어 하루 동안 보관한 실험결과, 알의 분열 단계에

따라 생존율은 0-52.4%의 큰 차이를 보였다(Toledo and Kurokura, 1990).

그러나 유성생식에 의해 형성된 내구란은 *Artemia cyst* 처럼 난막이 두꺼워 장기간 보존이 용이하며 동결보존의 연구대상이 되고 있다(Hagiwara and Hino, 1989, Kogane et al., 1997).

내구란의 보관방법에 따른 부화율 실험 결과 25°C에서만 연속적으로 보관했던 방법보다 보관 온도 5°C에서 0L:24D의 조건으로 보관 후 다시 25°C에서 보관했던 방법이 40%의 높은 부화율을 보였다. 또 내구란을 단기간 보관시에는 장기간 산발적으로 부화하는 형태를 보이고, 6개월간 장기간 보관한 경우에는 내구란이 단기간 동안 일시적으로 부화하는 형태를 보인다(Hagiwara and Hino, 1989).

Park and Hur (1996b)는 rotifer 내구란을 28°C, 40 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 연속조명에서 15일간 보관한 경우 부화속도는 느리나 15일째 58%의 높은 부화율을 보인 반면, 5°C 암흑 상태에서 보관한 경우는 2일만에 37%가 부화되나 최종적으로 40%만이 부화되었다고 보고하였다. 이와같이 내구란의 부화율은 내구란의 상태와 냉동방법, 보관방법 및 보관기간 동안의 환경요인에 따라 많은 영향을 받았으며 rotifer 내구란의 높은 부화율을 위한 보관방법은 충분히 밝혀져 있지 않다(Balompapueng et al., 1997).

본 실험에서는 세 종류의 CPA 농도를 5%와 10%로 첨가하여 실험한 결과 냉각방법과 CPA의 종류와 농도에 따라 다양한 변화를 보였으나 CPA의 첨가는 효과적이었다. 또 DMSO를 제외하고는 천천히 냉각시키는 방법이 더 높은 부화율을 보였다. 그러나 CPA의 농도에 따른 부화율은 CPA 종류와 냉각방법에 따라 변하여 일관성을 보이지 않았다. 그러나 본 연구에서 5% MeOH를 첨가하여 내구란을 천천히 냉각시켜 보관한 경우 부화율은 2일만에 80%, 6일만에 83%로 단기간에 높은 부화율을 보였다.

한편 30°C에서 1시간 동안 건조시킨 후 내구란을 보관한 방법에서는 보관방법에 별 차이 없이 최저 81%, 최고 95%로 높은 부화율을 보여 동결보존시 내구란의 수분함량이 부화율에 영향을 주고 있음을 알 수 있다. 그러나 이 건조실험에서도 건조만 시켜 20°C에서 보관한 방법은 동결방법에 비해 부화가 천천히 일어났다.

본 실험에서 건조 시간과 온도에 따른 내구란의 부화율은 다른 연구자들의 실험결과(Park and Hur, 1996b)와 마찬가지로 건조시간이 길수록, 건조 온도가 높을수록 내구란의 부화율은 낮아졌다. 하지만 부화율에서는 기존의 보고와 많은 차이를 보였다. 30°C에서 1시간 동안 건조시켜 수분함량이 86%인 내구란의 부화율은 92%로 가장 높았고, 50°C에서 3시간 동안 건조시켜 수분함량이 31%인 내구란의 부화율은 74%로 가장 낮았다. 그러나 Park and Hur (1996b)의 30°C에서 1시간동안 건조시킨 방법(46.4%)보다 훨씬 높은 부화율을 보였다.

건조에 따른 내구란 수분함량을 측정된 결과 30°C에서 1시간 및 3시간 건조시켰을 때 86%에서 79%로 감소하였고 50°C에서는 38%에서 31%까지 내구란의 수분이 감소하였다. 건조

온도와 시간에 따른 내구란의 수분함량 감소와 부화율을 비교해 볼 때 부화율은 수분함량에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 30°C에서 1시간 건조하여 내구란의 수분함량 감소율을 약 86% 정도로 유지하는 방법이 가장 높은 부화율을 유도할 뿐 아니라 빠른 시일에 동시에 부화되는 것으로 나타났다. 40°C에서 3시간 이상의 건조방법은 부화율이 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다.

결론적으로 30°C에서 1시간 동안 건조시켜 CPA의 첨가없이 천천히 냉각시키는 방법으로 액체질소에 보관하는 것이 가장 효과적인 내구란 보관방법이었다. CPA를 첨가하지 않았을 때 높은 부화율을 보였던 것은 CPA가 rotifer 내구란에 어느 정도 독성의 영향을 미치는 것으로 생각되어 추후에는 CPA의 독성에 관한 실험이 요구된다.

사 사

이 논문은 2011년 국토해양부의 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(해양생명공학기술개발사업)

참고문헌

- Balompapueng MD, Hagiwara A, Nozaki Y and Hirayama K. 1997. Preservation of resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Müller by canning. *Hydrobiologia* 358, 163-166.
- Canavate JP and Lubian LM. 1995. Relationship between cooling rate, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. *Mar Biol* 124, 325-334.
- Duncan DB. 1955. Multiple-range and multiple F test. *Biometrics* 11, 1-42.
- Guillard RRL and Ryther JH. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can J Microbiol* 8, 229-239.
- Gwo JC, Chiu JY, Chou CC and Cheng HY. 2005. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Cryobiology* 50, 338-343.
- Hagiwara A, Balompapueng MD, Munuswamy N and Kirayama. 1997. Mass production and preservation of the resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*. *Aquaculture* 155, 223-230.
- Hagiwara A and Hino A. 1989. Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 186/187, 415-421.
- Hayashi M, Yukino T, Watanabe F, Miyamoto E and Nakano Y. 2007. Effect of vitamin B12-enriched *Thraustochytrids* on

- the population growth of rotifers. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 222-225.
- King CE, Bayne Bayne H, Cannon TK and King AE. 1983. Cryopreservation of monogonont rotifers. *Hydrobiologia* 104, 85-88.
- Kogane T, Hagiwara A. and Imaizumi K. 1997. Temperature conditions enhancing resting egg production of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller (Kamiura strain). *Hydrobiologia* 358, 167-171.
- Lubzens E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* 147, 245-255.
- Lubzens E, Kolodny G, Perry B, Galai N, Sheshinski R and Wax Y. 1990. Factors affecting survival of rotifers (*Brachionus plicatilis* O.F. Müller) at 4°C. *Aquaculture* 91, 23-47.
- Park HG and Hur SB. 1996a. Production and hatching rate of resting egg of Korean rotifer, *Brachionus plicatilis* (S-type) with different diets. *J Aquaculture* 9, 329-337.
- Park HG and Hur SB. 1996b. Effect of temperature, salinity and preservation method on hatching rate of resting egg of Korean rotifer, *Brachionus plicatilis* (S-type). *J Aquaculture* 9, 339-344.
- Planas M, Vázquez JA, Marqués J, Pérez-Lomba R, González MP and Murado M. 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture* 240, 313-329.
- Poncet JM and Veron B. 2003. Cryopreservation of the unicellular marine alga, *Nannochloropsis oculata*. *Biotechnology Letters* 25, 2017-2022.
- Rhodes L, Smith J, Tervit R, Roberts R, Adamson J, Adams S and Decker M. 2006. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae. *Cryobiology* 52, 152-156.
- Toledo JD and Kurokura H. 1990. Cryopreservation of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* embryos. *Aquaculture* 91, 385-394.
- Yamasaki S and Hirata H. 1982. Rearing of the prawn, *Penaeus japonicus*, fed on frozen and living rotifers. *Min Rev Data File Fish Res* 2, 87-89.
- Youn JY and Hur SB. 2009. Cryopreserved marine microalgae grown using different freezing methods. *Algae* 24, 257-265.
- Yu J and Hirayama K. 1986. The effect of un-ionized ammonia on the population growth of the rotifer in mass culture. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52, 1509-1513.
- Zhou L, Zheng Y and Xiang JH. 2001. Study on mixis potential of rotifer resting eggs (*Brachionus plicatilis*) with different collection times and different preservation periods. *Chinese J Oceanol Limnol* 19, 222-227.

2011년 8월 9일 접수
 2011년 12월 6일 수정
 2011년 12월 8일 수리