

굴, *Crassostrea gigas* 유생 성장단계별 미세조류 12의 소화도

허영백, 전창영, 조기채, 허성범¹

국립수산과학원 남동해수산연구소, ¹부경대학교 해양바이오신소재학과

Digestion indices of 12 species of microalgae by the oyster *Crassostrea gigas* larval development stages

Young Baek Hur, Chang Young Jeon, Kee Chae Cho and and Sung Bum Hur¹

Southeast Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Tongyeong 650-943, Korea

¹Department of Marine Bio-materials and Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

ABSTRACT

Twelve species of food microalgae were investigated to clarify the digestion index of *Crassostrea gigas* larvae using epifluorescence microscopy to choose an appropriate diet for artificial seed production in hatchery. An experiment was conducted using 1 (D shaped stage), 4 (Early umbo stage), 8 (umbo stage) and 12 (Full grown stage) days old larvae. larvae were stocked in 1 L flasks at 5 individuals/mL and fed 10×10^4 algal cells/mL of each species individually. Prior to larvae were fed for 3 h and then were observed under the microscope to detect ingestion; larvae were then sieved and replaced in 1 L flasks containing filtered seawater and were observed after 3, 5 and 8 h to analyse the digestion index. Values of digestion indices were specific for each alga. No evidence for the ingestion of *Thalassiosira weissflogii* was evident at all larval development stages tested. Digestion indices of others microalgae were 0.8-99.7% at 4 stage of larval development stages: *Chlorella ellipsoidea* (0.8-5.4%), *Nannochloris oculata* (1.4-5.0%), *Isochrysis galbana* (99.1-99.5%), *Pavlova lutheri* (99.1-99.5%), *I. aff. galbana* (99.4-99.5%), *Cheatoceros calcitrans* (0.0-99.2%), *C. gracilis* (0.0-99.7%), *C. simplex* (0.0-95.9%), *Phaeodactylum tricorutum* (0.0-99.6%), *Tetraselmis tetrathele* (0.0-99.7%) and *Dunaliella tertiolecta* (0.0-99.6%), respectively. Therefore, it is assumed that food microalgae showing the high digestion such as *I. galbana* should be supplied to the early umbo stage larvae, and then after the umbo larval stage, the mixed microalgae with diatoms and light green algae should be supplied to the full grown stage larvae to increase the digestion of their larvae.

Keywords: Digestion index, Epifluorescence microscopy, oyster, *Crassostrea gigas*, microalgae, larval development.

서론

현재 국내 굴 인공종묘 배양장은 경남 통영시 인근을 중심으로 30개 이상이 건설되어 상업적 종묘를 생산하고 있고, 매년 150-200만연의 인공종묘가 생산되어 국내 수하식 양식에 필요한 종묘의 약 15%를 충당하고 있다. 이러한 인공종묘는 양성 시 성장이 빠르고, 알굴 생산효율이 좋아 매년 그 수요가

증대되고 있다. 그러나 인공종묘 생산은 모든 과정이 육상에서 이루어지기 때문에 생산단가가 천연종묘 생산에 비해 매우 높다. 이 중 어미관리, 유생사육 및 치패사육에 필요한 먹이생물인 미세조류의 대량배양에 가장 많은 경비가 소요되고 있다. 일반적으로 미세조류의 대량배양은 전체 굴 종묘생산 과정에서 매우 중요하고, 안정적으로 유지하기가 매우 어려운 한 단계로 가장 큰 고민꺼리이자 많은 관리비가 요구되어진다. 굴 인공종묘생산 과정에서 먹이로 이용되는 미세조류의 대량배양 비용은 배양방법 및 배양규모 등에 따라 전체 인공종묘생산 관리비의 15-85%에 육박하고 있다 (Urban and Langdon 1984; Myers and Boisvert 1990; Coutteau and Sorgeloos 1992). 이러한 이유로 보다 저렴하고 관리가 용이한 최적의 대체 먹이를 개발하기 위해 많은 실험적 연구가 수

Received: November 14, 2011; Accepted: December 17, 2011

Corresponding author: Young-baek Hur

Tel: +82 (55) 640-4754 e-mail: hur0100@nfrdi.go.kr
1225-3480/24414

행 되어졌다 (Coutteau and Sorgeloos 1992; Robert and Trintignac 1997; Albentosa *et al.*, 1999; Ponis *et al.*, 2003a, 2003b; Enes and Borges 2003; Espinosa and Allam 2006; Badillo-salas *et al.*, 2009). 이 결과 효모, 박테리아, microencapsulateds, 건조 미세조류, 저온냉동농축 미세조류 등 최근 10년 사이 효과적인 일부 대체먹이가 개발 되어졌다. 그러나 아직까지 완전히 살아있는 생먹이인 미세조류를 대체하지는 못하고, 여전히 대부분의 조개류 등 해양무척추동물의 인공종묘생산과정에서 대량의 미세조류가 배양되어 이용되어지고 있다. 특히 국내 굴 인공종묘생산과정에서는 전량 먹이생물로서 미세조류에 의존하고 있다. 따라서 인공종묘의 단가를 낮추기 위해서는 고가의 미세조류를 효율적으로 이용 관리하는 것은 매우 중요한데, 지금까지 국내 굴 인공종묘생산과 미세조류의 이용성을 높이기 위한 관련 연구는 미미한 실정이다.

조개류 인공종묘생산 시 미세조류의 이용 효율성을 높이기 위해서는 사육대상 생물과 미세조류의 먹이생물학적 특성을 정확히 파악하여 이용하는 것이 매우 중요하다 (Helm and Millican, 1977; Gerdes, 1983; His *et al.*, 1989; Abdel-Hamid *et al.*, 1992; Lemos *et al.*, 1994; Baldwin and Newell, 1995; Devakie and Ali, 2000). 먹이생물로서 미세조류의 특성 중 이용성을 결정하는 요소는 주로 이용 대상 생물에 대한 적당한 세포크기, 영양학적인 생화학적 조성 및 소화성이 중요하지만, 이 중 소화성은 유생의 성장과 생존에 필요한 영양분을 섭취하는데, 매우 중요한 영향을 미치기 때문에 먹이생물의 이용성을 결정하는 가장 중요한 요소이다 (Owen, 1974; Ewart and Epifanio, 1981; Albentosa *et al.*, 1993). 이와 같은 결과는 소화가 되지 않으면 좋은 영양성을 갖추어도 활용이 되지 않기 때문이다.

조개류 유생의 폐각특성과 식물성 플랑크톤의 광합성 색소의 자체 형광 특성을 이용해서 먹이생물로서 공급된 미세조류의 섭취도와 소화성을 평가하는 방법으로 형광현미경을 이용한 측정법이 많이 이용되어 진다 (Babinchak and Ukeles, 1979; Lucas and Rangel, 1983; Aldana-Aranda *et al.*, 1991, 1994, 1997). 이는 조개류의 폐각형성과정에서 부유유생기는 주요 폐각구성 물질이 탄산칼슘의 일종인 aragonite로 형성되어 있다. 이 시기는 폐각이 투명하여 조직과 내부소화기관의 관찰이 용이하다. 그리고 먹이생물로 이용되는 미세조류의 광합성 색소는 자체 형광성이 있어 자외선 또는 청색광선을 조사하면 붉은 색의 형광반응을 띤다.

따라서 본 연구는 형광현미경을 이용해 현재 국내 굴 인공종묘생산과정에서 많이 이용되고 있는 12종류의 미세조류에 대하여 굴 인공종묘생산 시 효율적인 먹이생물 관리를 위한 기초자료를 제공하고자 굴 유생의 발달단계에 따라 대상 먹이생

물의 소화도를 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

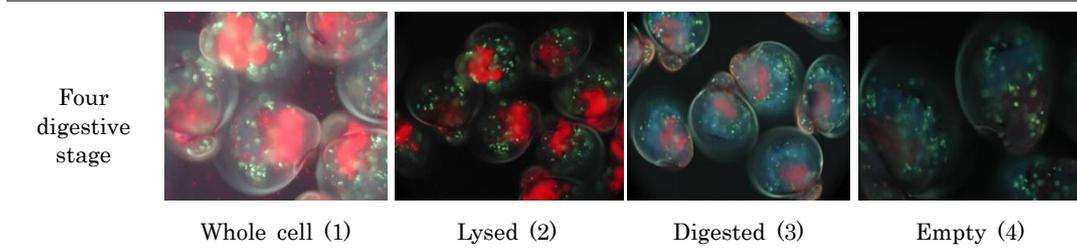
1. 유생사육 및 먹이생물 배양

실험에 필요한 유생을 얻기 위해 사용한 어미는 만 1년생 굴 ($n = 100$) 로 크기는 평균 각장 60.0 ± 5.8 mm, 각고 107.4 ± 11.3 mm, 전중 95.7 ± 27.2 g으로 자연 성숙된 개체를 이용하였다. 채란은 인위적인 자극법인 수온상승 자극법으로 하였다. 채란 전 어미는 폐각에 붙어 있는 부착생물과 이물질을 제거한 다음 여과해수로 세척 후 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 가온 여과해수가 채워진 4 톤 FRP 수조에 곧 바로 수용하여 채란하였다. 방란방정이 완료되면 먼저 망목 $40 \mu\text{m}$ 인 거름망으로 난외의 이물질을 제거한 후 망목 크기가 $20 \mu\text{m}$ 인 거름망을 이용하여 난을 수거하였다. 수거된 난은 다른 점액질 및 불순물을 제거하기 위하여 다시 채란에 이용한 동일한 수온의 가온 여과해수로 수회 세척 후 수온 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 여과해수가 채워진 수용적 10 톤 사각콘크리트 수조에 수용하여 D상까지 발생시킨 후 다시 망목크기가 $40 \mu\text{m}$ 인 거름망으로 수거하여 유생 사육밀도를 10 마리/mL로 재조절하여 동일한 수조에서 유생 크기별로 선별하여 이용하기까지 사육하였다.

유생사육은 지수식으로 고압모래여과기로 1차 여과 후 $1 \mu\text{m}$ 의 구조토여과기로 2차 여과를 거쳐 자외선 살균기를 통과시킨 다음 다시 $1 \mu\text{m}$ bag filter로 3차 여과 처리한 해수로 매 2일마다 사육수를 교환하여 주었다. 수온 조절은 1차 보일러 (500,000 kcal) 와 티타늄 판형 열교환기로 직접가온 후 열풍기 (160,000 kcal) 로 실내를 온도를 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하여 사육수의 온도를 유지하였다.

실험에 이용할 유생을 확보하기 위하여 대량사육에 공급된 먹이생물은 한국미세조류은행에서 분양받은 *Isochrysis galbana* (KMCC H-2), *Cheatocecos gracilis* (KMCC B-52), *Pavlova lutheri* (KMCC H-006), *Phaeodactylum tricornutum* (KMCC B-14), *Nannochloris oculata* (KMCC C-31), *Tetraselmis tetrathele* (KMCC P-002) 를 각각 30% : 20% : 20% : 10% : 10% : 10%의 비율로 혼합하여 일일 3회 (오전 8시, 오후 4시 및 10시) 공급하였다. 먹이생물 공급량은 초기 D형에서 최초 0.3×10^4 cells/mL/day으로 매 환수 시 마다 30%씩 증가시켜 부착기 유생까지 사육하였다. 대량유생사육에 공급된 먹이생물 배양은 500 L 원형 아크릴 수조를 이용하여 정치배양으로 하였다. 배양에 이용된 배지는 Conwy 배지 (Walne, 1974)를 이용하였고, 배양온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 조도는 400 Watt metal halide lamp로 배양수 표면 기준 $20 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{s}$ 로 연속조명 하였다. 공급은 대수증식기에 수확하여 공급하였다.

Table 1. Qualitative scales of four digestive stages to evaluate the digestion of microalgae by *Crassostrea gigas* larvae



2. 미세조류별 유생크기에 따른 소화성 측정

소화도 조사에 사용된 미세조류는 한국미세조류은행에서 분양 받은 착편모조류 *Isochrysis galbana* (KMCC H-2), *I. aff. galbana* (CCMP 463), *Pavlova lutheri* (KMCC H-006), 규조류 *Cheatoceros calcitrans* (CCMP 1315), *C. gracilis* (KMCC B-52) *C. simplex* (KMCC B-117), *Thalassiosira weissflogii* (CCMP 1040), *Phaeodactylum tricornutum* 녹조류 *Tetraselmis tetrathele* (JP), *Dunaliella tertiolecta* (CCMP 1320), *Chlorella elipsoidea* (KMCC C-20), *Nannochloris oculata* (KMCC C-31) 12 종이였다. 실험에 이용된 미세조류 배양은 Conwy 배지 (Walne, 1974)를 이용해 22 ± 1°C, 80 μmol/m²/s로 연속 조명하에서 500 mL 원형플라스크에서 정치배양된 것을 대수 증식기에 수확하여 사용하였다.

굴 *C. gigas* 유생의 성장단계별 미세조류 12종에 대한 소화도 조사는 먼저 사전 대량 사육되고 있던 유생을 사육일수에 따라 1일 (각장 73.5 ± 2.8 μm) 4일 (각장 105.3 ± 5.6 μm), 8일 (각장 223.4 ± 13.8 μm), 12일 (각장 306.2 ± 14.7 μm) 에 망목 크기가 40, 80, 150 및 200 μm인 선별 망을 이용하여 D shape, Early umbo, Umbo 및 Full grown stage 4단계로 나누어 크기별로 실시하였다. 선별된 유생은 0.45 μm Membrane filter (Whatman, USA) 로 여과된 해수로 수차례 세척 후 다시 동일하게 처리된 여과해수가 채워진 50 L 원형수조에 재 수용하여 24시간 방치 후 먼저 장 내에 잔류하고 있는 내용물을 완전히 소화시켰다. 그러나 D shape 단계는 수정 후 24시간 경과된 유생을 바로 이용하였다. 실험은 장 내 내용물의 잔존여부를 형광현미경으로 확인한 다시 거름망으로 전체 유생을 수거하여 여과해수로 수차례 세척하였다. 세척 후 유생은 0.45 μm Membrane filter 로 여과된 25.0 ± 1.0°C 해수가 채워진 1 L 원형 플라스크에 5마리/mL 밀도로 3반복으로 분주 수용한 후 조사대상 미세조류 12종을 단독으로 10 x 10⁴cells/mL 농도로 공급한 다음 충분히 섭취하도록 3시간 동안 방치 한 것을 실험개시 시로 설정하였다. 방치 후 먹이생물 섭취 상태를 형광현미경으로 측정할 후 다시 거름망으로 전체 유생을 수거한 다음 0.20 μm

PTFE capsule filter (Whatman USA) 로 여과된 해수로 수차례 세척 후 다시 동일 여과해수가 채워진 1 L 원형 플라스크에 재 수용하여 3시간, 5시간 및 8시간 후 각각 10 mL씩 3회 표본 추출하여 살아 있는 상태로 조사하였다. 조사 시간 동안은 다른 먹이원의 오염을 방지하기 위하여 공기공급은 하지 않았고, 온도는 25.0 ± 1°C로 유지하였다.

시간별 미세조류의 소화단계는 형광현미경 (Olympus BX60 W/ACC, Japan) 으로 유생의 소화기내의 미세조류의 광합성 색소의 형광반응도에 따라 Aldana-Aranda et al. (1997) 의 방법으로 소화단계를 4단계로 나누어 조사하였다 (Table 1). 이 때 유생 단계별 미세조류 12종에 대한 소화지수 (Digestion index)는 먹이생물 공급 후 5시간째 조사하여 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{소화지수 (Digestion index, DI)} = ((N_2 + N_3) / N_0) \times 100$$

(N₀: number of initial whole cell digestive stage, N₂ and N₃ : number of larvae at digestive stage 2 and 3, respectively)

통계분석

각 실험 결과로부터 얻어진 모든 통계적 측정값들은 평균 ± 표준오차로 표시하였다. 측정값들의 유의차 유무는 SPSS program을 사용하여 ANOVA-test를 실시한 후, Tukey HSD test로 평균간의 유의성 (P < 0.05) 을 검정하였다.

결 과

굴 유생을 D shape, Early umbo, Umbo, Full grown stage 나누어 미세조류 12종에 대한 소화성을 조사한 결과 미세조류 종류별로 많은 차이를 보였다.

D shape의 경우 실험개시 때 미세조류 12종; *N. oculata*, *C. ellipsoidea*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*, *C. calcitrans*, *C. gracilis*, *C. simplex*, *D. tertiolecta*, *T. weissflogii*, *T. tetrathele*, *P. tricornutum*의 먹이섭취는 각각 평균 99.3 ± 0.5%, 99.7 ± 0.2%, 95.8 ± 1.5%, 96.2

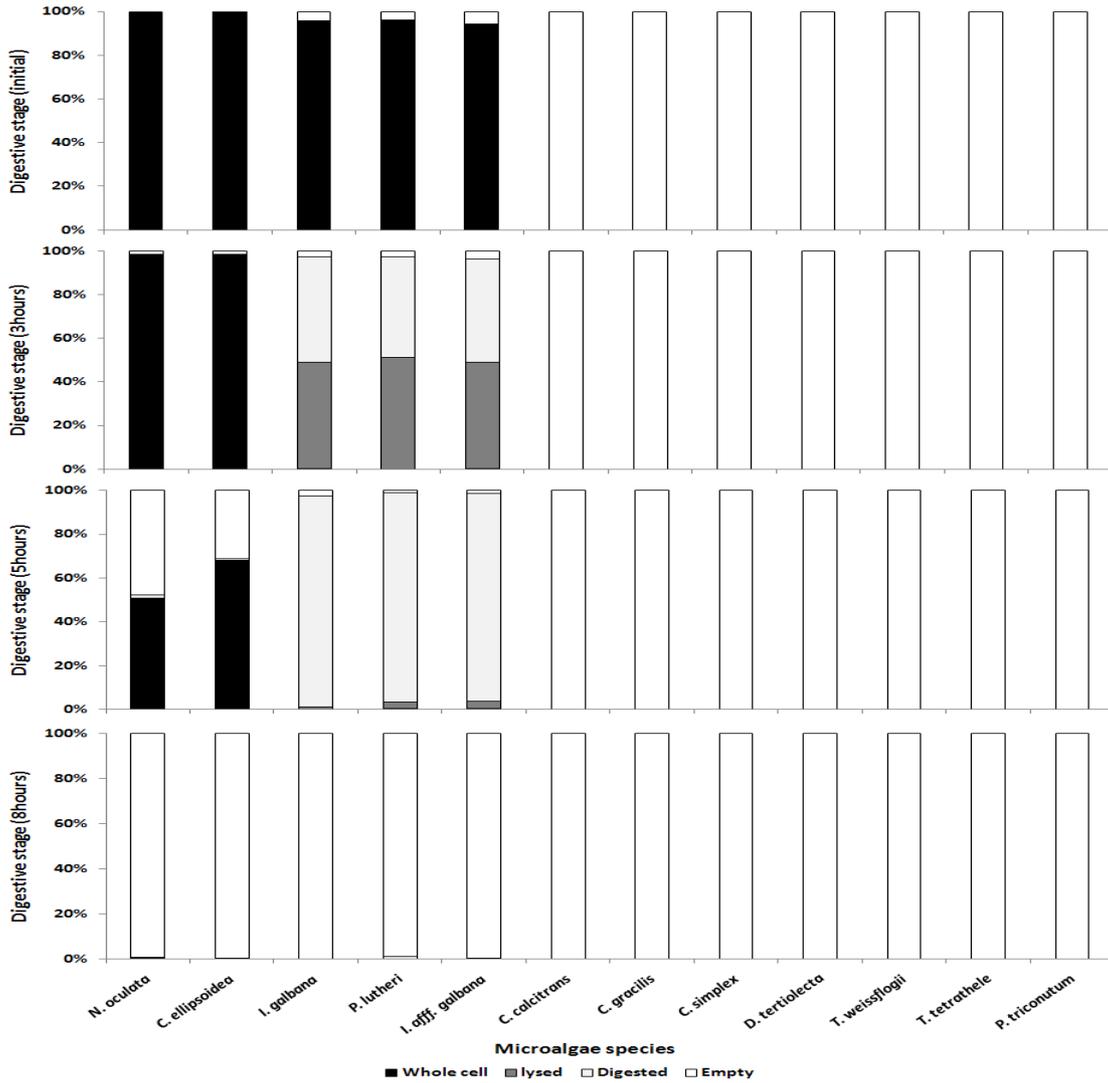


Fig 1. Evolution in ratio of four nutritional stages expressed in percentage of the *Crassostrea gigas* D shape larvae after 0, 3, 5 and 8 hours fed 12 microalgae species.

$\pm 0.4\%$, $94.2 \pm 1.2\%$, 0.0% , 0.0% , 0.0% , 0.0% , 0.0% , 0.0% , 0.0% 로 *N. oculata*, *C. ellipsoidea*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*. 5종만 먹이섭취가 확인되었다.

공급 3시간 후 *N. oculata*, *C. ellipsoidea*, *I. galbana*, *I. aff. galbana*는 각각 $98.8 \pm 0.6\%$, $98.7 \pm 0.6\%$, $0.5 \pm 0.1\%$, $0.4 \pm 0.1\%$ 가 whole cell 단계였고, *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*은 각각 $48.6 \pm 1.9\%$, $51.1 \pm 1.1\%$, $48.8 \pm 0.5\%$ 가 세포용해 단계였고, $48.9 \pm 0.5\%$, $48.3 \pm 0.5\%$, $46.9 \pm 1.5\%$ 가 소화단계였다. 5시간 후는 *N. oculata*와 *C. ellipsoidea*는 각각 whole cell 단계가 $50.8 \pm 0.9\%$, $68.0 \pm 0.3\%$ 였고, 소화단계가 각각 $1.4 \pm 0.1\%$, $0.9 \pm 0.2\%$ 였으며, 장관이 빈 상태가 각각 $47.9 \pm 0.8\%$, 51.6

$\pm 0.5\%$ 였다. *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*은 whole cell 단계가 각각 $0.0 \pm 0.0\%$, $0.4 \pm 0.1\%$, $0.4 \pm 0.4\%$, 세포용해 단계가 각각 $1.1 \pm 0.2\%$, $2.9 \pm 0.2\%$, $0.8 \pm 0.1\%$ 였고, 소화단계가 $96.4 \pm 0.1\%$, $95.8 \pm 0.5\%$, $94.9 \pm 0.3\%$ 였으며, 빈 상태가 $2.6 \pm 0.1\%$, $0.9 \pm 0.7\%$, $1.4 \pm 0.3\%$ 였다. 그리고 먹이공급 후 8시간 경과되었을 때는 *N. oculata*와 *C. ellipsoidea*가 각각 $0.6 \pm 0.1\%$, $0.4 \pm 0.1\%$ 가 whole cell 단계였고, *P. lutheri*와 *I. aff. galbana*가 각각 $1.0 \pm 0.2\%$, $0.4 \pm 0.1\%$ 가 소화단계였다. 나머지는 소화관이 빈 상태였다 (Fig. 1).

Early umbo의 경우 실험개시 때 미세조류 12종; *N. oculata* ($99.3 \pm 0.6\%$), *C. ellipsoidea* ($99.7 \pm 0.2\%$), *I.*

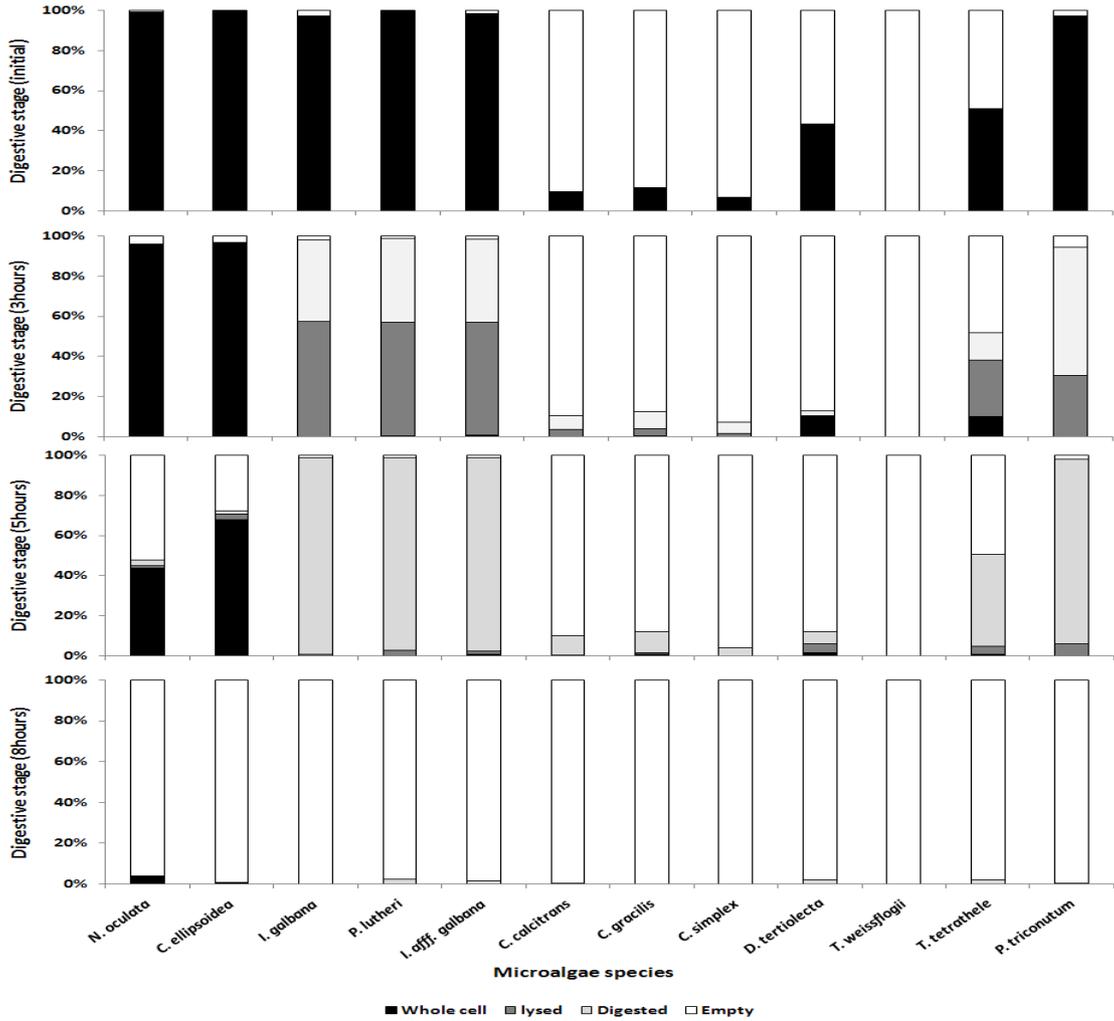


Fig 2. Evolution in ratio of four nutritional stages expressed in percentage of the *Crassostrea gigas* early umbo stage larvae after 0, 3, 5 and 8 hours fed 12 microalgae species.

galbana (97.3 ± 1.7%) *P. lutheri* (96.2 ± 0.4%), *I. aff. galbana* (94.2 ± 1.2%), *C. calcitrans* (9.7 ± 1.8%), *C. gracilis* (11.7 ± 2.1%), *C. simplex* (6.6 ± 1.2%), *D. tertiolecta* (43.3 ± 2.7%), *T. weissflogii* (0.0 ± 0.0%), *T. tetrathele* (50.9 ± 2.3%), *P. triconutum* (97.3 ± 1.6%) 로 먹이섭취 상태는 다양하였고, 특히 *T. weissflogii*는 섭취가 되지 않았다.

공급 3시간 후 *N. oculata*, *C. ellipsoidea*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*, *C. gracilis*, *D. tertiolecta* 및 *T. triconutum*는 각각 95.9 ± 0.6%, 97.0 ± 0.5%, 0.3 ± 0.2%, 0.6 ± 0.1%, 0.4 ± 0.1%, 10.1 ± 0.5%, 9.8 ± 0.2% Whole cell 단계였다. *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*, *C. calcitrans*, *C. gracilis*, *C. simplex*, *D. tertiolecta*, *T. tetrathele* 및 *P. triconutum*에서는 세포용해와 소화단계가 관

찰되었는데, 세포용해는 각각 57.6 ± 0.5%, 56.6 ± 0.4%, 56.5 ± 0.5%, 3.3 ± 0.4%, 3.4 ± 0.4%, 1.5 ± 0.1%, 0.2 ± 0.1%, 28.3 ± 0.5%, 30.6 ± 0.7% 였고, 소화단계는 40.3 ± 0.7%, 41.7 ± 0.5%, 41.3 ± 0.6%, 6.9 ± 0.2%, 8.4 ± 0.1%, 5.7 ± 0.4%, 2.5 ± 0.2%, 13.8 ± 0.4%, 63.9 ± 0.2%였다. 그리고 *C. calcitrans*, *C. gracilis*, *C. simplex*, *D. tertiolecta*, *T. weissflogii* 및 *T. tetrathele*는 각각 89.8 ± 0.5%, 87.8 ± 0.5%, 92.8 ± 0.5%, 87.2 ± 0.4%, 100.0 ± 0.0%, 48.1 ± 1.1%가 소화관이 빈 상태였다. 한편, 5시간 때에는 *N. oculata*와 *C. ellipsoidea*가 각각 43.8 ± 0.4%, 67.9 ± 0.3%가 whole cell 단계였고, 나머지 대부분 종에서는 소화단계와 빈 상태였다. 소화단계는 *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*, *T. tetrathele* 및 *P. triconutum*이 각각 97.9 ± 0.2%, 95.9 ± 0.3%, 96.4 ±

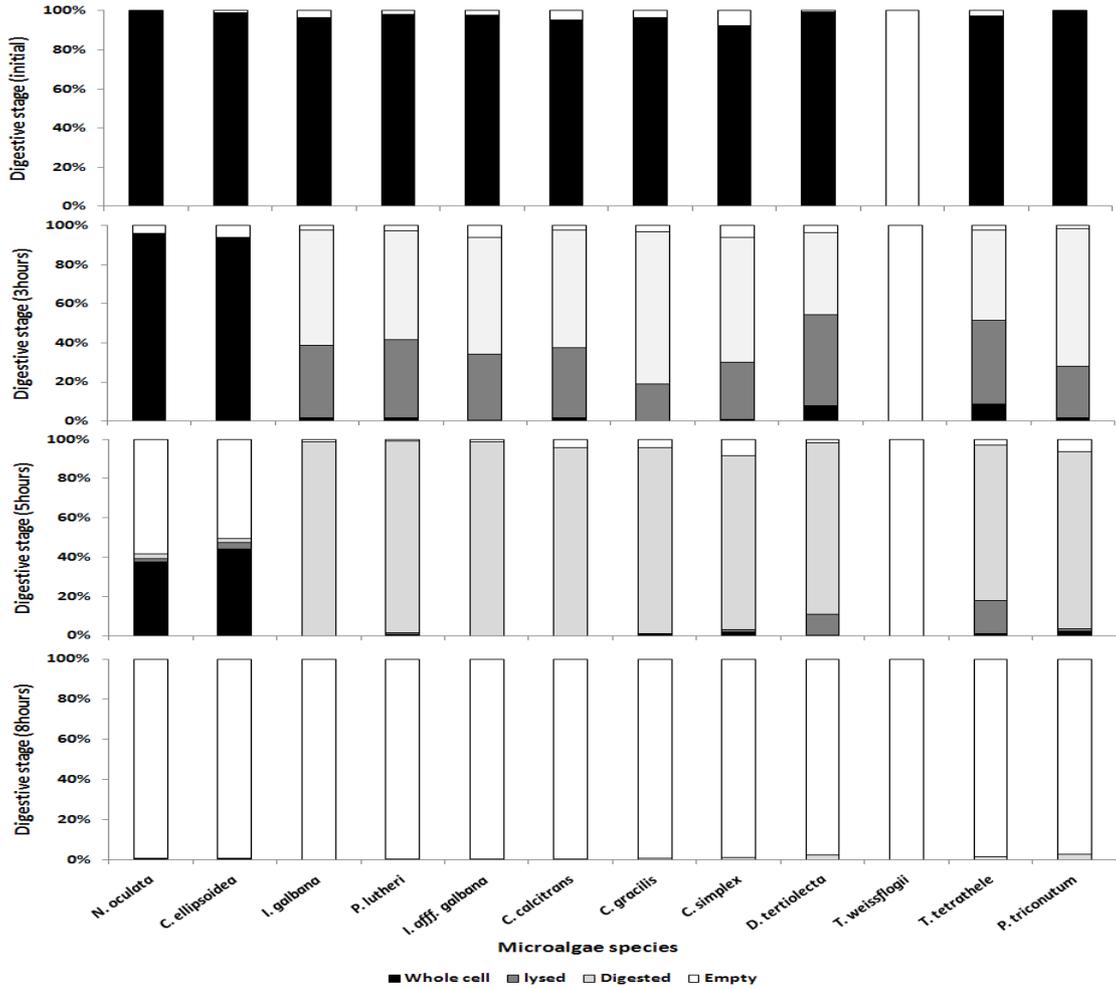


Fig 3. Evolution in ratio of four nutritional stages expressed in percentage of the *Crassostrea gigas* umbo stage larvae after 0, 3, 5 and 8 hours fed 12 microalgae species.

0.1%, $45.5 \pm 0.3\%$, $91.6 \pm 0.4\%$ 였고, 나머지는 0.0-10.6% 수준이었다. 소화관이 빈 상태는 *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana* 및 *P. triconutum*이 1.3-2.2%를 보였고, 나머지는 49.5%이상 이었다. 그리고 8시간 짜 조사했을 때 대부분 미세조류에서 96.2%이상 소화관이 빈 상태였다 (Fig. 2).

Umbo 유생은 실험개시 시 D shape와 Early umbo 단계와 마찬가지로 미세조류 12종에 대해 *T. weissflogii* ($0.0 \pm 0.0\%$)는 먹이섭취가 확인되지 않았고, 나머지는 92.3-99.7%가 섭취가 된 상태였다. 공급 3시간 후 *N. oculata*, *C. ellipsoidea*, *D. tertiolecta* 및 *T. triconutum*가 각각 $95.9 \pm 0.2\%$, $93.9 \pm 0.4\%$, $7.7 \pm 0.3\%$, $8.9 \pm 0.2\%$ Whole cell 단계였고, 나머지 *T. weissflogii*가 $100.0 \pm 0.0\%$ 소화관이 빈 상태를 제외하고는 대부분 세포용해 및 소화단계로 나타났다. 세포용해 단계는 18.6-46.7%였고, 소화단계는

42.0-78.1%였다. 5시간째에는 *N. oculata*, *C. ellipsoidea* 각각 whole cell 단계가 $37.6 \pm 0.4\%$, $44.0 \pm 0.2\%$ 와 빈 상태가 $58.5 \pm 0.6\%$, $50.6 \pm 0.5\%$ 인 것과 *T. weissflogii*가 $100.0 \pm 0.0\%$ 소화관이 빈 상태를 제외하고는 대부분 78.8-98.7%가 소화단계였다. 그리고 8시간째에는 모든 미세조류 중에서 97.3%이상 완전히 소화관이 빈 상태였다 (Fig. 3).

Full grown 유생은 Umbo 단계와 비슷하게 *T. weissflogii* ($1.0 \pm 0.3\%$)로 매우 낮은 섭취상태를 보였고, 나머지 종은 91.3-99.7%가 섭취되어 Whole cell 단계였다. 공급 3시간째 *N. oculata*와 *C. ellipsoidea*가 각각 $92.8 \pm 0.4\%$, $97.8 \pm 0.5\%$ 가 Whole cell 단계였고, *I. galbana*, *C. gracilis*, *D. tertiolecta*, *T. tetrathele* 및 *P. triconutum*이 각각 $7.3 \pm 0.2\%$, $5.0 \pm 0.2\%$, $35.2 \pm 0.2\%$, $26.5 \pm 0.3\%$, $6.1 \pm 0.2\%$ 가 세포용해단계였고, *T. weissflogii*가

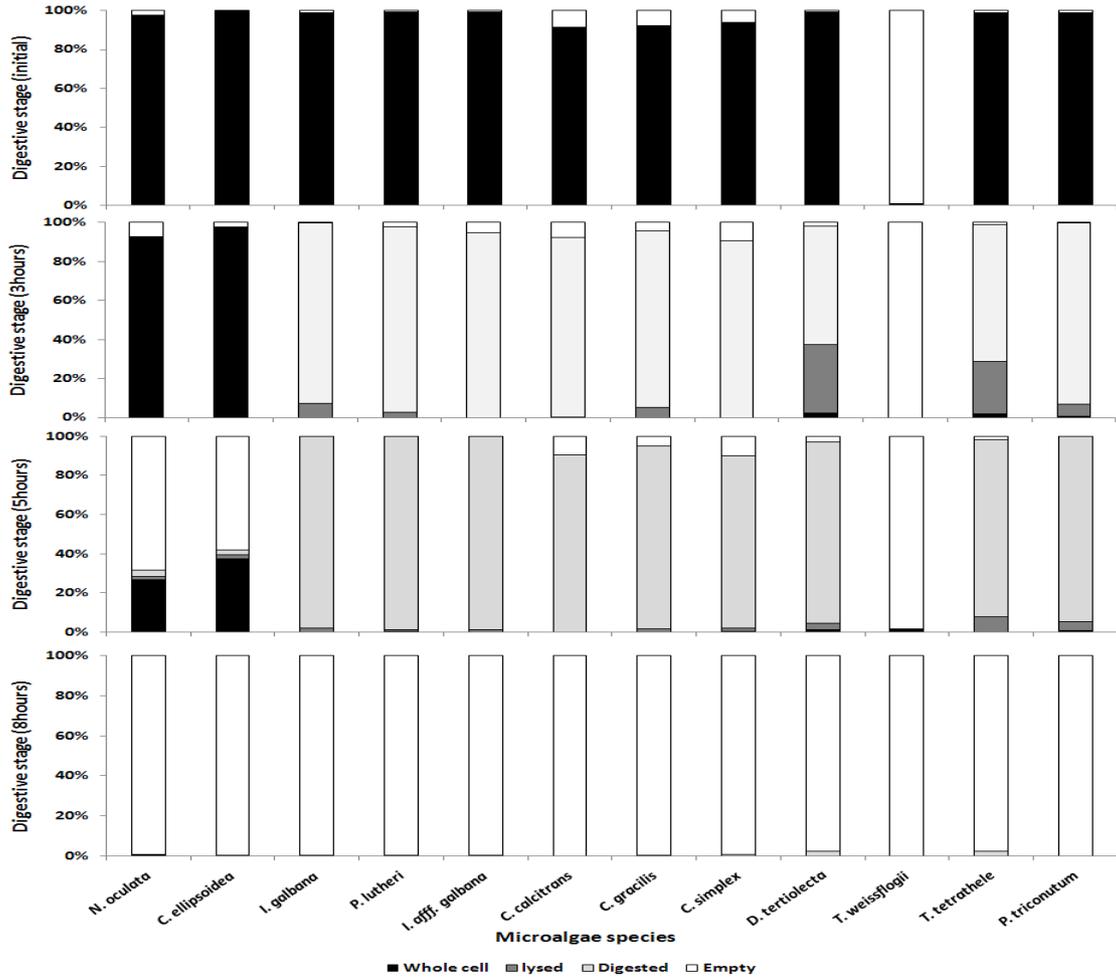


Fig 4. Evolution in ratio of four nutritional stages expressed in percentage of the *Crassostrea gigas* full grown stage larvae after 0, 3, 5 and 8 hours fed 12 microalgae species.

100.0 ± 0.0% 소화관이 빈 상태를 제외하고는 대부분 60.7-95.2%가 소화단계로 나타났다. 5시간째에는 *N. oculata*, *C. ellipsoidea* 각각 whole cell 단계가 26.8 ± 0.2%, 37.5 ± 0.3%와 빈 상태가 68.3 ± 0.5%, 58.1 ± 0.5%인 것과 *T. weissflogii*가 98.4 ± 0.1% 소화관이 빈 상태를 제외하고는 대부분 88.3-98.7%가 소화단계였다. 그리고 8시간째에는 모든 미세조류 중에서 97.7%이상 완전히 소화관이 빈 상태였다 (Fig. 4).

먹이공급 5시간째 미세조류 12종에 대한 소화지수 값을 조사한 결과 유생의 크기 단계별 차이를 보였다. D shape는 *I. galbana*, *P. lutheri* 및 *I. aff. galbana*의 경우 소화지수 값이 모두 99.5로 유의적인 차이 없이 동일한 결과를 보였다. *N. oculata*와 *C. ellipsoidea*은 높은 섭취상태를 보였으나 소화지수 값은 각각 1.4와 0.8로 매우 낮았다. 그러나 그 외 미세조류 종들은 0.0를 보였는데, 이는 앞서 소화단계별 조사에서

섭취가 되지 않은 것으로 확인되었다 (Table 2).

Early umbo 단계에서는 *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*, *C. calcitrans*, *T. tetrahele*, *P. triconutum*이 모두 95.9 이상으로 매우 높은 소화지수 값을 보였다. 이 들 6종 중 착편모조류인 *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*와 규조류인 *P. triconutum*이 각각 99.1, 99.1, 99.5, 99.6으로 매우 높은 값을 보였지만, 유의적인 ($P < 0.05$) 차이는 없었다. 다음으로 *C. gracilis*가 84.2로 비교적 높은 소화지수 값을 보였는데, 통계적으로는 *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*, *C. calcitrans*, *T. tetrahele*와 유의적인 차이는 없었다 ($P < 0.05$). 그리고 *C. simplex*와 *D. tertiolecta*는 각각 58.4와 24.3으로 앞서 언급한 종들에 비해 유의적으로 낮은 소화지수 값을 보였다. 그리고 *N. oculata*와 *C. ellipsoidea*는 D shape와 동일하게 높은 섭취는 보였지만, 소화지수는 각각 4.2와 4.3으로 다른 종들에 비해 매우 낮은

Table 2. Digestion indices of 12 microalgae species fed after 5 hours of the *Crassostrea gigas* at four larval development stage

Microalgae species	Larval stage			
	D shape	Early umbo	umbo	Full grown
<i>N. oculata</i>	1.4 ± 0.0.1 ^c	4.2 ± 0.1 ^a	3.9 ± 0.1 ^b	5.0 ± 0.1 ^c
<i>C. ellipsoidea</i>	0.8 ± 0.0.1 ^b	4.3 ± 0.2 ^a	5.4 ± 0.2 ^c	4.4 ± 0.2 ^b
<i>I. gabana</i>	99.5 ± 0.0 ^d	99.1 ± 0.3 ^{de}	99.5 ± 0.3 ^{fg}	99.3 ± 0.1 ^f
<i>P. lutheri</i>	99.5 ± 0.1 ^d	99.1 ± 0.2 ^{de}	99.6 ± 0.2 ^g	99.2 ± 0.1 ^f
<i>I. aff. galbana</i>	99.5 ± 0.1 ^d	99.5 ± 0.1 ^{de}	99.5 ± 0.1 ^{fg}	99.4 ± 0.0 ^f
<i>C. calcitrans</i>	0.0 ± 0.0 ^a	95.9 ± 2.3 ^{de}	99.2 ± 0.3 ^{fg}	99.1 ± 0.1 ^f
<i>C. gracilis</i>	0.0 ± 0.0 ^a	84.2 ± 9.7 ^d	97.8 ± 0.1 ^f	99.7 ± 0.1 ^f
<i>C. simplex</i>	0.0 ± 0.0 ^a	58.4 ± 1.2 ^c	95.1 ± 0.2 ^e	95.9 ± 0.1 ^d
<i>D. tertiolecta</i>	0.0 ± 0.0 ^a	24.3 ± 0.3 ^b	98.3 ± 0.3 ^f	96.6 ± 0.1 ^e
<i>T. weissflogii</i>	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
<i>T. tetrathele</i>	0.0 ± 0.0 ^a	97.6 ± 0.4 ^{de}	98.3 ± 0.2 ^f	99.7 ± 0.2 ^f
<i>P. triconutum</i>	0.0 ± 0.0 ^a	99.6 ± 0.3 ^e	91.7 ± 0.2 ^d	99.6 ± 0.1 ^f
F-values	527076.9	218.1	35500.8	130074.8
P-values	0.000	0.000	0.000	0.000

Values (means ± SE, n = 3) with different superscripts in the same column are statistical different at P < 0.05.

값을 보였다. 한편, *T. weissflogii*는 D shape와 동일하게 섭취를 하지 않았다 (Table 2).

Umbo 단계와 Full grown 단계는 비슷한 소화지수 값을 보였다. D shape와 Early umbo와 마찬가지로 *N. oculata*와 *C. ellipsoidea*는 각각 3.9와 5.0, 5.4와 4.4로 두 성장단계 모두 종별 소화지수 값은 유의적인 차이를 보였지만, 전체적으로 다른 종에 비해 매우 낮은 소화지수 값을 보였다. 한편, *T. weissflogii*는 이 두 발달단계에서도 섭취가 확인되지 않았다. 나머지 미세조류 종들은 전체적으로 굴 유생의 두 발달단계에서 91.7 이상 높은 소화지수 값을 보였다. 이 중 umbo의 경우 *P. lutheri*가 99.6으로 유의적으로 가장 높은 소화지수 값을 보였다. 그러나 *I. galbana*, *I. aff. galbana*, *C. calcitrans*와는 유의적인 차이는 없었다 (P > 0.05). 그리고 Full grown 단계는 *C. simplex*와 *D. tertiolecta*가 각각 95.9와 96.6으로 낮았지만, 나머지 *I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*, *C. calcitrans*, *T. tetrathele*, *P. triconutum*은 모두 99.1 이상으로 매우 높은 소화지수 값을 보이면서 이들 종간에는 유의적이 차이가 없었다.

고찰

조개류 유생의 소화기관은 단순구조로 되어 있는데, 소화기관들은 단층구조로 내장강에서 분리된 외층세포로 둘러싸여져 있다 (Elston 1980b). 소화과정은 면반의 섬모에 의해서 포획된 먹이입자는 섬모운동에 의해서 위구관으로 이동하여 면반의 가장자리를 따라 이동되어 입으로 들어가게 된다. 섬모로 둘러싸인 입은 갈매기 모양으로 섬모운동에 의해서 식도를 통

해 위로 들어간 후 위속 섬모와 침체의 회전운동 (36-90 rpm) 으로 혼합 분쇄된 후 소화선에서 분비된 효소작용으로 소화된 후 분은 장관을 통해 배출 된다 (Elston 1980a). 일반적으로 굴 유생의 먹이섭취 형태는 mixotrophic (혼합영양단계), exotrophic (외인영양단계), 변태기 3단계로 나눌 수 있다 (Gerdes, 1983; Rico-Villa et al., 2006). 그리고 각 영양단계에 따라 먹이섭취량은 Mixotrophic 단계인 각장 100 μm 이하에서는 먹이섭취량이 적고, 각정이 돌출하기 시작하는 시기인 exotrophic 단계에서는 먹이섭취량이 기하급수적으로 늘고, 다시 변태기로 이행하면서 먹이섭취량이 줄어든다. 이와 같은 현상은 Mixotrophic 단계에서는 소화기관이 완전히 발달되지 않은 상태이고, 식도의 구경도 매우 작아 큰 먹이는 섭취에 한계가 있고 (Gallager, 1988), 소화관의 부피도 적어 전체 먹이섭취량이 줄어든다. 이 기간에는 주로 난내에 포함된 영양물질이 많은 영향을 미친다 (Bayne, 1983). 따라서 각각의 영양단계에 차이가 있는 성장단계에 따라 먹이특성을 조사하는 것은 보다 정확한 소화특성을 구명하기 위한 바람직한 방법이다. 따라서 본 연구도 유생의 먹이섭취 형태로 구분되어지는 유생의 발달단계에 따라 실시하였고, 그 결과도 다양하게 나타났다.

굴, *C. gigas* 유생은 D상으로 발달한 이 후 먹이를 섭취하는 시기는 수온에 따라 달라지는데, 수온 21℃에서는 9 시간 이후, 24℃에서는 6 시간 이후 먹이를 섭취하게 되는데, 이와 같은 이유는 유생의 소화기관이 완전히 만들어지지 않은 결과로 유추하고 있다 (Elston 1980a). 그러나 본 조사에서는 수온 25℃에서 24 시간 경과된 평균 각장 73.5 μm의 D

shape 유생을 대상으로 미세조류 12종을 공급한 결과 10분 이내에 먹이를 섭취하는 것으로 확인되었다. 그리고 소화지수 값도 3종류 (*I. galbana*, *P. lutheri*, *I. aff. galbana*) 의 작편모조류에서 99.5 이상의 높은 값을 보여 상기 보고자들의 결과와는 어느 정도 차이를 보였다. 온도는 유생의 섭식력과 동화율에 많은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있는데 (Rico-Villa *et al.*, 2009) 이와 같은 결과는 사육온도 차에 의한 결과 등으로 판단된다. 한편, 4단계의 발달단계에서 *N. oculata*와 *C. ellipsoidea*는 Whole cell 단계가 전 발달단계에서 관찰되어 섭취가 많이 되는 것은 확인되었지만, 소화지수 값은 0.8-5.4로 섭취가 확인된 다른 실험 중 예 비해 매우 낮은 값을 보였다. 비슷한 연구결과로 *Chlorella*류는 굴 유생 (Babinchak and Ukeles, 1979) 에서는 소화가 되지 않고, 어미 굴 (Floyd, 1953) 의 경우 동화율이 매우 낮았다. 그리고 해만가리비 *Argopecten irradians*의 경우 탄소동위원소법을 이용해 *Chlorella autotrophica*를 조사한 결과 동화효율이 17%였고, Walne (1976) 은 동일한 방법으로 녹조류인 *Chlamydomonas coccoides*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella euchlora*를 넓적굴 *Ostrea edulis*에 적용한 결과 먹이 효율이 매우 낮았다고 보고하였다. 그리고 버어지니아 굴 (*C. virginica*) 의 경우 동화율이 규조류인 *T. pseudonana* 72%, 편모조류인 *I. galbana* 74%인데 비해, 담녹조류인 *Tetraselmis suecica* 6%로 주로 녹조류들은 두꺼운 세포막으로 인해 소화가 되지 않아 먹이 가치가 매우 낮다고 보고하고 있다 (Webb and Chu, 1982; Dunstan *et al.*, 1992). 그러나 *D. tertiolecta*와 같은 담녹조류는 세포벽이 없고, 세포막이 매우 얇아서 높은 염분 등에 매우 민감하다 (Ben-Amotz and Avron, 1980) 는 보고와는 차이가 있다. 그리고 본 조사에서는 *D. tertiolecta*와 *T. tetrahele*는 섭취가 확인되었던 Early umbo, umbo 및 Full grown 단계에서 전체 소화지수 값이 각각 24.3-98.3과 97.6-99.7로 비교적 높은 값을 보여 어느 정도 굴 유생이 섭취가 확인되는 크기에서는 소화되어 먹이생물로 활용하고 있음을 알 수 있었다. 일반적으로 수서무척추동물의 먹이 동화효율은 14-88%로 보고되고 있고, 굴 유생은 48.3-91.1%로 다양하다. 이러한 차이는 주로 사육환경에 따른 생리상태, 섭취된 먹이의 양과 질 그리고 노출된 온도가 중요한 영향을 미치지 않지만, 개체의 크기는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 알려져 있다 (Gerdes, 1983). 본 실험에서도 Early umbo 단계 이후 소화지수 값이 높았던 3종류의 편모조류와 4종류의 규조류 그리고 2종류의 담녹조류에서 비슷한 값을 보였다. 그러나 본 조사는 단순히 소화성을 조사한 결과로 동화율을 조사한 것이 아니기 때문에 정확한 비교는 어렵다. 한편, 전제 유생발단기 동안 *T. weissflogii*는 섭취가 확인되지 않았는데, 이는 세포크

기에 문제가 있는 것으로 판단된다. 일반적으로 인공종묘 생산 및 자연 상태에서 굴 유생의 장내 먹이생물의 크기 조성은 5 μm 이상 되는 크기의 입자는 관찰되지 않기 때문에 유생 사육에 공급되는 먹이생물은 1-5 μm 가 적당하고, 편모를 가지고 있는 경우에는 전체크기가 10 μm 이하가 되어야 유생의 먹이로써 적당하고 이보다 큰 먹이입자는 섭취가 어렵다 (Wisely and Reid, 1978), 그런데, 본 실험에 이용된 *T. weissflogii*는 자체조사 결과 장축이 $13.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$, 단축이 $10.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 로 조사되어 굴 유생이 섭취하기 어려운 세포 크기인 것으로 판단된다.

본 연구는 현광현미경을 이용해 현재 국내 굴 인공종묘생산 과정에서 많이 이용되고 있는 미세조류에 대하여 굴 인공종묘생산 시 효율적인 먹이생물 관리를 위한 기초자료를 제공하고 자 굴 유생의 발달단계에 따라 12종 먹이생물의 소화도를 조사하고자 실시하였는데, 전체적으로 미세조류의 종에 따라 그리고 굴 유생의 발달단계에 따라 많은 차이를 보였다. 따라서 이와 같은 결과는 향후 굴 인공종묘생산 시 효율적인 먹이생물 관리를 위한 기초자료로 활용 가능하고, 나아가 불필요한 먹이의 낭비를 막아 효율적인 먹이생물 관리로 보다 안정적인 유생 사육에 기초적인 자료로 이용가능 할 것으로 판단된다. 그러나 보다 효율적인 먹이관리를 위해서는 먹이로 이용되는 각종 미세조류 종에 대한 사육조건에 따른 소화율, 섭취가능크기 그리고 미세조류의 혼합률에 따른 먹이효율 뿐만 아니라, 영양성 등에 대해서 보다 체계적인 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

굴 인공종묘생산 시 적정 먹이생물을 선택하기 위하여 먹이생물로 이용되고 있는 12종의 미세조류를 대상으로 굴 유생의 소화도를 조사하였다. 조사는 유생의 발달단계에 따라 D형 유생, 초기각정기 유생, 각정기 유생 및 부착기 유생으로 구분하여 수용적 1L 수조에 5 마리/mL 밀도로 각각의 성장단계별 유생을 수용하고, 조사대상 먹이생물 12종을 각각 투여하였다. 소화도 측정은 먼저 12종의 먹이생물을 공급 후 3시간 동안 충분히 섭취하도록 방치한 후 먹이섭취 상태를 현광현미경으로 확인하였다. 이후 유생은 걸름망으로 걸러 여과해수가 채워진 비이커에 재수용 후 3, 5 및 8시간 후 소화도를 현광현미경으로 측정하였다. 12종 미세조류의 소화도는 유생의 발달단계에 따라 다양했다. 전 유생기 동안 *Thalassiosira weissflogii*는 섭취가 관찰되지 않았고, 나머지 종의 소화도는 유생의 발달단계에 따라 0.8-99.7%: *Chlorella ellipsoidea* (0.8-5.4%), *Nannochloris oculata* (1.4-5.0%), *Isochrysis galbana* (99.1-99.5%), *Pavlova lutheri* (99.1-99.5%), *I. aff. galbana* (99.4-99.5%), *Cheatocecos calcitrans*

(0.0-99.2%), *C. gracilis* (0.0-99.7%), *C. simplex* (0.0-95.9%), *Phaeodactylum tricornutum* (0.0-99.6%), *Tetraselmis tetrahele* (0.0-99.7%) 그리고 *Dunaliella tertiolecta* (0.0-99.6%)로 나타났다. 따라서 초기 유생은 *I. galbana*와 같이 소화성이 높은 것을 공급하고 각정기 이후 규조류 또는 담녹조류를 혼합해 주는 것이 소화성을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원 수산시험연구사업비 (RP-2011-AQ-078) 지원에 의해 수행된 연구결과입니다. 실험에 필요한 미세조류를 분양해 주신 한국미세조류은행에 감사드립니다.

참고문헌

- Abdel-Hamid, M.E., Mona, M.H., and Khalil, A.M. (1992) Effects of temperature, food and food concentrations on the growth of the larvae and spat of the edible oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Marine Biology Association*, **34**: 195-202.
- Albentosa, M., Perez-Camacho, A., Labarta, U., Beiras, R. and Fernández-Reiriz, M.J. (1993) Nutritional value of algal diets to clam spat *Venerupis pullastra*. *Marine Ecology Progress Service*, **97**: 261-269.
- Albentosa, M., Fernandez-Reiriz, M.J., Perez-Camacho, A. and Labarta, U. (1999) Growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L.) spat fed on microalgal and wheatgerm flour diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **232**: 23-37
- Aldana-Aranda, D., Lucas, A., Brulé, T., Andrade, M., García, E., Maginot, N. and Le Pennec, M. (1991) Observations on ingestion and digestion of unicellular algae by *Strombus gigas* larvae (Mollusca, Gastropoda) using epifluorescence microscopy. *Aquaculture*, **92**: 359-366.
- Aldana-Aranda, D., Patiño-Suárez, V. and Brulé, T. (1994) Ingestion and digestion of eight algae by *Strombus gigas* larvae (Mollusca, Gastropoda) Studied by epifluorescence microscopy. *Aquaculture*, **126**: 151-158.
- Aldana-Aranda, D., Patiño-Suárez, V. and Brulé, T. (1997) Nutritional potentialities of *Chlamydomonas coccoides* and *Thalassiosira fluviatilis*, as measured by their ingestion and digestion rates by the Queen Conch larvae (*Strombus gigas*). *Aquaculture*, **156**: 9-20.
- Babinchak, J. and Ukeles, R. (1979) Epifluorescence microscopy, a technique for the study of feeding in *Crassostrea virginica* veliger larvae. *Marine Biology*, **51**: 69-76.
- Badillo-Salas, C.E., Valenzuela-Espinoza, E., González-Gómez, M.A., Pares-Sierra, G., Ley-Lou, F. and Garcia-Esquivel, Z. (2009) Comparative growth of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) postlarvae with microfeed and microalgal diets. *Aquaculture International*, **17**: 173-186.
- Baldwin, B.S. and Newell, R.I.E. (1995) Feeding rate responses of oyster larvae (*Crassostrea virginica*) to seston quantity and composition. *Journal of Marine Biology Association*, **189**: 77-91.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1980) The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends in Biotechnology*. pp. 121-126. Ienum Press. New York.
- Bayne, B.L. (1983) Physiological ecology of marine molluscan larvae. In: Verdonk NH, eds, *The Mollusca*, vol. III. pp. 299-343. Academic Press. New York.
- Coutteau, P. and Sorgeloos, P. (1992) The use of algal substitutes and the requirement for live algae in hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: An international survey. *Journal of Shellfish Research*, **11**: 467-476.
- Devakie, M.N. and Ali, A.B. (2000) Salinity-temperature and nutritional effects on the setting rate of larvae of the tropical oyster, *Crassostrea iredalei* (Faustino). *Aquaculture*, **184**: 105-114.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Jeffrey, S.W. and Barret, S.M. (1992) Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **161**: 115-134.
- Elston, R. (1980a) Functional morphology of the coelomocytes of the larval oysters (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **60**: 947-957.
- Elston, R. (1980b) Functional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval American oyster, *Crassostrea virginica*. *Proceeding of National Shellfish Association*, **70**: 65-93.
- Espinosa, E.P. and Allam, B. (2006) Comparative growth and survival of juvenile hard clams, *Mercenaria mercenaria*, fed commercially available diets. *Zoo Biology*, **25**: 503-525.
- Enes, P. and Borges, M.T. (2003) Evaluation of microalgae and industrial cheese whey as diets for *Tapes decussatus* (L.) seed: effect on water quality, growth, survival, condition and filtration rate. *Aquaculture Research*, **34**: 299-309.
- Ewart, J.W. and Epifanio, C.E. (1981) A tropical flagellate food for larval and juvenile oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture* **22**: 297-300.
- Floyd, D.J. (1953) Foods and feeding of oysters as observed with the use of radioactive plankton. *Proceeding of National Shellfish Association Convention Addresses*, 71-180.
- Gallager, S.M. (1988) Visual observations of particle manipulation during feeding in larvae of a bivalve

- mollusk. *Bulletin of marine Science*, **43**: 344-365.
- Gerdes, D. (1983) The Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Part I. Feeding behavior of larvae and adults. *Aquaculture*, **31**: 195-219.
- Helm, M.M. and Millican, P.F. (1977). Experiments in the hatchery of Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, **11**: 1-12.
- His, E., Robert, R. and Dinet, A. (1989) Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, **100**: 455-463.
- Lemos, M.B.N., Nascimento, I.A., De Araujo, M.M.S., Pereira, S.A., Bahia, I. and Smith, D.H. (1994) The combined effects of salinity, temperature, antibiotics and aeration on larval growth and survival of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*. *Journal of Shellfish Research*, **13**: 187-192.
- Lucas, A. and Rangel, D.C. (1983) Detection of the first larval feeding in *Crassostrea gigas*, using epifluorescence microscope. *Aquaculture*, **30**: 369-374.
- Myers, J.A. and Boisvert, R.N. (1990) The economics of producing algae and bivalve seed in hatcheries. *Aquaculture*, **86**: 163-179.
- Owen, G. (1974). Feeding and digestion in the bivalvia. In: Lowenstein O. ed, *Advances in Comparative Physiology and Biochemistry*, vol. 5. pp. 1-35. Academic Press. New York, USA.
- Ponis, E., Robert, R., Parisi, G. and Tredici, M. (2003a). Assessment of the performance of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed with fresh and preserved *Pavlova lutheri* concentrates. *Aquaculture International*, **11**:69-79.
- Ponis, E., Robert, R. and Parisi, G. (2003b) Nutritional value of *Pavlova lutheri*, *Isochrysis aff. galbana* clone T-Iso and *Chaetoceros calcitrans* forma pumilum, either fresh or preserved, for larval and post-larval development of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, **221**: 491-505.
- Rico-Villa, B., Le Coz, J.R., Mingant, C. and Robert, R. (2006) Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, **256**: 377-388.
- Rico-Villa, R., Pouvreau, S. and Rober, R. (2009) Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **287**: 395-401.
- Robert, R. and Trintignac, P. (1997) Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. *Aquatic Living Resources*, **10**: 315-327.
- Urban, E.R. and Langdon, C.J. (1984) Reduction in costs of diets for the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), by the use of non-algal supplements. *Aquaculture*, **38**: 277-291.
- Webb, K.L. and Chu, F.E.. (1982) Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. in Pruder GD, Langdon CJ and Conklin DE. eds, *Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, 272-291. Louisiana State University. Baton Rouge.
- Walne, P.R. (1974) *Culture of bivalve molluscs*, 173. The whitefriars Press Ltd. London and Tondridge.
- Walne, P.R. (1976) Factors affecting the relation between feeding and growth in bivalves. Devik O. eds, *Harvesting Polluted Waters*, 169-183. Plenum Press. New York.
- Wisely, B. and Reid, B. (1978) Experimental feeding of sydney rock oysters (*Crassostrea commercialis* = *Saccostrea cucullata*): 1. optimum particle sizes and concentrations. *Aquaculture*, **15**: 319-331.