

박사학위 청구논문

활성유기물 부유법을 이용한  
흰다리새우, *Litopenaeus vannamei*  
고밀도 사육

제주대학교 대학원

수산생물학과

김 봉 래

2009년 12월

박사학위 청구논문

활성유기물 부유법을 이용한  
흰다리새우, *Litopenaeus vannamei*  
고밀도 사육

제주대학교 대학원

수산생물학과

김 봉 래

2009년 12월

활성유기물 부유법을 이용한  
흰다리새우, *Litopenaeus vannamei*

고밀도 사육

지도교수 이 영 돈

김 봉 래

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함

2009년 12월

김봉래의 이학박사 학위논문을 인준함

심사위원장	한 창 희
위 원	최 광 식
위 원	장 인 권
위 원	허 문 수
위 원	이 영 돈



제주대학교 대학원

2009년 12월

**Intensive Culture of Pacific White Shrimp,  
*Litopenaeus vannamei*, with Activated Suspension  
Pond Method (ASM)**

**Bong-Rae Kim**

(Supervised by Professor Young-Don Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL  
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE  
DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

December 2009

# 목 차

List of figures .....	i
List of tables .....	v
Abstract .....	viii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	7
1. 활성유기물 부유법을 이용한 축제식 고밀도 양식 .....	7
1) 사육지와 사육수 준비 .....	7
2) 종묘입식과 사육관리 .....	7
3) 수질환경 측정 .....	8
2. 활성유기물 부유법에 의한 고밀도 중간육성 및 중간양성 .....	11
1) 사육수조 및 부속시설 .....	11
2) 사육수 관리 .....	11
3) 종묘입식 및 사육관리 .....	12
3. 활성유기물 부유법에 의한 사육수의 세균학적 특성 .....	14
1) 실험수조 .....	14
2) 세균계수 .....	14
3) 세균동정 .....	14
4) 16S rRNA 염기서열 분석 .....	15
5) 통계 및 데이터 처리 .....	16
4. 활성유기물 부유법의 사육수가 새우의 성장과 면역효과에 미치는 영향 .....	17
1) 사육수조 및 사육조건 .....	17
2) 사육수 준비 및 실험구 .....	17
3) 생물사육 및 사료 공급관리 .....	17
4) 수질환경 조사 .....	18
5) 총세균 계수 .....	18
6) 혈구분석 .....	18
7) 혈구확보 .....	19

8) 면역활성 측정 .....	19
Ⅲ. 결 과 .....	20
1. 활성유기물 부유법을 이용한 축제식 고밀도 양식 .....	20
1) 수질환경 변화 .....	20
2) 새우의 성장률과 생존율 .....	25
2. 활성유기물 부유법에 의한 고밀도 중간육성 및 중간양성 .....	28
1) 중간육성 .....	28
(1) 사육수의 수질 및 영양염 변화 .....	28
(2) 새우의 성장 .....	34
2) 중간양성 .....	34
(1) 사육수의 수질 및 영양염 변화 .....	35
(2) 새우의 성장 .....	40
3. 활성유기물 부유법에 의한 사육수의 세균학적 특성 .....	43
1) 세균계수 .....	43
2) 세균군집의 특성 .....	49
3) 세균군집의 구성 .....	49
4. 활성유기물 부유법의 사육수가 성장과 면역효과에 미치는 영향 .....	57
1) 성장률, 생존율 및 사료효율 .....	57
2) 사육수의 수질 .....	60
3) 사육수의 총세균 .....	65
4) 면역력에 미치는 사육수의 효과 .....	68
IV. 고 찰 .....	73
요 약 .....	88
참고문헌 .....	91

## List of figures

Fig. 1. Shrimp farming area and total cultured shrimp production in South Korea. .....	6
Fig. 2. Layouts of the HDPE-lined raceway (Pond 1) and HDPE-lined PDP (pressuredifferential pipe controlled release bottom aeration) system (Pond 2). ..	9
Fig. 3. Side view of raceway tank for <i>L. vannamei</i> nursery culture using activated suspension method. ....	13
Fig. 4. Bacteria identified from the raceway tanks. ....	15
Fig. 5. Change of water temperature and salinity in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial. ....	22
Fig. 6. Change of alkalinity in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial. ....	23
Fig. 7. Change of pH in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial. ....	23
Fig. 8. Change of total ammonia nitrogen (TAN) in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial. ....	24
Fig. 9. Change of nitrite-nitrogen in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial. .....	24
Fig. 10. Weekly growth rate of <i>L. vannamei</i> in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial. ....	27
Fig. 11. Changes of mean body weight of <i>L. vannamei</i> in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial. ....	27
Fig. 12. Daily changes of water temperature in four raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> . ....	31
Fig. 13. Daily changes of dissolved oxygen in four raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> . ....	31
Fig. 14. Daily changes of total ammonia nitrogen (TAN) in four raceway tanks using	

activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> . .....	32
Fig. 15. Daily changes of pH in four raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> . ..	32
Fig. 16. Daily changes of nitrite-nitrogen in four raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> . .....	33
Fig. 17. Growth of Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> , in four tanks over 35-day nursery trial. ....	33
Fig. 18. Daily change of water temperature in four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trail with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> . .....	36
Fig. 19. Daily changes of pH in four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trail with Pacific white shrimp, <i>L.vannamei</i> . .....	36
Fig. 20. Daily changes of turbidity in four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trail with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> . .....	37
Fig 21. Daily changes of total ammonia-N in four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trail with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> . .....	37
Fig. 22. Daily changes of nitrite-N in four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trail with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> . .....	38
Fig. 23. Growth of Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> , in four raceway tanks over a 42-day post-nursery culture using activated suspension method. ....	42
Fig. 24. Dominant bacteria obtained from the raceway tanks. ....	44
Fig. 25. Comparison of total bacterial count in four tanks of white shrimp, <i>L. vannamei</i> using activated suspension method during 42-day post-nursery culture.	

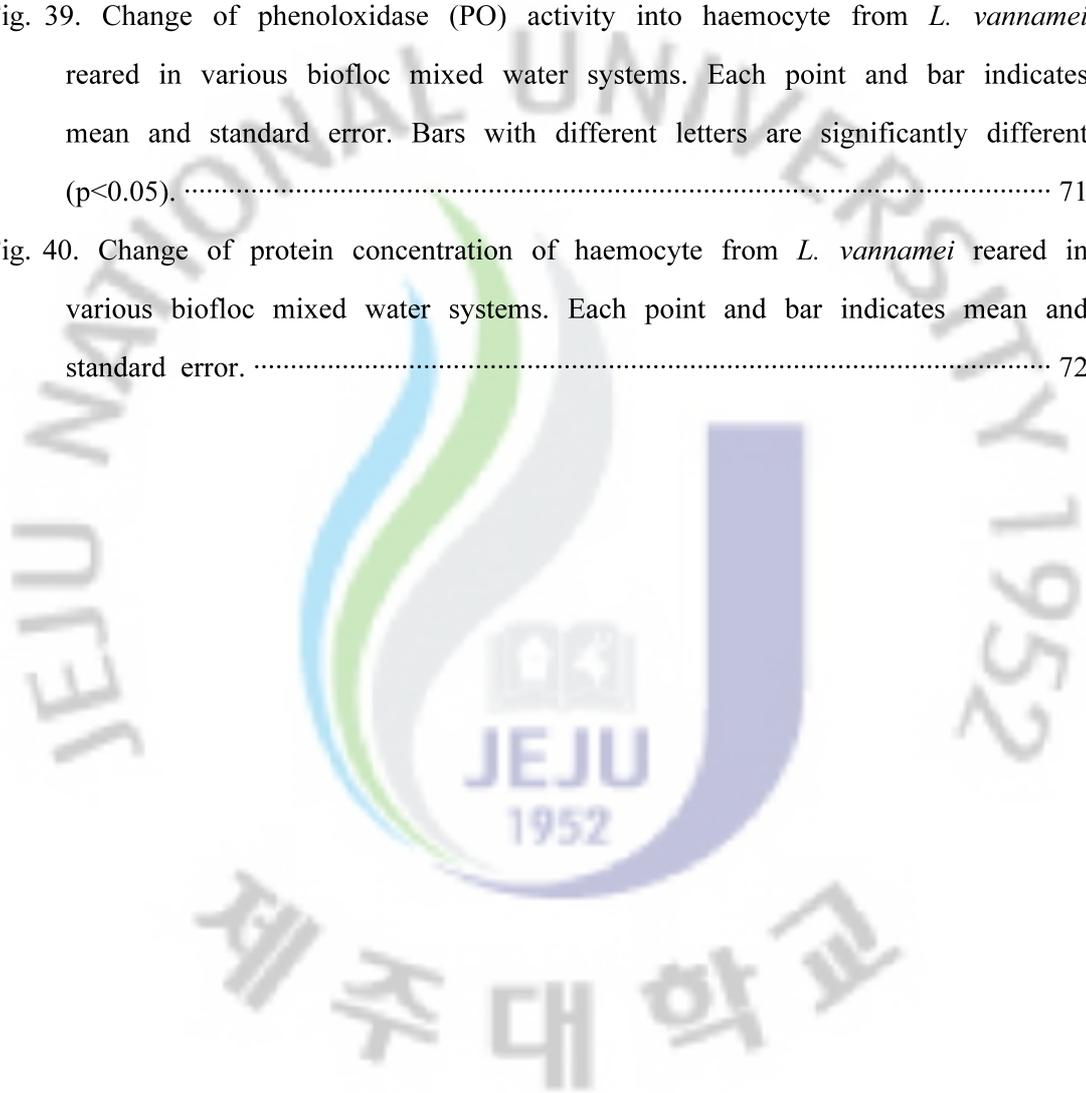
	Asterisks are significantly different (P <0.05). .....	46
Fig. 26.	<i>Vibrio</i> count (mean±S.D. CFU/mL) in four tanks of white shrimp, <i>L. vannamei</i> using activated suspension method for 42-day post-nursery culture. Asterisks are significantly different (P <0.05). .....	48
Fig. 27.	Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA sequences retrieved from the different isolated colonies (Asterisk). The tree was constructed from the sequence obtained in this study and reference sequences by neighbor joining procedures. Accession numbers of reference sequences and 16S rRNA sequence of isolates are provided in the figure. ....	52
Fig. 28.	Weekly growth of Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> in five experimental groups during a 63-day culture trial. ....	59
Fig. 29.	Concentration of total suspended solids (TSS) in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> . ....	62
Fig. 30.	Concentration of volatile suspended solids (VSS) in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> . ....	62
Fig. 31.	Concentration of chlorophyll-a in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> . ....	63
Fig. 32.	Concentration of total ammonia-nitrogen (TAN) in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> . ....	63
Fig. 33.	Concentration of nitrite-nitrogen in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> . ....	64
Fig. 34.	Concentration of total nitrate-nitrogen in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> . ....	64
Fig. 35.	Total bacterial counts of five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> . ....	67
Fig. 36.	<i>Vibrio</i> counts of five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> . ....	67
Fig. 37.	Morphology of hemocytes in anticoagulant buffer imaged by phase-contrast light microscopy. GC: Granular cell with conspicuous large granules, HC:	

Hyaline cell with large nucleus and fewer cytoplasmic vesicles. SGC: Semigranular cells showing many cytoplasmic granules characteristically smaller than those of granular cells. .... 69

Fig. 38. Changes of differential haemocyte count from haemolymph of *L. vannamei* reared in biofloc mixed water system. .... 71

Fig. 39. Change of phenoloxidase (PO) activity into haemocyte from *L. vannamei* reared in various biofloc mixed water systems. Each point and bar indicates mean and standard error. Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). .... 71

Fig. 40. Change of protein concentration of haemocyte from *L. vannamei* reared in various biofloc mixed water systems. Each point and bar indicates mean and standard error. .... 72



## List of tables

Table 1. Summary of shrimp farming during last nine years in South Korea .....	5
Table 2. Weekly amount of assorted feed and molasses provided in pond 1 and 2 during the grow-out trial .....	10
Table 3. Summary of selected water quality parameters in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial (mean and range) .....	21
Table 4. Summary of stocking and harvest of <i>L. vannamei</i> in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial .....	26
Table 5. Summary of daily water quality indicators for raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery culture trial with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> (mean value with range) .....	29
Table 6. Summary of stocking and production in four raceway tanks operated with activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> .....	30
Table 7. Summary of water quality indicators for four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trial with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> (mean value with range) .....	39
Table 8. Summary of stocking and production of Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> in four raceway tanks operated with activated suspension method during a 42-day post-nursery culture trial .....	41
Table 9. The total bacterial count in four tanks of white shrimp, <i>L. vannamei</i> under activated suspension method during 42-day post-nursery culture (mean±S.D. CFU/mL) .....	45
Table 10. <i>Vibrio</i> count (mean±S.D. CFU/mL) in four tanks of white shrimp, <i>L. vannamei</i> using activated suspension method for 42-day post-nursery culture. ...	47
Table 11. Identified (17 spp.) and unidentified (18 spp.) bacterial species isolated from biofloc water based on 16S ribosomal RNA sequences .....	50
Table 12. Ratio (%) of bacterial community distributions during 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> in tank 1 under activated	

suspension method .....	53
Table 13. Parameters of water quality during a 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> in tank 1 using activated suspension method .....	53
Table 14. Ratio (%) of bacterial community distributions during 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> in tank 2 using activated suspension method .....	54
Table 15. Parameters of water quality during a 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> in tank 2 using activated suspension method .....	54
Table. 16. Ratio (%) of bacterial community distributions during 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> in tank 3 using activated suspension method .....	55
Table 17. Parameters of water quality during a 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> in tank 3 using activated suspension method .....	55
Table 18. Ratio (%) of bacterial community distributions during 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> in tank 4 using activated suspension method .....	56
Table 19. Parameters of water quality during a 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> in tank 4 using activated suspension method .....	56
Table 20. Summary of growth, FCR and survival rate in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp, <i>L. vannamei</i> .....	58
Table 21. Summary of water quality indicators for five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> (mean value with range) .....	61
Table 22. Total bacterial counts of five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> (mean value based on 15-20 counts	

per tank) ..... 66

Table 23. Total haemocyte count and relative percentages of differential haemocyte count from haemolymph of *L. vannamei* reared in biofloc mixed water system .. 70



## ABSTRACT

Shrimp farming is an important mariculture industry in the west coast of South Korea. However, it has suffered from mass mortality due to disease epizootics and been criticized for coastal pollution due to water discharge from culture ponds. Recently culture of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, introduced to Korea in 2003 has rapidly increased by years. The objective of this study is to develop intensive shrimp culture methods of *L. vannamei* in outdoor ponds and indoor tanks using biofloc technology (BFT) using activated suspension method (ASM) in order to minimize chance of viral transmission from environments, to reduce discharge of waste water to coastal area, to enhance shrimp production and to characterize features of biofloc.

Intensive shrimp culture trial under ASM were conducted in two outdoor HDPE-lined ponds of 550 m<sup>2</sup> in surface area. Two ponds were stocked with *L. vannamei* postlarva of 300/m<sup>2</sup> density and cultured for 91 days. Total production of ponds 1 and 2 were 1,362 kg and 1,282 kg, respectively. Unit production per m<sup>2</sup> of ponds 1 and 2 were 2.48 and 2.33 kg respectively. The performance of this study is about 20-22 times higher than mean cultured shrimp production (0.112 kg/m<sup>2</sup>) of the country and about 8 times higher than normal production (0.3 kg/m<sup>2</sup>) of the traditional ponds which are well managed without any disease outbreak. Adding organic carbon (molasses) to ponds increased carbon/nitrogen (C/N) ratio and was effective developing heterotrophic condition of water. FCR (feed conversion rate) was 1.38 which is about 40% lower than that of traditional pond culture. The low FCR of this study is supposed to be due to well managed feeding strategy and well developed bioflocs as additional diets for shrimp. Final body weight of shrimp at harvest were very low (12.2 to 12.5 g), comparing with that produced by traditional pond method. This result may come from combination of several factors including

comparatively short culture period, high shrimp density and low temperature. Despite activated suspension method throughout culture period, mean concentration of ammonia and nitrite-nitrogen was 0.038 mg/L and 6.0 mg/L respectively, which were maintained below acceptable range of concentration for shrimp growth. The results of this trial suggest that super-intensive shrimp pond culture using biofloc technology using activated suspension method can minimize the viral transmission through water exchange and enhance water quality and shrimp production.

Nursery culture of shrimp larvae has some advantages including increased survival, improved feed efficiencies, enhanced growth performance and reduced grow-out period. For nursery culture in intensive density using ASM, *L. vannamei* postlarvae (PL<sub>3</sub>-PL<sub>10</sub>) with a density of 3,750-9,090/m<sup>3</sup> were stocked in four raceway tanks and cultured for 35 days. Survival was the highest (93.6%) in tank stocked with 4,090/m<sup>3</sup> and was the lowest in tank with 9,090/m<sup>3</sup> (58.1%). Mean body weight at harvest ranged from 0.071 to 0.108 g, and FCR was between 0.59-0.70 in four tanks. Concentration of total ammonia nitrogen (TAN) was increased up to 20 mg/L on 10 days in all tanks and thereafter gradually decreased by the third week of culture. Nitrite-nitrogen was rapidly increased from the third week, representing biofloc condition by developed by nitrifying bacterial community. Of the present nursery system some modification and scaling-up nursery system for commercial scale are needed in order to be implemented to shrimp farmers.

Intermediate culture of juveniles designates culture between nursery and grow-out culture. For intermediate culture in intensive density under ASM nursery-cultured *L. vannamei* juveniles (B.W. 0.08-0.09 g) were stocked with 3,000-5,455/m<sup>3</sup> in density in four raceway tanks (two 12.9 m<sup>2</sup> and two 18 m<sup>2</sup> tanks) and cultured for 42 days with 2.7-3.4% of daily water exchange. Results from four tanks showed FCR of 0.79-1.29, survival of 38.2-48.0%, and yields of

2.49-4.22 kg/m<sup>3</sup> which is 12-20 and 8-14 times higher than those of commercial shrimp hatchery and outdoor pond in Korea, respectively. Concentrations of total ammonia nitrogen (TAN) in four tanks were between 1.11-1.42 mg/L in mean level and did not exceed 6.0 mg/L (0.096 mg/L of NH<sub>3</sub>) which is still acceptable levels for shrimp growth. During the culture trial, concentration of nitrite-nitrogen rapidly increased from stocking, resulting in mean concentration of 18.45-22.07 mg/L. It also exceeded 10 mg/L over four weeks and maintained at 35-45 mg/L for four days in all tanks, accounting for low survival of shrimp due to long-term exposure to high concentration of nitrite-nitrogen. Nevertheless, the results with survival rate over 38% from raceways which experienced the extreme nitrite-nitrogen levels suggests that under "biofloc system" white shrimp can acclimate to high nitrite-nitrogen concentration to some degree.

To identify the changes over time in the cultivable bacterial community ratio in the biofloc of rearing water under ASM, dominance and identification of bacteria were studied from four nursery raceway tanks stocked with *Litopenaeus vannamei* postlarvae at different densities. The total cultivable bacteria counts in the culture medium over the 42 day varied between  $4.13 \times 10^5$  and  $3.73 \times 10^6$  colony forming unit (CFU/mL). Fifty-seven out of the 313 isolated bacteria were selected for 16S rRNA sequencing based on different morphological and biochemical characteristics. Sequencing identified 13 bacterial genera, which were present in all four tanks. Among these 13 genera, *Microbacterium* spp., *Tenacibaculum* sp., *Pseudomonas* spp., *Pseudoalteromonas* sp. and *Vibrio* spp. were the most dominant communities. A better shrimp performance was found in one of these culture tanks (tank 3 with yield of 4.22 kg/m<sup>3</sup> and survival of 54.4%) compared with the other tanks where yields of 4.10, 3.31 and 2.49 kg/m<sup>3</sup> and survival of 38.2, 40.6 and 48.0% were found in tanks 4, 2 and 1, respectively. The nitrite-N was relatively increased (ranged 12-34 mg/L) in all the experimental tanks when compare to other parameters. It suggests that shrimps use biofloc as additional food source and  $\beta$ -glucan and lipopolysaccharide

(LPS), which is components of bacterial cell wall, stimulate immunological activity of shrimp.

To understand the effects of biofloc on the growth and immunological effects of *L. vannamei*, the features of water quality and activity of haemocytes were investigated from shrimp cultured in the different concentration of biofloc water. The number of total haemocyte count (THC) was the lowest in control and Exp.IV (biofloc 25%) groups, which showed  $2.30 \pm 0.25 \times 10^7$ , and  $2.57 \pm 0.25 \times 10^7$  cells/mL respectively, but there was no significant difference between two groups. The number of THC in Exp.III (biofloc 50%) and Exp.II (biofloc 75%) groups was  $3.04 \pm 0.30 \times 10^7$ , and  $2.67 \pm 0.29 \times 10^7$  cells/mL respectively, which was significantly higher than that of control and Exp.IV groups. However, THC of Exp.I (biofloc 100%) was  $1.79 \pm 0.25 \times 10^7$  cells/mL, which is the lowest but no significantly different with control group. In the haemocyte kinds, the percentage that of granular cells (GC) in Exp.I was 35.16% and significantly higher than other groups. The percentage of GC was decreased as the concentration of biofloc was lowered. The percentage of semigranular cells (SGC) in Exp.I group was the lowest (52.89%) and other groups showed significantly higher than Exp.I. However, the percentage of hyaline cells (HC) in control was the highest (32.19%) and that in Exp.I was the lowest (11.95%). The percentage of HC was decreased as the concentration of biofloc was increased. In summary, the percentage of granular cells was increased and that of hyaline cells was decreased with the biofloc concentration of experimental groups. Phenoloxidase (PO) activity in Exp.III was significantly higher than those the other groups and that of in control group was the lowest. In this study, shrimp cultured water mixed with different concentration of biofloc showed high percentage of granular and semigranular cells, and PO activity.

## 서 론

우리나라의 새우양식은 대부분 해안선을 따라 조성된 축제식 양식장에서 준집약적(semi-intensive)으로 이루어지고 있다. 일반적으로 생산된 종묘(postlarva 10~15기)를 5~6월경 축제식 양식장에 입식한 후 9~10월경 수확한다. 일반적으로 약 30~35마리/m<sup>2</sup>의 밀도로 입식하면 3,000kg/ha 내외를 생산할 수 있다.

1990년대 서해안을 중심으로 급속하게 발달한 새우양식은 2001년 3,268톤의 최고양식생산량에 도달한 이후 2004년 2,300여 톤으로 감소하면서 2008년 1,500여 톤으로 최저치였다(Jang and Jun, 2005). 지난 9년간 전국 평균 양식생산량은 1,120kg/ha에 머무르고 있는 실정이다(Table 1, Fig. 1). 양식 생산량의 급격한 감소 추세를 보인 가장 큰 원인으로서는 흰반점바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)에 의한 대량폐사에 기인하고 있다(Heo et al., 2000; Jang et al., 2006, 2007a).

우리나라 새우양식의 주종을 이루었던 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)는 흰반점 바이러스에 대한 감수성이 높아 피해가 더욱 심각하다(Jang et al., 2007b). 특히 2004년에는 전국 468개 양식장 중 32.9%인 154개소가 흰반점바이러스 등에 의한 대량폐사 피해로 수확 시기 전에 양식을 중단하였다(Jang, unpublished data). 더구나 종묘생산을 자연산 모하에 전적으로 의존하고 있는 우리나라의 양식장들은 모하로부터 기인한 바이러스의 수직감염을 근본적으로 해결하기 힘들다. 흰반점 바이러스 감염실태 조사(Jang et al., 2009)에서 보면, 서해안에서 채집된 산란용 모하의 65.6~100%가 흰반점바이러스에 감염되어 있으며, 종묘 역시 조직 mg당 평균  $8.5 \times 10^5$  copies의 높은 농도로 흰반점바이러스에 감염되어 있다.

흰반점바이러스는 1992년 중국에서 최초로 발견(Cai et al., 1995; Chen, 1995)된 이래 1990년대 말까지 아시아, 중남미를 포함한 전 세계로 확산되어 새우양식 산업에 막대한 피해를 가져왔다(Inouye et al., 1994; Takahashi et al., 1994; Chow et al., 1995; Lo et al., 1996a, 1996b; Lighter, 1999; Briggs et al., 2004).

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)는 중남미 태평양연안이 원산지인 아열대성 으로 세계 새우양식 생산량의 70%를 차지 할뿐만 아니라 인위적인 어미새우의 성

숙관리 기술이 개발되어 연중 종묘생산이 가능하다. 특히 다른 양식새우류에 비해 질병내성이 강하고 성장률이 빠르며 바이러스 비감염 무병(specific pathogen free, SPF) 계열이 이미 상업화되어 원산지인 미주 뿐만 아니라 동남아 여러 국가들에서 양식의 주종을 이루고 있다(Briggs et al., 2004; FAO, 2006).

우리나라 새우 양식의 경쟁력 강화를 위해 국립수산물과학원은 2003년 바이러스 비감염 무병(SPF, specific pathogen free) 흰다리새우 어미를 미국 하와이로부터 이식하였다. 이식된 흰다리새우의 국내 양식산업화에 성공함으로써 2009년 국내의 새우양식의 90% 이상을 흰다리새우가 차지하고 있다(unpublished data). 그럼에도 불구하고 흰다리새우 역시 흰반점바이러스에 의한 대량폐사 피해 현상이 나타나고 있다(Kim et al., 2004; Jang, unpublished data).

따라서 기존의 축제식 흰다리새우 양식방법의 문제점과 대량폐사 현상을 방지하기 위해 새로이 도입된 집약적인 사육방법이 활성화유기물 부유 방식(activated suspension method, ASM)이다. ASM 방식은 사료찌꺼기와 배설물 등을 포함한 모든 유기물을 수중에 부유시키는 것인데 고도로 활성화된 타가영양세균(heterotrophic bacteria)은 유기탄소를 에너지원으로 활성화 하여 사육수의 암모니아를 제거한다. 충분히 번식한 타가영양세균은 유기물과 더불어 수많은 세균총(bacterial floc)을 형성하는데 이를 흰다리새우가 추가 먹이원으로 이용(Avnimelech, 1999; Browdy et al., 2001; Burford et al., 2004)하는 시스템으로서 사육수를 최소한으로 교환해주기 때문에 바이러스의 감염과 환경오염 문제를 해결할 수 있는 친환경적인 녹색양식 방법이다(Moss et al., 1998; Bratvold and Browdy, 1999; Lotz and Lightner, 2000; Browdy et al., 2001).

기존의 축제식 양식장은 대규모 환수 시스템이므로 배출되는 부영양화된 배출수는 연안환경을 악화시킬 뿐만 아니라 전염성 질병의 유입 가능성이 높아(Landesman, 1994; Boyd and Clay, 1998), 양식 새우류의 대량폐사를 유발하는 흰반점바이러스를 포함한 병원체들이 사육수 교환을 통해 양식장 내로 쉽게 감염되기 때문에(Brock et al., 1997; Flegel et al., 1997; Lotz and Lightner, 2000) 새우의 대량폐사가 나타나는데 비해, ASM 방식의 경우 흰반점바이러스가 발생하는 지역에서조차 성공적으로 새우를 양식한 사례가 파나마, 벨리즈, 과테말라 등에서 볼 수 있다(Lawrence et al., 2001; McIntosh et al., 1999).

Hopkins et al. (1997)은 0.1 ha의 양식장에서 사육수의 교환 없이 슬러지를 재활용하는 방식으로 10,000 kg/ha의 새우를 생산하였다. 중남미에 위치한 벨리즈의 Belize Aquaculture Ltd. (BAL)에서 활성유기물 부유 방식을 성공적으로 체계화시켜 상업화시켜 조단백질(CP, crude protein) 23~25%의 저단백 사료를 체계적으로 공급하여 평균 15,000 kg/ha의 생산량을 얻었다(McIntosh et al., 1999; McIntochs, 2000). Belize Aquaculture, Ltd 은 Belize Aquaculture, Ltd 에서 적용하고 있는 타가영양방식은 BFT (biofloc technology), EFS (Environmetally friendly system; Sandifer and Hopkins, 1996), MBA (microbial-based aquaculture system; Ebeling and Timmons, 2008), ASM (activated suspension pond method; Avnimelech, 2000) 등 다양한 용어로 알려져 있지만, 기본 원리는 식물플랑크톤이 우점하는 광합성적 자가영양(photoautotrophy) 군집이 차지하는 사육수의 미생물군집을 보다 안정적인 타가영양(heterotrophy) 세균 우점군집으로 전환시키는 것이다(Avinimelech, 1999; McIntosh, 1999). 이는 자가영양세균과는 달리 타가영양세균은 유기탄소(organic carbon)을 이용하여 암모니아를 세균단백질로 직접 동화시키기 때문이다.

타가영양세균의 성장은 자가영양세균에 비해 훨씬 빠르고 암모니아의 제거효율도 매우 높다. 비록 모든 양식장의 사육수에서 영양단계가 완전히 독립된 환경으로 존재하지 않는 혼합영양상태(mixotrophic condition)를 유지하지만, 이들이 우점하는 정도에 따라서 자가 혹은 타가영양상태로 구분한다(Boyd and Clay, 2002; Cohen et al., 2005). 타가영양상태가 잘 조성된 양식장에서는 종묘의 입식 밀도가 기존의 5~10배까지 높아도 수질관리가 잘 이루어져 생산성이 높다(McIntosh, 2000; Browdy et al., 2001).

최근 전통적인 순환여과방식(recirculating aquaculture system, RAS)과는 달리 별도의 생물여과조도 없이 하나의 사육수조에서 이루어지는 ASM방식에 의한 새우의 고밀도 사육기술은 유수식의 문제점들을 해결해주는 새로운 방법으로 인식되면서 연구자들뿐 만 아니라 양식어민들에게서 많은 주목을 받고 있다(Samocho et al., 2000, 2007; Browdy et al., 2001). 이와 같이 ASM 방식에서 세균총을 활성화시키는 양식방법은 새우의 중간육성단계에서 많이 응용되고 있으나 사육수조의 시스템과 관리적인 측면에서 아직도 해결해야 할 문제들이 상존하고 있다. 특히 우리나라에서는 최근 유수식에 의한 중간육성방법이 일부 종묘부화장에서 시도

되었을 뿐 ASM방식은 거의 시도되지 않고 있다. van Wyk (2000, 2001)는 순환여과 방식을 이용하여 흰다리새우의 실내 고밀도 양식에서 중간육성과 본양성의 사이에 2개월간 치하를 중간양성하는 3단계 방식을 채택하여 생산량과 시설 활용도를 크게 향상시킨 바 있다. 중간양성은 중간육성 이후에 사육밀도를 재조정하여 추가적으로 1~2개월 실내에서 양성을 하는 단계(Samocho et al., 2000)로서 고밀도 실내 육상수조식 양식에서 본 양성 이전에 이 과정을 거치기도 한다.

이 연구는 ASM방식을 이용한 실내 고밀도 새우양식의 원리와 고밀도 육상수조식 본양성 기술개발에 필요한 중간양성 과정을 이해하고, 흰다리새우를 대상으로 바이러스질병 피해 예방, 양식생산성의 향상 및 배출수 최소화를 위해 축제식 양식장에서의 활성유기물 부유 방식을 이용한 친환경 고밀도 새우양식 기술 개발, 친환경 초고밀도 실내 중간육성 및 중간양성 기술 개발, 활성유기물 부유 방식 조건에서의 세균학적 특성과 군집변화 및 미생물총(biofloc)이 새우의 성장과 면역효과에 미치는 영향 등을 조사하여 ASM방식을 이용한 실내 고밀도 양식기술의 기초기술을 확립하고자 수행 하였다.

Table 1. Summary of shrimp farming during last nine years in South Korea

Year	No. of farms	Farmed area (ha)	No. stocked larvae (x 10 <sup>3</sup> )	Production (mt)	Unit production (mt/ha)
2000	390	2,223	650,560	2,925	1.32
2001	437	2,605	647,000	3,256	1.25
2002	461	2,563	715,380	2,850	1.11
2003	501	2,556	692,975	2,727	1.07
2004	468	2,332	611,390	2,368	1.02
2005	456	2,310	606,990	1,614	0.7
2006	321	1,208	458,860	1,838	1.52
2007	278	1,482	445,900	1,299	0.87
2008	195	1,126	289,120	1,395	1.24
Mean	390	2,045	568,686	2,252	1.12

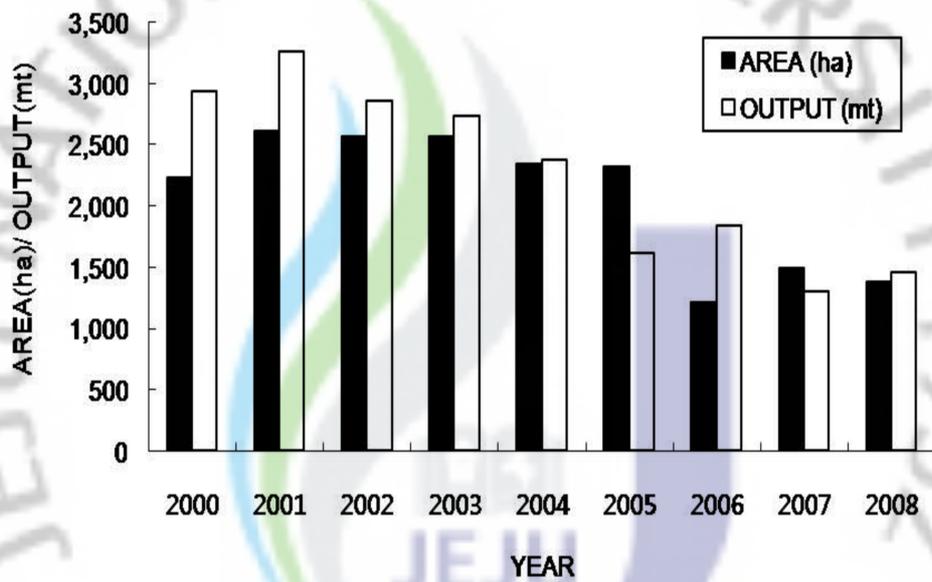


Fig. 1. Shrimp farming area and total cultured shrimp production in South Korea.

## II. 재료 및 방법

### 1. 활성유기물 부유법을 이용한 축제식 고밀도 양식

#### 1) 사육지와 사육수 준비

사육지의 크기는 32.0 × 20.0 m (수면적 30.0 × 18.3 m, 550 m<sup>2</sup>)이며 사육지 바닥과 내벽은 모두 검정색의 HDPE (high density polyethylene) 재질로 포장하였다. Pond 1은 중앙을 따라 격벽을 설치하여 사육수가 순환할 수 있도록 하였으며 사육수 순환과 산소공급을 위하여 pond 1에는 paddle 형 수차(1 HP)와 에어인젝터(1 HP)를 각 1대씩, pond 2에는 바닥에 저층분사식 에어공급관과 에어인젝터를 설치하였다. 에어공급관은 polyethylene 재질의 관에 30 cm 간격으로 구멍(∅2 mm)을 뚫어 공기가 사육지 바닥으로부터 분사될 수 있도록 4열로 배치하였다(Fig. 2). 사육수는 여과해수를 염소소독(염소 유효농도 20 mg/L)한 후 충분한 시간을 두고 시비를 하여 종묘입식 전까지 식물플랑크톤을 번식시켰다. 사료의 공급량을 판단하기 위하여 각 사육지별 2개의 먹이망(feeding tray, 50 × 50 cm)을 설치하였다.

#### 2) 종묘입식과 사육관리

2007년 7월 10일 서해특성화센터에서 생산된 PL<sub>15</sub>의 흰다리새우(*L. vannamei*) 유생(B.W. 0.0015g)을 각 사육지별 150,000마리(300/m<sup>2</sup>)씩 입식하여 10월 8일까지 91일간 사육하였다. 사료는 새우용 EP 사료(crude protein 38%)를 4회/일 공급하였으며, 사료공급량은 주간성장률 및 먹이망의 조사결과에 근거하여 산출하였다. 주간 사료공급량 및 사료 단백질로부터 발생하는 암모니아성질소 제거를 목적으로 유기탄소원으로 공급한 당밀의 주간 공급량은 Table 2와 같다.

주간성장률(weekly growth rate, WGR)은 매주 50-100마리의 새우를 채집하여 평균 체중을 계산하였다. 사육수는 식물플랑크톤의 과잉번식과 영양염 농도의 급증 시 일부를 교환한 것을 제외하면 전 과정에 교환을 하지 않았으며 평균 교환율은 0.1%/day를 유지하였다.

### 3) 수질환경 측정

수온, DO, 염분은 YSI-85 model (Yellow Springs Instrument Co., Ohio, USA)을 이용, TAN, NO<sub>2</sub>-N, 알칼리도(alkalinity)는 영양염 분석용 calorimetric kit (Merck Co., Germany), pH는 YSI-6600 pH meter를 이용하여 매일 1-3회 측정하였다.



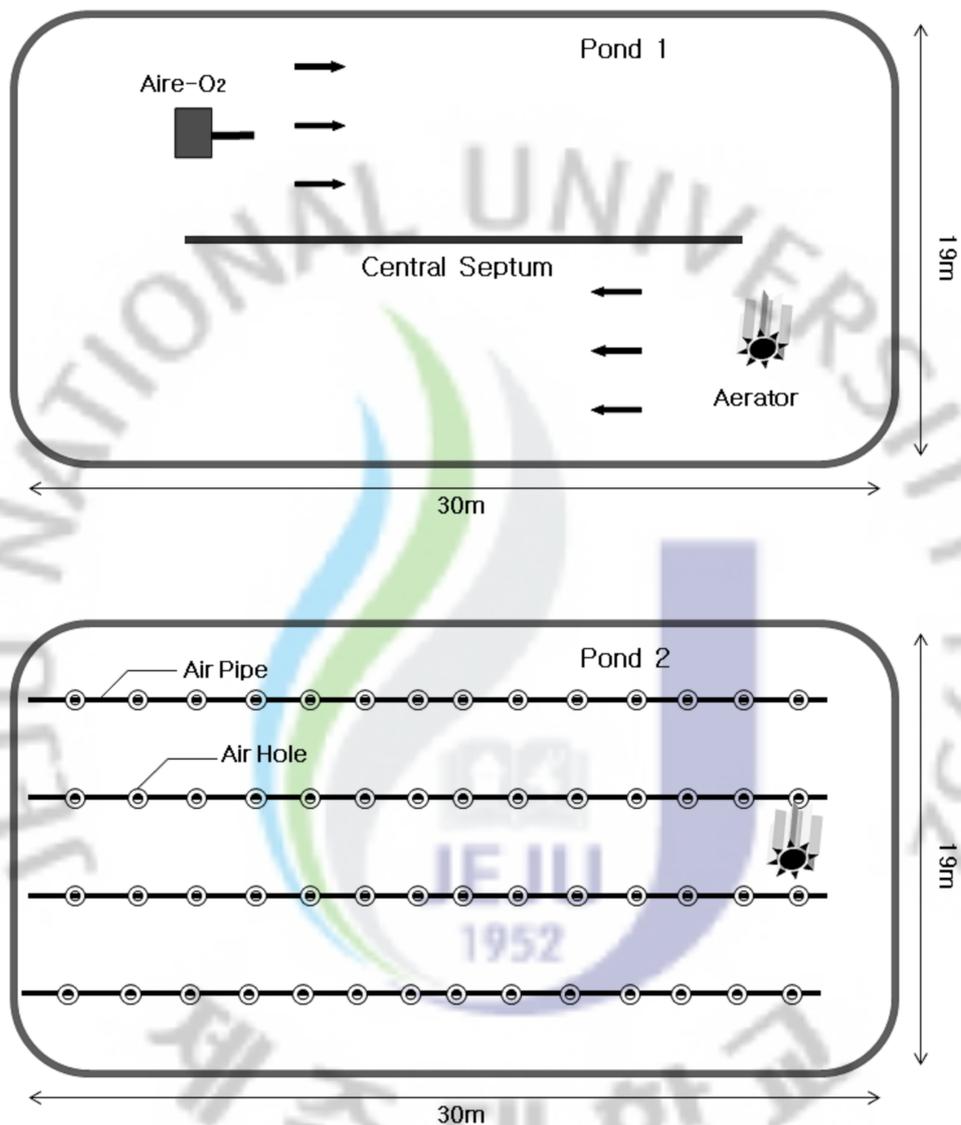


Fig. 2. Layouts of the HDPE-lined raceway (Pond 1) and HDPE-lined PDP (pressuredifferential pipe controlled release bottom aeration) system (Pond 2).

Table 2. Weekly amount of assorted feed and molasses provided in pond 1 and 2 during the grow-out trial

Week	Feed*/week (kg)		Molasses**/week (kg)		C/N Ratio***	
	Pond 1	Pond 2	Pond 1	Pond 2	Pond 1	Pond 2
1	2.0	2.0	-	-	9.0	9.0
2	24.3	24.3	27.8	-	13.9	9.0
3	61.5	49.5	83.4	27.8	14.8	11.4
4	64.7	61.2	139.0	83.4	18.2	14.8
5	150.5	133.5	125.1	97.3	12.6	12.1
6	168.0	158.0	166.8	125.1	13.3	12.4
7	246.0	215.0	69.5	69.5	10.2	22.9
8	220.0	221.0	69.5	69.5	10.4	10.3
9	204.0	204.0	-	-	9.0	9.0
10	197.5	197.5	125.1	125.1	11.7	11.7

\* The C/N ratio of assorted feed provided was 9.0.

\*\* The carbon content of molasses was 24%.

\*\*\* The values were calculated based on weekly amounts of feed and molasses provided.

## 2. 활성유기물 부유법에 의한 고밀도 중간육성 및 중간양성

### 1) 사육수조 및 부속시설

수조의 수면적은 각각 12.9 m<sup>2</sup> (L6.0 x W2.15 x H1.0 m; tanks 1, 2) 및 18 m<sup>2</sup> (L6.0 x W3.0 x H1.0 m; tanks 3, 4)인 raceway 형 콘크리트 수조이다. 각 수조의 중앙을 따라 격벽(L4.0 x H1.0 m)을 설치하고 격벽의 양측 아래를 따라서 30 cm 간격으로 water injector (∅ 20 mm)가 부착된 PVC관(∅ 50 mm)을 설치하였다 (Fig. 3). 수조의 한쪽 끝에는 venturi 및 수중모터 (0.5 HP)가 부착된 별도의 PVC관을 설치하고 이 관은 water injector관의 한쪽 끝에 연결하여 사육수를 공기와 함께 혼합하여 분출되게 함으로써 사육수가 수조 내에서만 순환하도록 만들었다. 이와 별도로 수조 내에 PVC관 (∅ 50 mm)을 설치하고 자체 제작한 foam fractionator와 연결하였으며 사육수를 흡입하는 PVC관의 말단은 새우가 들어가지 못하도록 새우의 성장에 따라서 망목이 다른 여과망을 부착하였다. 수조의 중간에는 PVC관(∅ 200 mm)과 에어스톤으로 구성된 air lift를 4조 설치하여 침전물의 부상과 사육수의 원만한 순환을 유지하였다. 수시로 사육 중간에 수조의 저면을 조사하여 침전물이 모이는 곳에는 에어스톤을 설치하여 슬러지가 침전되지 않도록 하였다. 추가적인 산소공급을 위하여 oxygen generator (RAK - 15L90C2, Oxycon Industrial Ltd., Korea)를 설치하였다. 수조의 전체적인 배관 구조는 Samocha et al. (2002)을 참고하였다.

### 2) 사육수 관리

사육수 준비를 위하여 종묘입식 2주전 여과해수를 취수한 후 염소 50 mg/L의 농도로 소독, 중화시킨 후 1~3 x 10<sup>5</sup> cell/mL의 농도로 규조 (*Chaetoceros* spp.)를 넣고 소량의 새우 초기유생사료와 당밀을 공급하여 사육수를 안정화시켰다. 종묘입식 후에는 모든 수조에서 수온, DO, 염분은 YSI-85 model (Yellow Springs Instrument Co., Ohio, USA)을 이용, TAN, NO<sub>2</sub>-N, 알칼리도(alkalinity)는 영양염 분석용 calorimetric kit (Merck Co., Germany), 탁도(turbidity)는 Micro TPW 20000 turbidimeter (HF Scientific Inc., Florida, USA), pH는 YSI pH meter를 이용하여 매일 1-3회 측정하였다. 사육수의 환수량 및 당밀공급량은 사육기간 이루어진 총량을 일일 평균으로 계산하였다. 흰다리새우의 성장에 적합한 수온은 보일러(70,000

Kcal/hr)를 이용하여 가온을 실시하였다.

중간양성에 사용된 사육수는 여과해수(75%)를 염소 50 mg/L 소독 후 유생의 중간육성에 사용되었던 사육수(25%)를 혼합함으로써 타가영양세균의 발달을 용이하도록 하였다.

### 3) 종묘입식 및 사육관리

**중간육성:** 새우종묘는 미국 하와이산 무병(SPF) 어미 흰다리새우를 이용하여 국립수산물과학원 서해특성화센터에서 생산된 postlarva (PL<sub>3</sub>-PL<sub>10</sub>)를 사용하였다. 2007년 6월 10일 tank 1과 2에는 평균체중 0.009 g의 유생을 각각 30,000마리(3,750/m<sup>3</sup>), 60,000마리(7,500/m<sup>3</sup>), tank 3과 4에는 유생을 각각 45,000마리(4,090/m<sup>3</sup>), 100,000마리(9,090/m<sup>3</sup>)의 밀도로 입식한 후 35일간 사육하였다. 사료는 초기 1주일 은 새우유생용 미립자사료 (Frippak, INVE Ltd., Belgium) 및 알테미아를 혼합 공급하였으며 이후부터는 크럼블 배합사료 (Ø0.1-0.4mm; Purina Co., Korea)를 공급하였다. 배합사료는 수조별 4개씩 설치된 먹이망(20 x 30 cm)에만 4회/일 공급하였다. 사료공급량은 새우의 주간성장률에 근거하여 새우 체중의 2-5%를 공급하였으며 주간성장율은 매주 30-50마리의 새우를 채집하여 평균체중을 계산하였다.

**중간양성:** 중간육성한 치하(B.W. 0.08-0.09 g)를 이용하였다. 사육은 2007년 7월 16일부터 8월 27일까지 42일간 실시하였으며, tank 1과 2에는 평균체중 0.09 g의 치하를 각각 24,000마리(3,000/m<sup>3</sup>), 45,000마리(5,625/m<sup>3</sup>), tank 3과 4에는 평균체중 0.08 g의 치하를 각각 42,000마리(3,818/m<sup>3</sup>), 60,000마리(5,455/m<sup>3</sup>)의 밀도로 입식하였다. 사료는 치하용 배합사료(CP 40%, Ø 0.9-1.1 mm; Purina Co., Korea)를 공급하였다. 사료공급 방법 및 공급량은 중간육성과 동일하다.

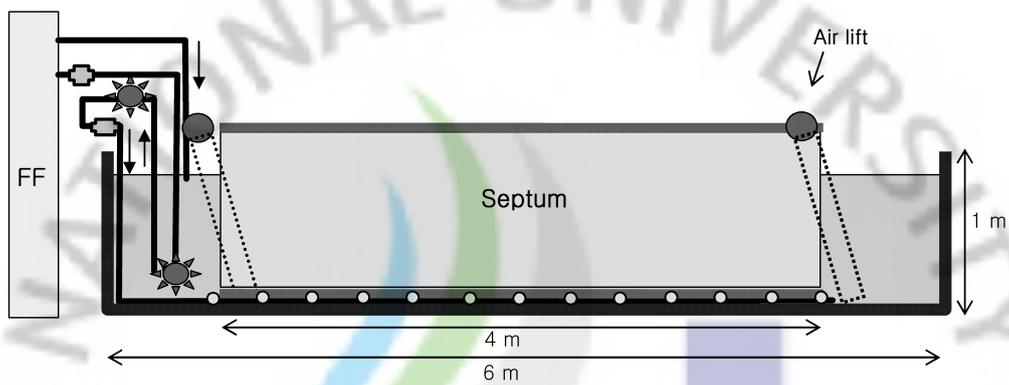


Fig. 3. Side view of raceway tank for *L. vannamei* nursery culture under activated suspension method.

### 3. 활성유기물 부유법에 의한 사육수의 세균학적 특성

#### 1) 실험수조

새우의 사육실험은 국립수산물과학원 서해특성화연구센터에서 42일에 걸쳐 실시되었다. 사육수조는 실내에 시설된 4개의 raceway 형 사각 콘크리트 수조로서 중간육성 실험에 사용된 것과 동일하며 그 외의 사육방법과 재료도 중간육성 실험과 동일하다.

#### 2) 세균계수

사육수의 총세균수는 4개의 수조에서 사육시작 0, 15, 30, 42일에 계수하였다. 사육수는 1% 멸균식염수를 첨가하여  $10^{-1}$ - $10^{-5}$ 까지 dilution 하였으며 각 50  $\mu$ L를 marine agar plate (Difco 2216, Detroit, MI, USA)에 도말하였다. 각 serial dilution마다 3개의 duplicate를 만들었으며, plate는  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 2-7일간 배양하여 계수하였다. *Vibrio* 수는 총세균수와 동일한 방법을 이용하여 TCBS (thiosulphate citrate bile salts sucrose agar) 배지에 도말한 후  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 24hr 배양하여 계수 하였다.

#### 3) 세균동정

Bacterial isolates는 30-100 colonies가 있는 marine agar로부터 분리되었으며, 몇 번의 재접종 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다 (Gilliland, Busta, Brinda & Campbell 1976). 별도의 isolate는 20% glycerol stock으로 만들어  $-85^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. Pure isolates는 Holt (1984)의 방법에 따라 colony morphology, color, gram staining, and standard biochemical tests 등을 통하여 동정하였다. 감수성은 O/129 discs (150  $\mu\text{g}$ )- 0.9% NaCl plate를 포함한 nutrient agar에서 24 hr 배양하여 조사 하였다.

#### 4) 16S rRNA 염기서열 분석

313개의 colony 중 형태적으로 구분되는 57개 colony로부터 genomic DNA를 분리하여 16s rRNA 염기서열을 분석하였다.

Primers는 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R 5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' 및 518 F 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3', 800R 5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'를 사용 하였으며 sequencing은 Macrogen Inc.(South

Korea)에서 수행 하였다.

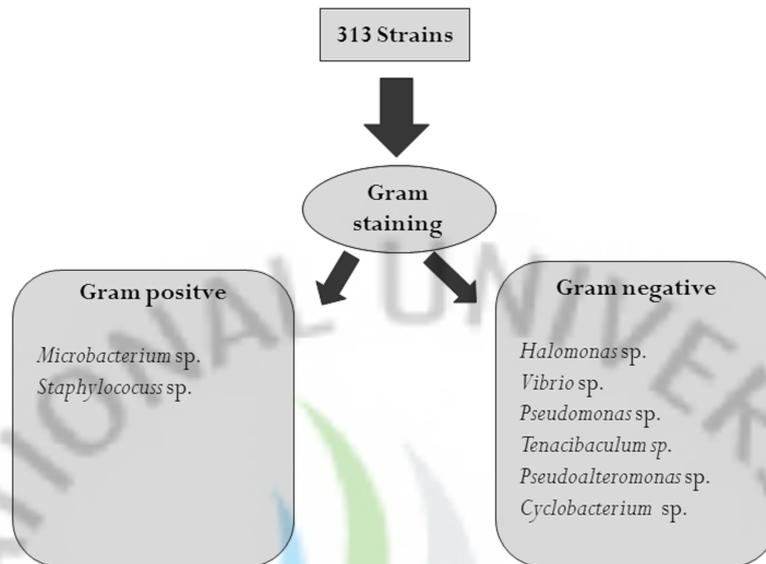


Fig. 4. Bacteria identified from the raceway tanks.

16S rRNA 염기서열 분석 및 phylogenetic tree 작성을 통해 얻어진 각 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (McGinnis and Madden, 2004)를 이용하여 분석하였다. 각 염기서열의 alignment와 phylogenetic 분석은 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 (Tamura et al., 2007)를 이용하여 수행 하였다. 최종 얻어진 16S rRNA의 aligned nucleotide position은 neighbor-joining (NJ) method (Saitou & Nei, 1987)을 이용하여 phylogenetic tree를 작성 하였다. Phylogenetic tree는 각 분화시기 (evolutionary distance)를 추정할 수 있는 단위에 따라서 만들었으며 분화시기의 추정은 Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2004)에 근거하여 계산 하였다.

##### 5) 통계 및 데이터 처리

모든 총세균수와 *Vibrio* 수의 통계처리는 one way analysis of variance (ANOVA) 처리 및 SPSS (V. 7.5 11 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 각 기간별 미생물의 우점종 분석은 형태-생화학적 특성 및 16s rRNA 염기서열에 근거하여 genus 수준에서 구분하였으며, 16s rRNA sequence는 NCBI의 Genbank에 등록 (accession numbers EU419888-EU419944) 하였다.



#### 4. 활성유기물 부유법의 사육수가 새우의 성장과 면역효과에 미치는 영향

##### 1) 사육 수조 및 사육 조건

실험에 사용된 사육수조는 190L의 FRP 원형수조(유효수량 150L)로서 내부에는 먹이망과 배수구 및 에어스톤을 설치하였다. 실험구별 사육수는 별도의 저수조(1.75m<sup>3</sup>)에 저장하여 이용하였다. 모든 실험수조 및 저수조는 분리된 사육실에 배치하고 수온은 실내항온장치로 조절하였으며 실험기간은 2009년 6월 8일부터 8월 10일까지 63일간이었다.

##### 2) 사육수의 준비 및 실험구

실험구는 서해특성화연구센터의 그린하우스 내에 시설된 ASM 방식에 의한 실내 고밀도 새우양식장의 biofloc 사육수를 이용하여 5개의 농도로 구분하여 사용하였다. 희석용 해수 및 대조구(control group)의 사육수는 1 um로 여과 후 오존소독 사용 하였으며, 오존소독수는 여과해수를 10분 이상 오존처리 한 후 24시간 이상 폭기하여 사용하였다(20 g/min; Model PC 58, Hanchang Co., Korea). 실험구는 아래와 같으며 각 각 3반복으로 하였다.

- Exp. I : Biofloc water 100%
- Exp. II : Biofloc water 75%, clean water 25%
- Exp. III : Biofloc water 50%, clean water 50%
- Exp. IV : Biofloc water 25%, clean water 75%
- Control : Clear water 100%

모든 실험용 사육수는 매일 5개의 저수조에 새로 준비하여 다음날 오전 09:00에 사육수 50%가 교환 되도록 공급하였다.

##### 3) 생물사육 및 사료공급 관리

실험시작 시 새우의 체중은 1.60 g이며 수조 별 60마리를 수용하였다. 사료는 매일 3회(07:00, 13:00, 18:00) 먹이망에 공급하였다. 먹이망은 직경 500 mm, 높이 100 mm의 PVC 재질의 원통형으로 먹이망의 저면에는 0.2 mm의 여과망을 부착하여 잔량의 사료를 수거할 수 있도록 제작하였다. 잔량의 사료는 다음날 06:00

에 회수하여 그늘에서 4시간 이상 방치한 후 70°C incubator에서 12시간 완전히 건조하여 전자저울에서 측정하였다.

#### 4) 수질환경 조사

일간 조사항목은 수온, 염분, pH, 용존산소(DO)이며, TSS (total suspended solids), VSS (volatile suspended solids), chlorophyll-a, TAN, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N는 주 2회 측정하였다. Unculturable bacteria와 Vibrio는 주 1회 계수하였다.

#### 5) 총세균 계수

총세균은 DAPI 형광염색법을 사용하여 unculturable bacteria까지 계수하였다. 각 실험구별 사육수 샘플은 15-20회씩 계수하여 평균값을 산출하였다.

DAPI 형광염색 과정은 1) 1.5 ml e-tube에 sample 1 ml, formalin (25uL/ml), DAPI (75 uL/ml)를 넣고 vortex 한 후, 2) Tube는 15분간 암실에서 염색한 후 염색된 sample tube를 25 ml filter set, 2 um black polycarbonate membrane filter (Whatman, USA)를 이용하여 filtering하였다. 3) Membrane filter을 암실에서 10분간 건조한 후 immersion oil을 떨어뜨린 slide glass에 Membrane filter를 얹고, cover glass를 덮은 후 제작된 slide을 형광현미경으로 관찰하였다.

#### 총세균 환산계수

mL당 세균수(N) = A × (F.A ÷ O.A) ÷ 여과한 샘플(mL)

※ A, 세균수; F.A., 여과한 면적; O.A., 관찰한 면적

예) 25mL 여과망의 지름은 16mm 이므로

$$F.A. = 8 \times 8 \times \pi \text{ mm}^2 = 200.96 \text{ mm}^2$$

$$O.A. = 0.01 \text{ mm}^2$$

따라서 샘플 1 mL를 여과 한 경우 세균수(A) = A × 20096 (cells/mL)

#### 6) 혈구분석

혈림프(haemolymph)는 1 ml syringe (26 gauge)를 이용하여 위심강으로 부터 채혈하였다. 채혈 전에 혈림프의 응고를 막기 위해 미리 syringe내에 L-15 medium 400 μl를 넣어서 채혈하였으며, 채혈 양은 100 μl로 일정하게 하였다. 5배로 희

석된 혈림프로부터 10  $\mu$ l를 각각의 hemacytometer에 넣어 전체 혈구 수를 계산하였다. Haemocyte형태(Fig. 37)를 granular cell (GC), semigranular cell (SGC) 그리고 hyaline cell (HC)로 3가지로 구분하여 각 혈구 종류에 따라 혈구를 계산하였다.

#### 7) 혈구 확보

PO 활성을 조사하기 위한 혈구의 확보는 다음과 같이 수행하였다. Haemolymph는 1 ml syringe를 이용하여 각 새우 개체의 위심강으로 부터 채혈하였다. 채혈 전에는 미리 syringe내에 anticoagulant buffer (NaCl 62 mM, glucose 100 mM, EDTA 10 mM, trisodium citrate 30 mM, citric acid 26 mM, pH 7.0) 400  $\mu$ l를 넣어서 haemolymph의 응고를 방지하였고, 채혈 후 즉시 1,300 g, 4 $^{\circ}$ C, 10분 조건으로 원심 분리하여 haemocyte를 분리하였다. Rinse buffer (sodium cacodyllate 10 mM, sucrose 250 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7.0)로 두 번 세척한 후, PO activity 측정 전 까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

#### 8) 면역활성 측정

PO활성 측정과정은 haemolymph로부터 얻어진 haemocyte pellet을 4개체씩 pooling하였다. Homogenize buffer (HB, sodium cacodylate 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7.0)를 넣어 haemocyte를 마쇄한 후, 원심 분리하여 총 1 ml의 HB로 부터 얻어진 haemocyte lysate superant (HLS)을 실험용 HLS로 사용하였다. Microwell plate에 HLS 100  $\mu$ l와 50  $\mu$ l의 trypsin을 첨가하고 BKG에는 trypsin대신에 HB를 50  $\mu$ l첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양 후 L-DOPA (L-dihydroxy phenylalanine)을 50  $\mu$ l첨가하고 다시 10분간 배양한 후에 HB를 첨가하여 dopachrome의 생성을 490 nm에서 흡광도를 측정하여, PO activity를 계산 하였다.

### III. 결 과

#### 1. 활성유기물 부유법을 이용한 축제식 고밀도 양식

##### 1) 수질환경 변화

평균 수온은 pond 1과 2가 모두 25.3℃ (range 19.0-30.9℃)였으며, 용존산소(DO) 농도는 pond 1이 평균 5.81 mg/L (3.84-7.49 mg/L), pond 2가 5.75 mg/L (3.36-7.17 mg/L)이었다(Table 3). DO의 경우, 수온이 상승하는 7월말부터 4.0 mg/L 이하로 떨어지기 시작하여 야간에는 액화산소를 공급 하였다. 염분농도는 pond 1과 2가 각각 25.3 psu (평균 21.8-28.1 psu), 25.6 psu (평균 22.2-28.5 psu)을 보였는데, 장마철인 7월 중순부터 점차 낮아져서 7월 말을 최하점으로 이후에는 점차 상승하였다(Fig. 5). pH는 초기 1개월간 지속적으로 떨어진 이후 8월부터는 7.0-7.5 범위를 유지하였으나, pond 1과 2가 각각 평균 7.44, 7.43으로 전체적으로 새우의 성장적합 범위를 크게 벗어나지는 않았다(Figs. 6-7).

TAN은 7월 하순부터 상승하기 시작하여 8월 동안 5.0-10.0 mg/L의 높은 농도를 계속 유지한 이후 9월 초순에 5 mg/L 이하로 유지되었다. Pond 1과 2에서의 TAN 농도는 각각 2.70, 2.43 mg/L으로 큰 차이는 없으나 일반 축제식양식장에 비해 높았다(Fig. 8). 아질산염(NO<sub>2</sub>-N) 농도는 8월 25일 전후하여 급격하게 상승하기 시작하여 9월 초순에는 24.0 mg/L까지 올라간 이후 점차 낮아지는 경향이 있었다(Fig. 9). 아질산염의 증가 패턴은 TAN 농도 증가보다 약 1-2주 이후 지연되었다. 알칼리도(alkalinity)는 pond 1과 2에서 거의 차이가 없으며, 평균 125 mg/L을 유지하여 새우의 성장에 적합하였다(Table 3). 사육수는 8월 말경 식물플랑크톤의 과잉번식과 수질악화로 일부 교환을 하였으며 전체 평균 환수율은 0.1%/day 이하였다.

Table 3. Summary of selected water quality parameters in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial (mean and range)

	W.T (C)	DO (mg/L)	Salinity (psu)	pH	TAN (mg/L)	NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	Alkalinity (mg/L)	Water exchange (%/day)
Pond 1	25.3 (19.0-30.9)	5.81 (3.84-7.49)	25.3 (21.8-28.1)	7.44 (7.15-8.23)	2.7 (0-10.0)	6.0 (0-21.0)	126 (95-170)	<0.1
Pond 2	25.3 (19.8-30.7)	5.75 (3.36-7.17)	25.6 (22.2-28.5)	7.43 (7.01-8.19)	2.43 (0-10.0)	5.3 (0-24.0)	125 (95-170)	<0.1

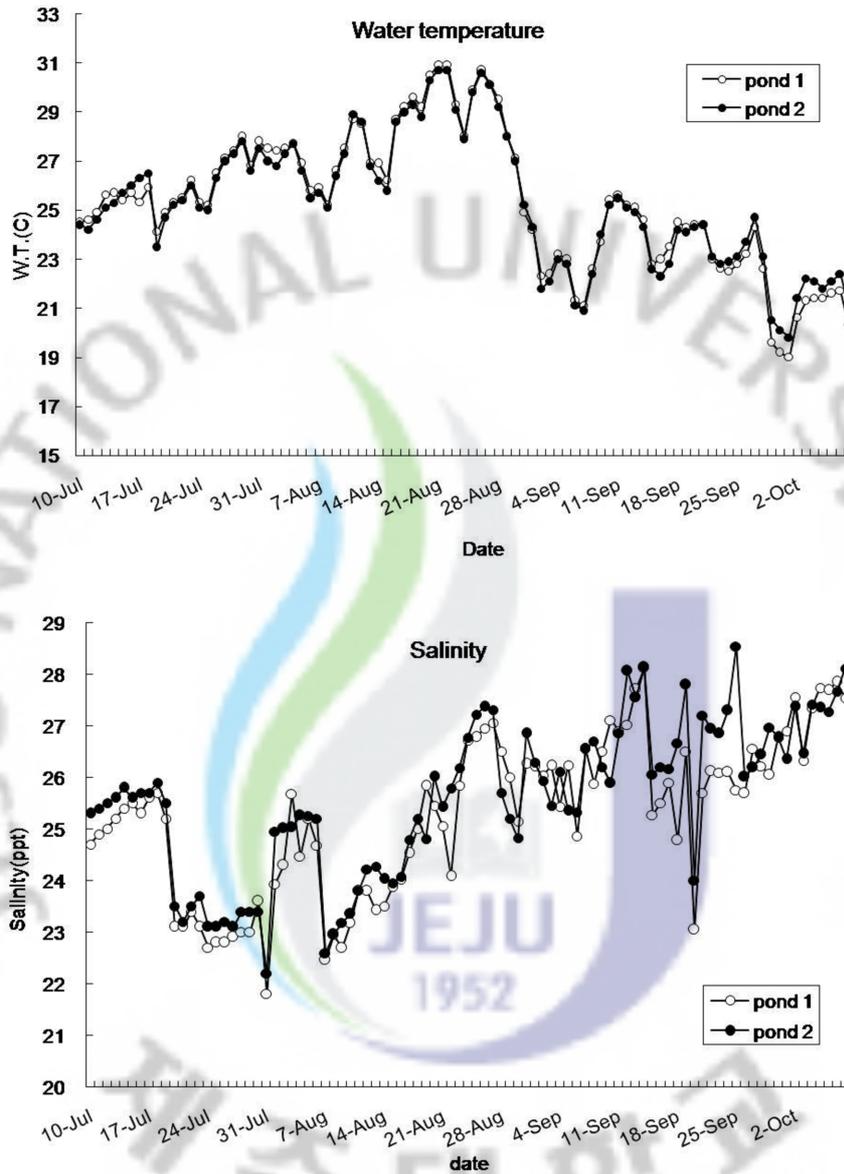


Fig. 5. Change of water temperature and salinity in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial.

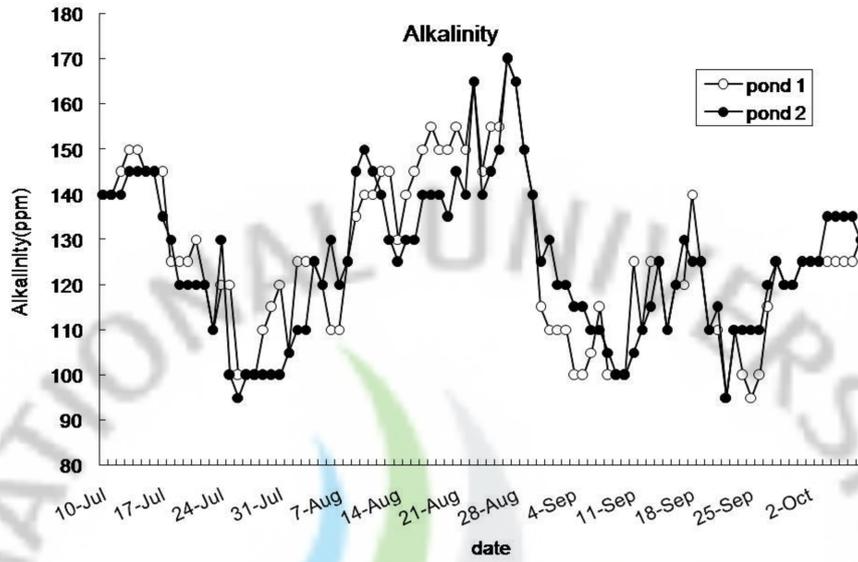


Fig. 6. Change of alkalinity in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial.

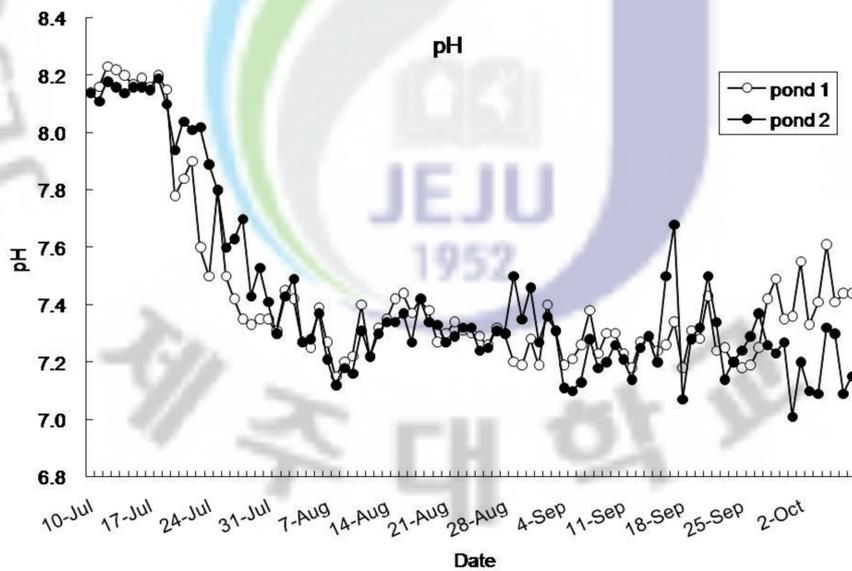


Fig. 7. Change of pH in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial.

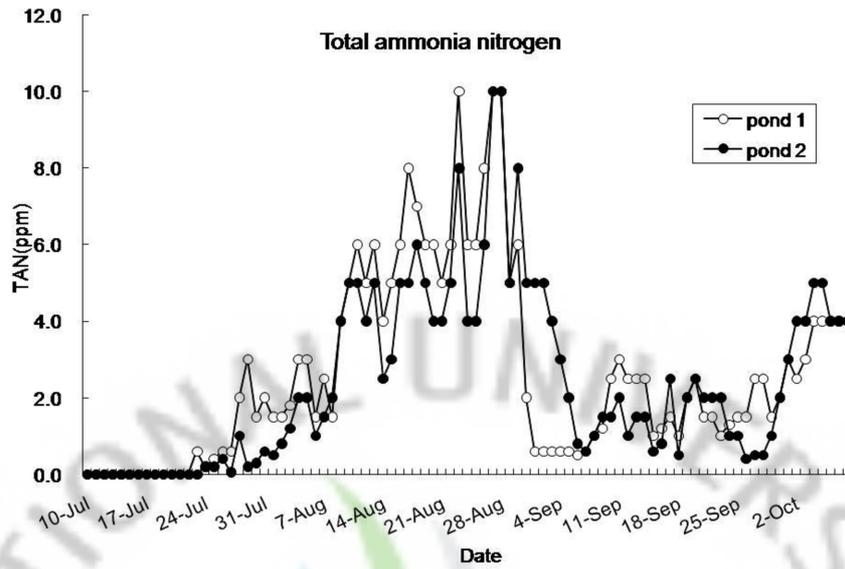


Fig. 8. Change of total ammonia nitrogen (TAN) in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial.

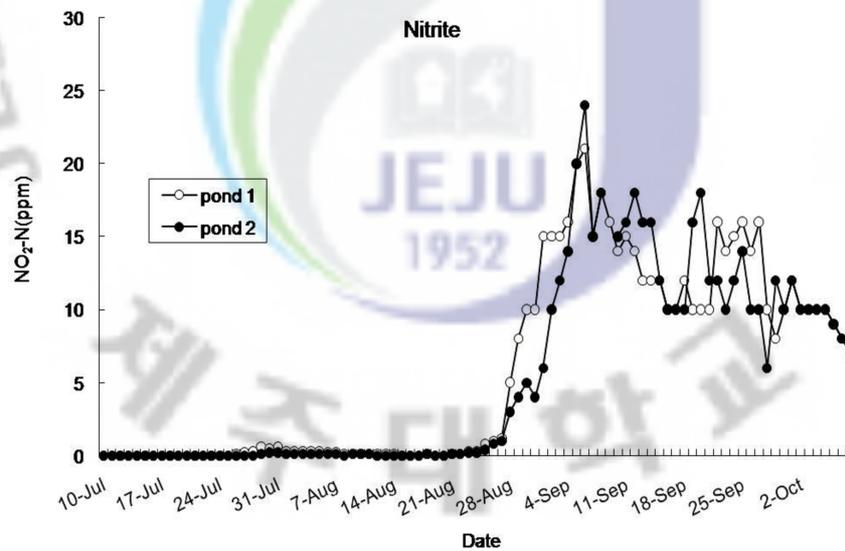


Fig. 9. Change of nitrite-nitrogen in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial.

## 2. 새우의 성장률과 생존율

9월 말경부터 사육수의 수온이 20℃ 이하로 하강한 관계로 10월 2일, 사육 91일만에 새우를 수확하였다. 생산량은 pond 1과 2가 각각 1,362, 1,282 kg으로 단위면적당 생산량은 각각 2.48, 2.33 kg/m<sup>2</sup>이었다. 생존율은 pond 1과 2가 각각 72.6, 70.1%이며, 수확시 새우의 평균체중은 Pond 1이 12.5 g, Pond 2가 12.2 g이었다(Table 4, Fig. 10). FCR (feed conversion rate)은 1.38-1.39이었다. 평균 주간성장률은 pond 1과 2가 각각 0.960, 0.937 g/week로 비슷 하였다. 체중이 2 g을 넘어서는 사육 6주 (8월 20일)까지는 주간성장률은 1.0 g 이하였으나 7주째에는 이후부터는 pond 1과 2가 각각 2.29, 2.33 g에 달했으며 이후에도 주간 성장률은 약 1.0 g 이었다.



Table 4. Summary of stocking and harvest of *L. vannamei* in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial

Stocking		culture period			Harvest				
B.W. (g)	Total No	density (/m <sup>2</sup> )	culture period (days)	B.W. (g)	total yield (kg)	production (kg/m <sup>2</sup> )	survival (%)	FCR	
Pond 1	0.0015	150,000	300	91	12.5	1,362	2.48	72.6	1.39
Pond 2	0.0015	150,000	300	91	12.2	1,282	2.33	70.1	1.38

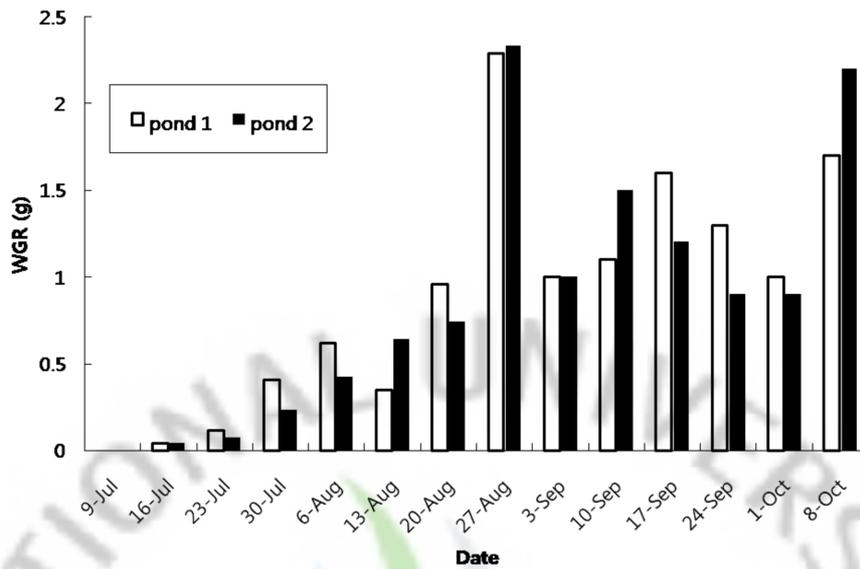


Fig. 10. Weekly growth rate of *L. vannamei* in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial.

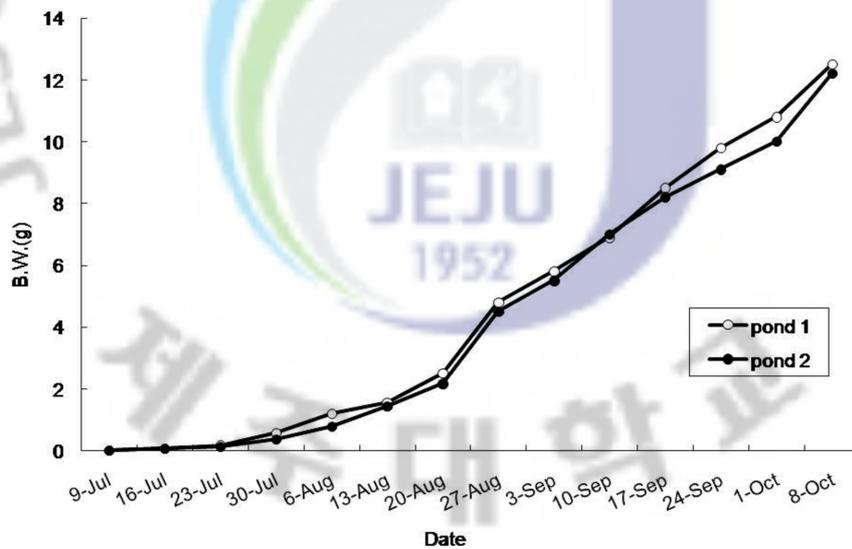


Fig. 11. Changes of mean body weight of *L. vannamei* in ponds 1 and 2 during a 91-day grow-out trial.

## 2. 활성유기물 부유법에 의한 고밀도 중간육성 및 중간양성

### 1) 중간육성

#### (1) 사육수의 수질 및 영양염 변화

중간육성에 따른 사육수의 수질요소 및 영양염 등의 변화(Table 5)에서 수온은 사육 초기 24℃이었으나 점차 가온하여 6일째에는 전 수조가 약 29℃로 상승하였으며 사육기간 동안 평균 28.7-29.3℃를 유지하였다(Fig. 12). 용존산소(DO)는 실험 2주까지는 4.0-6.0 mg/L이 었으나 2주 후부터는 대부분 6.0 mg/L 이상 이었다. 전 기간 DO의 평균 농도는 5.76-6.19 mg/L으로 흰다리새우 최소요구량인 3.0 mg/L에 비해 비교적 높게 유지되었다(Fig. 13). 염분은 모든 수조에서 32.4-35.0 psu 였다(Table 5). pH는 모든 수조에서 1주일째 일시적으로 7.5 전후까지 하강한 후 다시 상승하여 8.0 이상을 유지하였으나 2주 이후 점차 하강하였다. 전 기간 pH의 범위는 7.2-8.5로서 수조별 평균 7.8-7.9였다(Fig. 15). 알칼리도(alkalinity)는 전 기간 140 mg/L 이상을 유지하였으며 수조별 평균 147-157 mg/L으로 큰 차이는 없었다. 탁도(turbidity)는 16 일째부터 측정하였으며 수조별 평균 19.17-25.49 NTU로서 큰 차이는 없었다. 총암모니아성 질소(TAN)는 실험 6일째까지 모든 수조에서 4.0-6.0 mg/L의 농도 였으나 10 일째 모든 수조가 20.0 mg/L까지 상승한 후 점차 감소하여 14일째는 거의 0.1 mg/L 까지 떨어졌다. 이후 TAN 농도는 수조별 상당한 변화를 보인 후 3주 이후로는 3.0 mg/L 이하로 유지되었다. TAN의 수조별 평균 농도는 3.32-4.52 mg/L으로 비슷한 농도였다. 사육 2주째까지 아질산염(NO<sub>2</sub>-N)의 농도는 전 수조에서 1.0 mg/L 이하를 유지하였으나 이후 점차 크게 증가하였다. Tank 2의 경우 23일째 30 mg/L까지 증가한 이후 23-26일의 일시적인 감소를 제외하고는 대부분 25 mg/L 이상 이었으며 3주 이후에는 나머지 수조들에서도 대부분 10 mg/L 이상 이었다. 아질산염의 평균 농도는 tank 2가 10.94 mg/L으로 가장 높았으며 나머지 수조들에서도 6.47-7.21 mg/L의 높은 농도였다(Fig. 16). 평균 일일 환수량은 tank 4, 1이 각각 1.55, 1.51 %/day로서 가장 높았으며 tank 2, 3이 각각 1.01, 0.88% 이었다. 당밀은 tank 1, 2에는 0.13 L/일, tank 3, 4에는 0.09 L/일 을 공급하였다.

Table 5. Summary of daily water quality indicators for raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery culture trial with Pacific white shrimp, *L. vannamei* (mean value with range)

	Water Temp. (°C)	DO (mg/L)	Salinity (psu)	pH	Alkalinity (mg/L)	Turbidity (NTU)	TAN (mg/L)	NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	Water exchange (%/day)	Molasses (L/day)
Tank 1	29.30 (24.1-30.5)	6.01 (4.0-11.0)	33.58 (33.0-34.6)	7.76 (7.2-8.2)	157 (140-175)	19.17 (5.7-34.3)	4.19 (0.1-20.0)	6.37 (0.0-20.0)	1.51	0.13
Tank 2	29.05 (24.7-30.6)	6.19 (4.2-9.9)	33.96 (33.3-35.0)	7.75 (7.2-8.3)	156 (140-175)	25.49 (7.4-54.0)	4.52 (0.1-20.0)	10.94 (0-32.0)	1.01	0.13
Tank 3	28.77 (24.6-30.5)	5.76 (4.2-8.9)	33.90 (32.6-35.0)	7.91 (7.3-8.5)	147 (140-150)	23.14 (6.9-37.6)	3.32 (0.1-20.0)	7.21 (0-27.0)	0.88	0.09
Tank 4	28.87 (24.8-30.6)	6.06 (4.2-8.8)	33.39 (32.4-34.2)	7.85 (7.5-8.2)	147 (140-150)	21.84 (9.8-37.3)	3.42 (0.1-20.0)	6.47 (0-24.0)	1.55	0.09

Table 6. Summary of stocking and production in four raceway tanks operated with activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, *L. vannamei*

	Stocking density		Final B.W.(g)		Yield		WGR* (g/w)	Survival rate(%)	FCR
	Initial B.W.(g)	(/m <sup>2</sup> )	(/m <sup>3</sup> )	(kg/m <sup>2</sup> )	(kg/m <sup>3</sup> )				
Tank 1	0.009	2,307	3,750	0.108	0.202	0.328	0.0200	80.9	0.63
Tank 2	0.009	4,615	7,500	0.108	0.376	0.611	0.0198	75.5	0.70
Tank 3	0.0009	2,500	4,090	0.071	0.166	0.272	0.0196	93.6	0.59
Tank 4	0.0009	5,555	9,090	0.080	0.258	0.423	0.0158	58.1	0.60

\* weekly growth rate

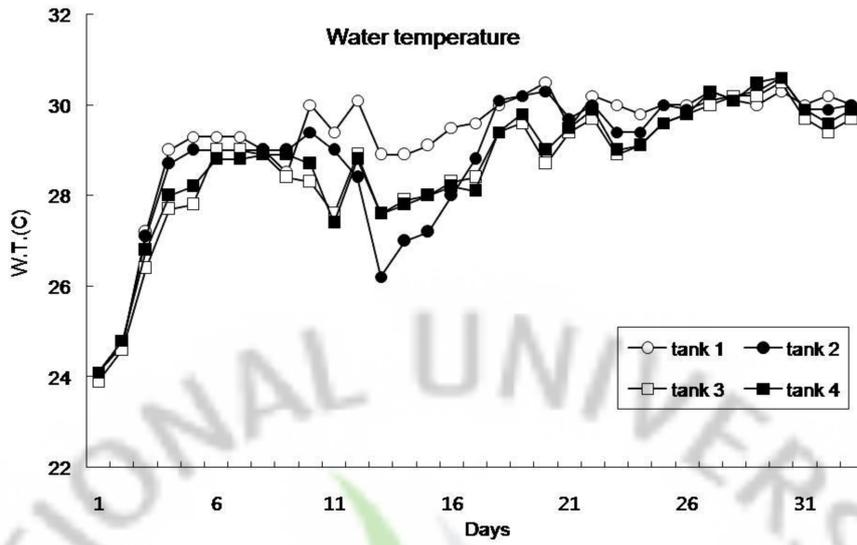


Fig. 12. Daily changes of water temperature in four raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, *L. vannamei*.

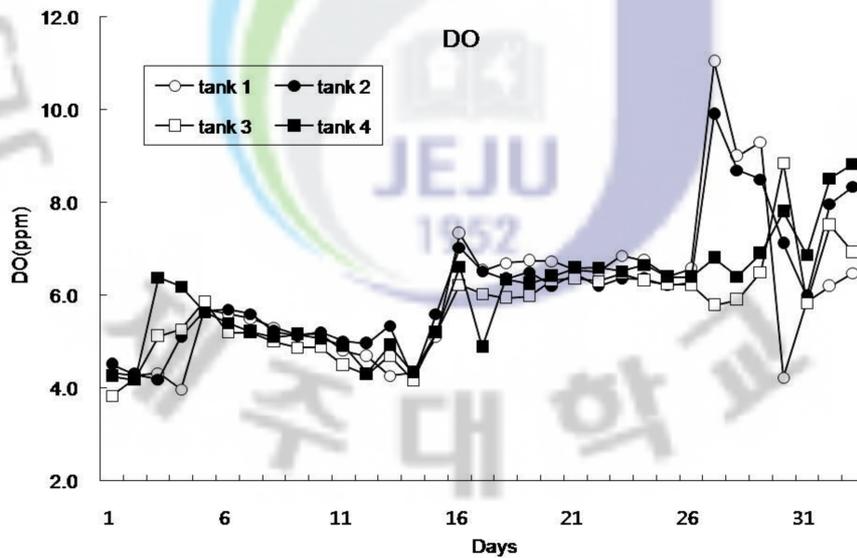


Fig. 13. Daily changes of dissolved oxygen in four raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, *L. vannamei*.

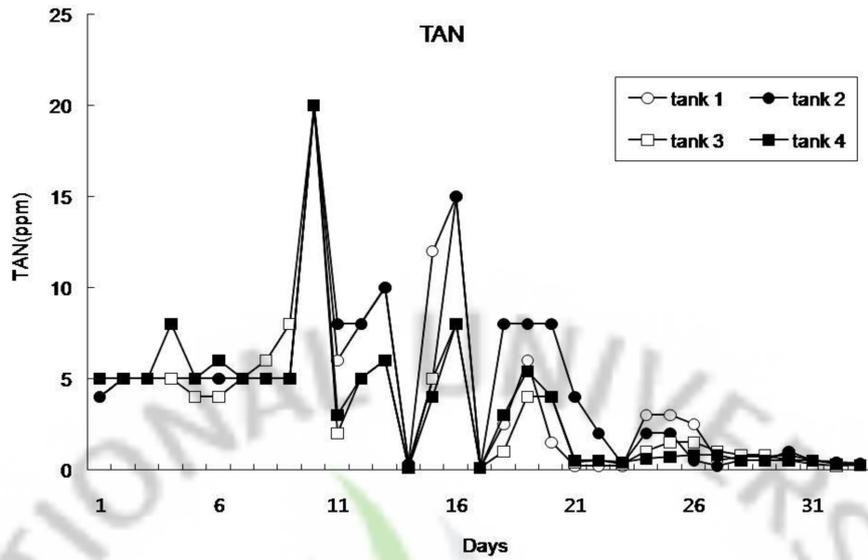


Fig. 14. Daily changes of total ammonia nitrogen (TAN) in four raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, *L. vannamei*

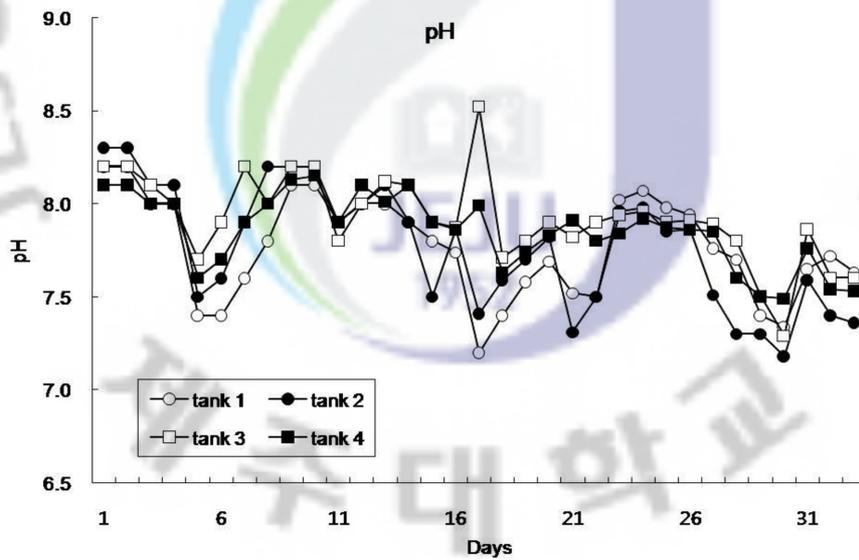


Fig. 15. Daily changes of pH in four raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, *L. vannamei*.

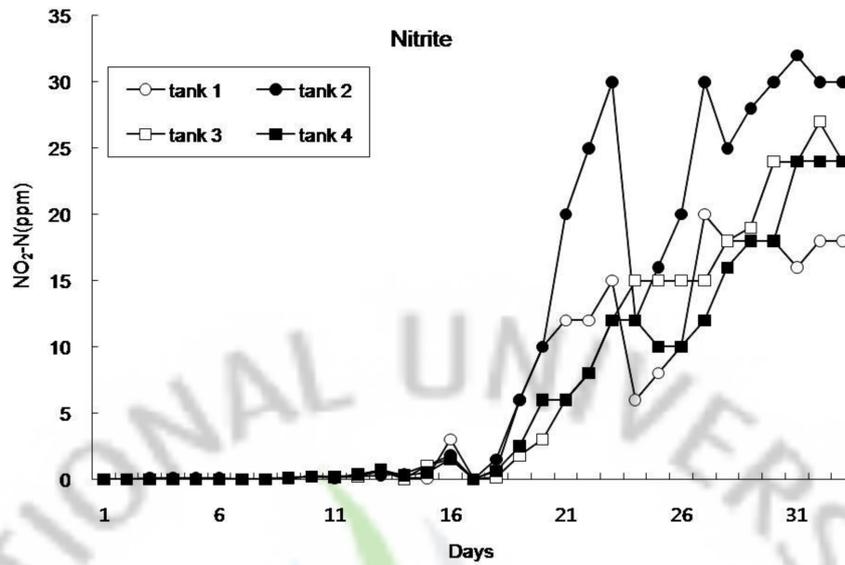


Fig. 16. Daily changes of nitrite-nitrogen in four raceway tanks using activated suspension method over a 35-day nursery trial with Pacific white shrimp, *L. vannamei*.

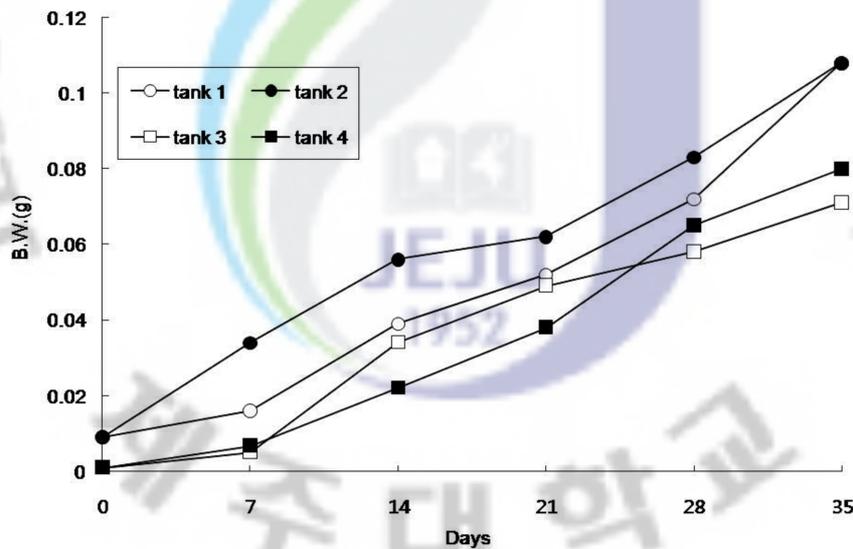


Fig. 17. Growth of Pacific white shrimp, *L. vannamei*, in four tanks over 35-day nursery trial.

## (2) 새우의 성장

사육수를 거의 교환하지 않고 2종류 크기의 수조를 이용하여 서로 다른 밀도로 35일간 흰다리새우의 유생을 중간육성 결과, 각 수조의 새우 성장률과 생산량을 비교 하였다(Table 6, Fig. 17). Tank 1과 2의 수확시 평균 체중은 0.108 g이며 tank 3과 4의 평균 체중은 각각 0.071, 0.080 g으로 tank 1, 2에 비해 약간 작았다. 단위생산량은 tank 1과 2가 각각 0.328, 0.611 kg/m<sup>3</sup>, tank 3과 4가 각각 0.272, 0.423 kg/m<sup>3</sup>로서 tank 2에서 가장 높았다. 생존율은 tank 3이 93.6%로 가장 높았으며, tank 1과 2가 각각 80.9, 75.5%이었고, 가장 밀도가 높은 tank 4에서 58.1%로서 생존율이 가장 낮았다. FCR은 4개의 tank에서 0.59-0.70으로 크게 차이가 나지 않았으며 모두 1.0 이하의 낮은 값 이었다(Table 6). 주간성장율은 tank 1-3에서 0.0196-0.020 g/w으로 거의 비슷한 값을 보였으나 밀도가 가장 높은 tank 4에서는 0.0158 g/w로서 다른 수조의 약 80%에 머물렀다. 새우의 성장은 tank 1, 2 (0.009 g)에서 전 기간에 걸쳐 높게 유지되었으며, 밀도가 가장 낮은 tank 1은 tank 2에 비해 수확시기를 제외하고는 모두 체중이 높았다. 상대적으로 작은 체중(0.009 g)에서 입식된 tank 3, 4는 비슷한 성장을 하였으며 최종 수확시 체중은 tank 1, 2에 비해 약 0.02-0.03 g 작았다(Fig. 17).

## 2) 중간양성

### (1) 사육수의 수질 및 영양염 변화

모든 tank에서 수온은 사육 전 기간 동안 27.8-31℃의 범위로서 평균 30℃를 유지 하였다(Fig. 18). 전 기간 oxygen generator를 가동하여 용존산소(DO)는 모든 tank에서 5.0 mg/L 이상으로 tank 별 평균 9.4-11.8 mg/L이었다. DO는 사육 1주일째까지 점차 상승하여 모든 tank에서 10 mg/L을 넘었으며 2주째에는 tank 별로 11-20 mg/L까지 상승한 후 점차 하강하여 3주 이후에는 tank 1을 제외한 나머지 tank에서는 5-10 mg/L 범위였다. Tank 1은 5주까지 지속적으로 10 mg/L 이상을 유지한 후 점차 6 mg/L까지 하강하였다(Table 7). pH는 모든 tank에서 큰 차이는 없었다. 사육 1주일간 pH는 8.0 전후를 유지한 이후 꾸준히 하강하여 31일째 6.5-6.87까지 내려간 이후 마지막 주에는 7.0 전후로 다시 상승하였다(Fig. 19). 탁도(turbidity)는 전 기간 평균 27.2-36.8 NTU로서 tank 별 큰 차이가 없었다. 3일째 탁도는 tank 4 (26 NTU)를 제외하고는 모두 20 NTU 이하였으나 9일째부터는 대부분 20 NTU 이상으로 증가하였으며 31일까지는 20-40 NTU를 유지하였다. 31일 이후 tank 1, 2에서는 약 60 NTU

이상 tank 3은 100 NTU까지 상승하였다(Fig. 20). 알칼리도(alkalinity)는 tank별 평균 106.9-114.3 mg/L으로 새우의 성장에 적합한 범위였다(Table 7). 총암모니아성 질소(TAN)의 평균 농도는 모든 tank에서 1.11-1.42 mg/L 농도를 유지하였으나 기간에 따라 각 tank는 큰 차이가 있었다. 처음 2주간은 tank 2를 제외한 나머지 tank의 TAN 농도는 대부분 1.0 mg/L 이하를 유지하였으나 tank 2에서는 1.0-2.5 mg/L으로 높았다. 2주 후부터 TAN 농도는 tank 2의 일부 기간을 제외하고는 대부분 1.0-3.0 mg/L으로 점차 증가하였으며 5주 이후에는 tank 별 차이는 있지만 약 1.0의 범위였다. 예외적으로 34일째(tank 1)와 39일째(tank 4)에 TAN이 6.0 mg/L 까지 상승하였다(Fig. 21). 전 기간 아질산성 질소(NO<sub>2</sub>-N)의 평균 농도는 tank 1, 2가 각각 19.51, 22.07 mg/L이며, tank 3, 4가 각각 18.51, 18.45 mg/L으로 면적이 큰 tank 3과 4에서 상대적으로 낮았으나 전체적으로 매우 높은 농도다. 사육 1일째 아질산염은 3.5-4.0 mg/L이었으나 이후 꾸준히 증가하여 33일째에는 29-33 mg/L까지 상승하였다. 이후 아질산염 농도는 약간 감소하여 5주째 모든 tank에서 15-25 mg/L까지 저하된 이후 35-40 mg/L까지 다시 증가하였다. 아질산염 농도가 가장 높았던 농도는 tank 2에서 30일째 45 mg/L였다(Fig. 22). 사육수의 환수는 4주째까지는 없었으나 아질산염 농도가 높았던 4주 이후에 주로 이루어졌다. 전 기간의 평균 일일 환수율은 2.7-3.4%의 범위였다. 당밀은 TAN과 아질산염의 농도가 급격히 상승하는 시기에 주로 공급되었으며 일일 평균공급량은 전 tank에서 0.083-0.113 L이었다.

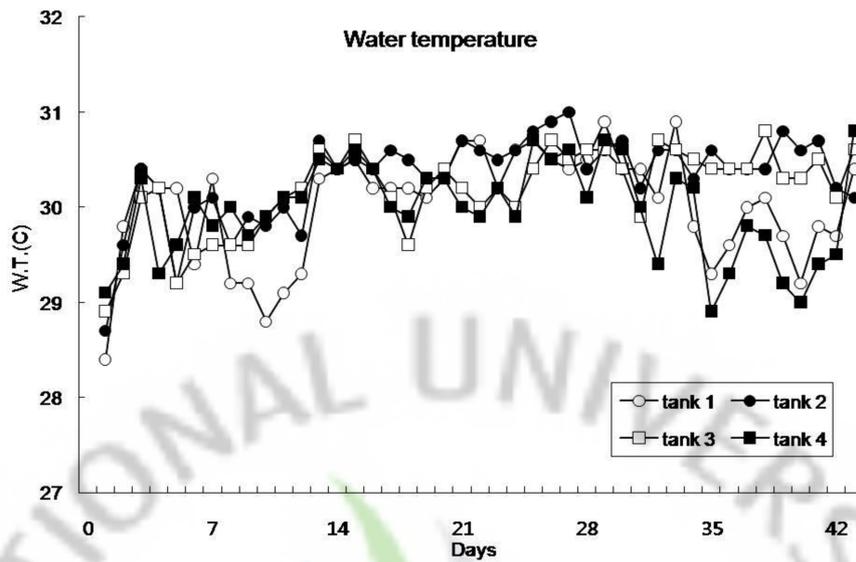


Fig. 18. Daily change of water temperature in four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trail with Pacific white shrimp, *L. vannamei*.

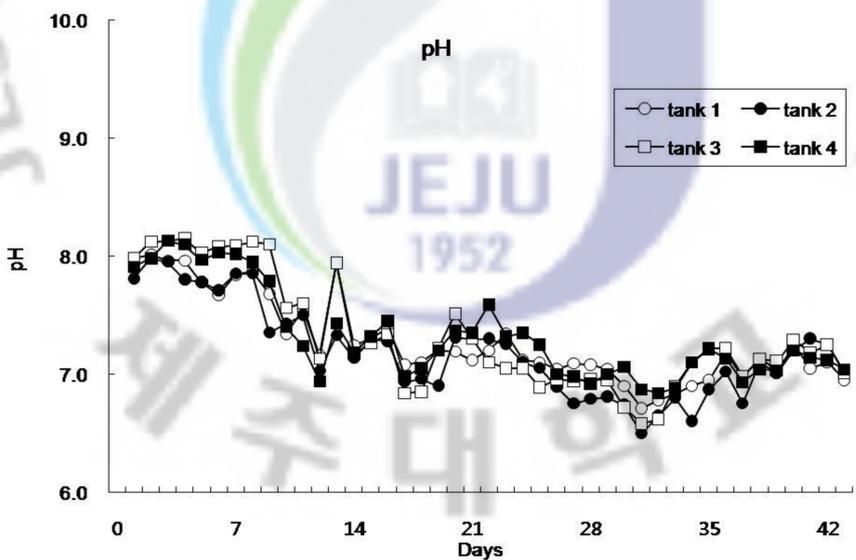


Fig. 19. Daily changes of pH in four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trail with Pacific white shrimp, *L. vannamei*.

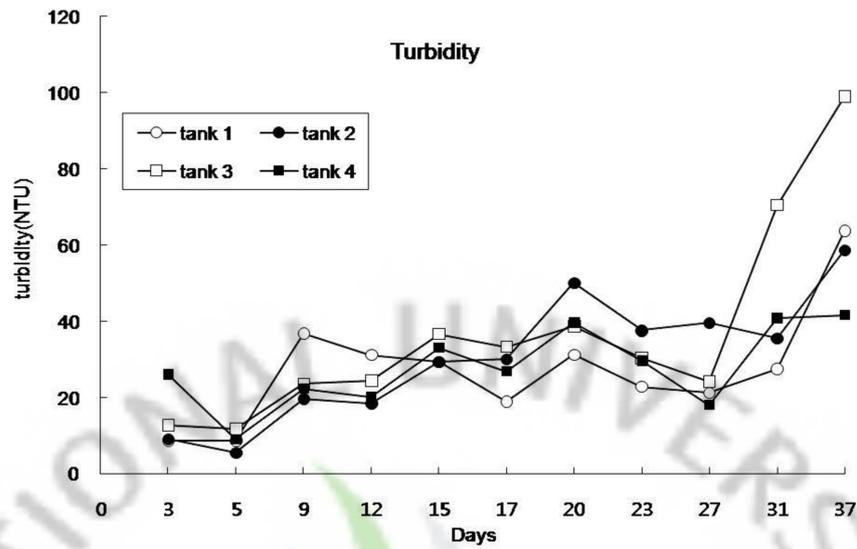


Fig. 20. Daily changes of turbidity in four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trail with Pacific white shrimp, *L. vannamei*.

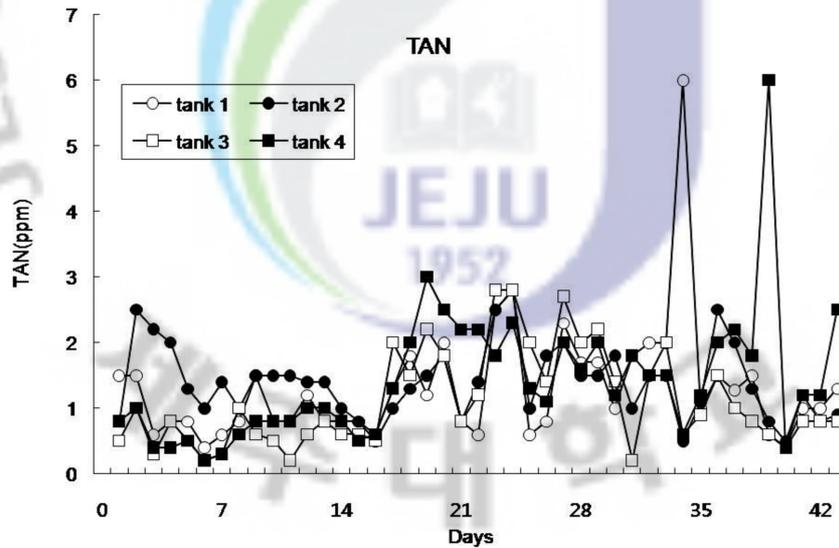


Fig. 21. Daily changes of total ammonia-N in four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trail with Pacific white shrimp, *L. vannamei*.

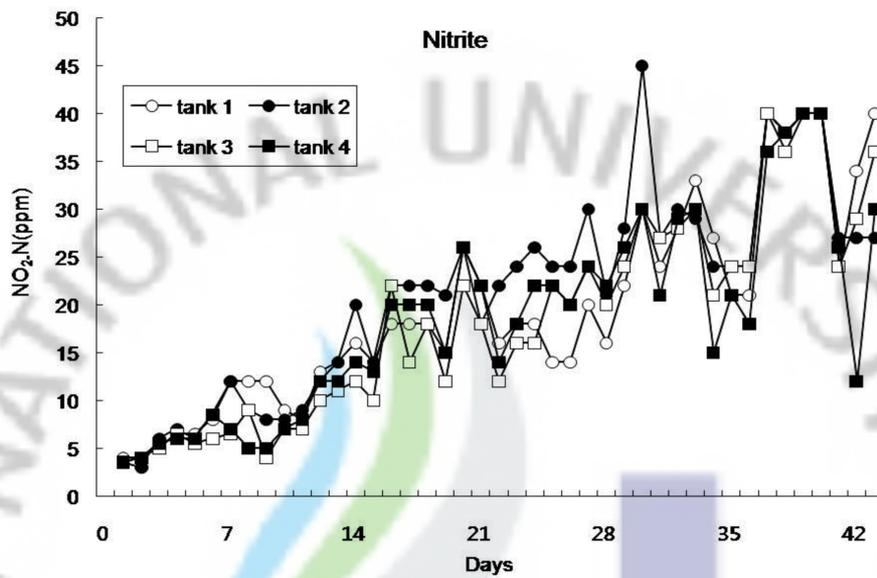


Fig. 22. Daily changes of nitrite-N in four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trail with Pacific white shrimp, *L. vannamei*.

Table 7. Summary of water quality indicators for four raceway tanks using activated suspension method over a 42-day post-nursery culture trial with Pacific white shrimp, *L. vannamei* (mean value with range)

	W.T.(°C)	DO (mg/L)	Salinity (psu)	pH	TAN (mg/L)	NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	Alkalinity (mg/L)	Turbidity (NTU)	Water exchange (%/day)	molasses (L/day)
Tank 1	30.0 (27.8-30.9)	11.8 (5.6-18.9)	32.1 (30.6-33.3)	7.28 (6.7-8.0)	1.32 (0.4-6.0)	19.51 (4.0-40.0)	114.3 (75-130)	27.2 (8.6-63.7)	3.2	0.083
Tank 2	30.3 (28.7-31.0)	9.5 (5.0-18.1)	32.1 (31.2-33.7)	7.19 (6.5-7.9)	1.40 (0.5-2.8)	22.07 (3.0-45.0)	106.9 (55-140)	30.2 (5.5-58.5)	3.4	0.083
Tank 3	30.2 (28.9-30.8)	9.4 (5.6-17.0)	32.6 (31.4-34.4)	7.32 (6.6-8.2)	1.11 (0.2-2.8)	18.51 (3.6-40.0)	110.0 (65-130)	36.8 (11.7-98.9)	3.1	0.102
Tank 4	30.0 (28.9-30.8)	10.1 (5.7-19.6)	32.4 (31.3-33.3)	7.32 (6.8-8.1)	1.42 (0.2-6.0)	18.45 (3.5-40.0)	110.0 (70-130)	27.9 (9.0-41.5)	2.7	0.113

## (2) 새우의 성장

흰다리새우 치하를 4개의 raceway tank에 서로 다른 밀도로 입식하고 42일간 중간 양성한 결과, tank에 따라 2.49-4.22 kg/m<sup>3</sup>가 생산하였다(Table 6). 0.08 g의 치하를 3,818, 5,455 마리/m<sup>3</sup> 입식한 tank 3과 4에서 각각 4.22, 4.10 kg/m<sup>3</sup>로 생산량이 높았으며, 0.09 g의 치하를 5,625, 3,000 마리/m<sup>3</sup> 입식한 tank 2와 1에서 각각 3.31, 2.49 kg/m<sup>3</sup>를 생산하였다. 입식 시 체중은 모든 tank에서 비슷하였으나, 수확시 체중은 면적이 18 m<sup>2</sup>인 tank 3과 4가 각각 2.03, 1.97 g이며, 12.9 m<sup>2</sup>인 tank 1, 2가 각각 1.73, 1.45 g으로 면적이 넓은 tank 3, 4에서 성장률이 15.6-40.0% 높았다. 생존율은 면적이 넓고 밀도가 상대적으로 낮은 tank 3이 54.4%로 가장 높았으며, tank 1, 2 및 4가 각각 48, 40.6, 38.2% 순이었다. FCR은 tank 2에서 0.79로 가장 낮았으며, 나머지 tank는 1.02-1.29의 범위였다. 평균 주간성장률은 최종 체중과 비슷하게 tank 3, 4가 각각 0.372, 0.315 g으로 높았으며, tank 1, 2가 각각 0.27, 0.226 g의 순서로 나타났다. 사육 3주째까지는 모든 수조에서 주간성장률이 비슷하였지만, 3주 이후에는 tank 3과 4에서 tank 1, 2보다 높았다(Fig. 23, Table 8).

Table 8. Summary of stocking and production of Pacific white shrimp, *L. vannamei* in four raceway tanks operated with activated suspension method during a 42-day post-nursery culture trial

	Stocking density		Final B.W.(g)	Yield		WGR* (g/w)	Survival rate(%)	FCR
	Initial B.W.(g)	(/m <sup>2</sup> )		(/m <sup>2</sup> )	(kg/m <sup>2</sup> )			
Tank 1	0.09	1,860	1.73 <sup>a</sup>	1.53	2.49	0.270	48.0	1.02
Tank 2	0.09	3,488	1.45 <sup>b</sup>	1.89	3.31	0.226	40.6	0.79
Tank 3	0.08	2,333	2.03 <sup>c</sup>	2.58	4.22	0.375	54.4	1.03
Tank 4	0.08	3,333	1.97 <sup>c</sup>	2.51	4.10	0.315	38.2	1.29

\* weekly growth rate  
Superscripts indicate significant differences ( $\alpha = 0.05$ )

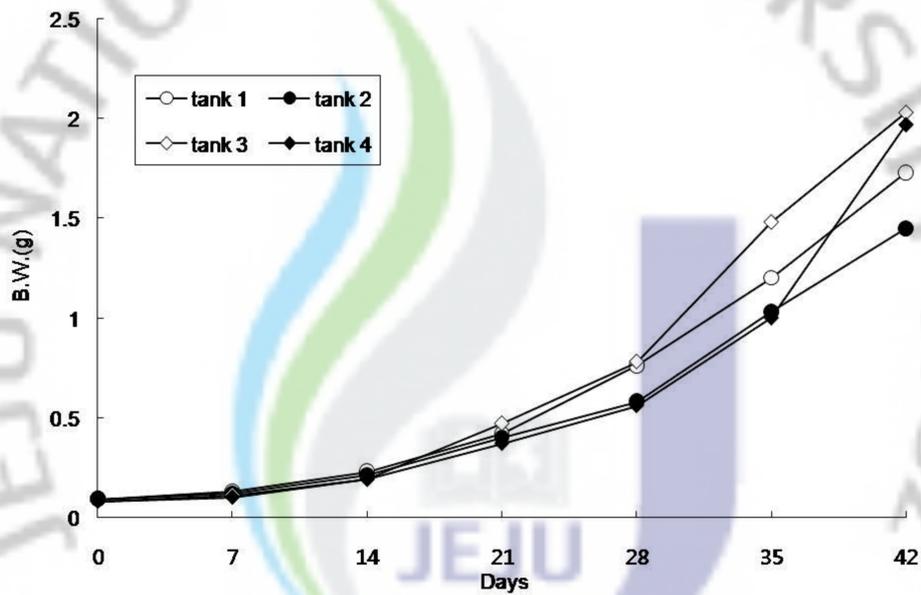
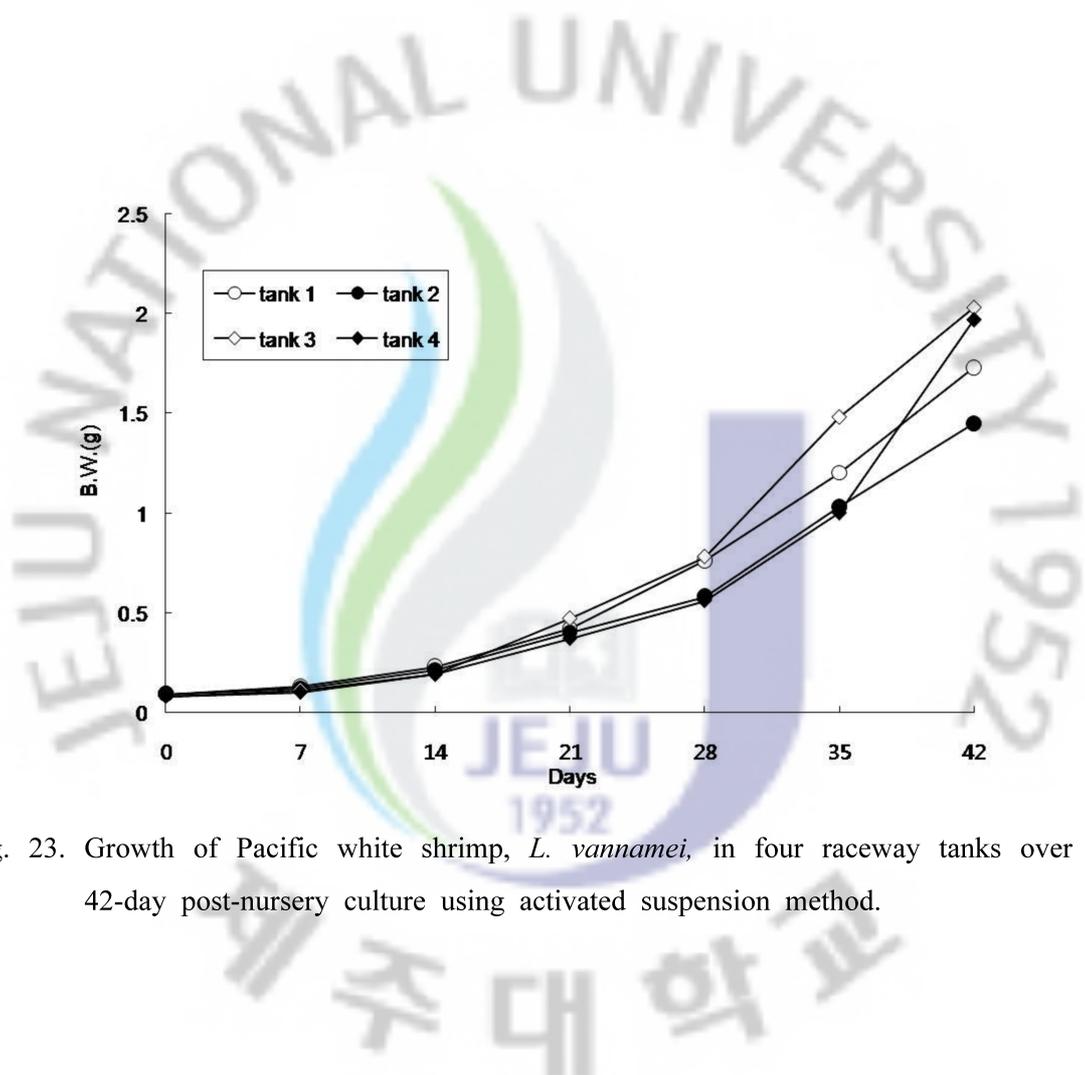


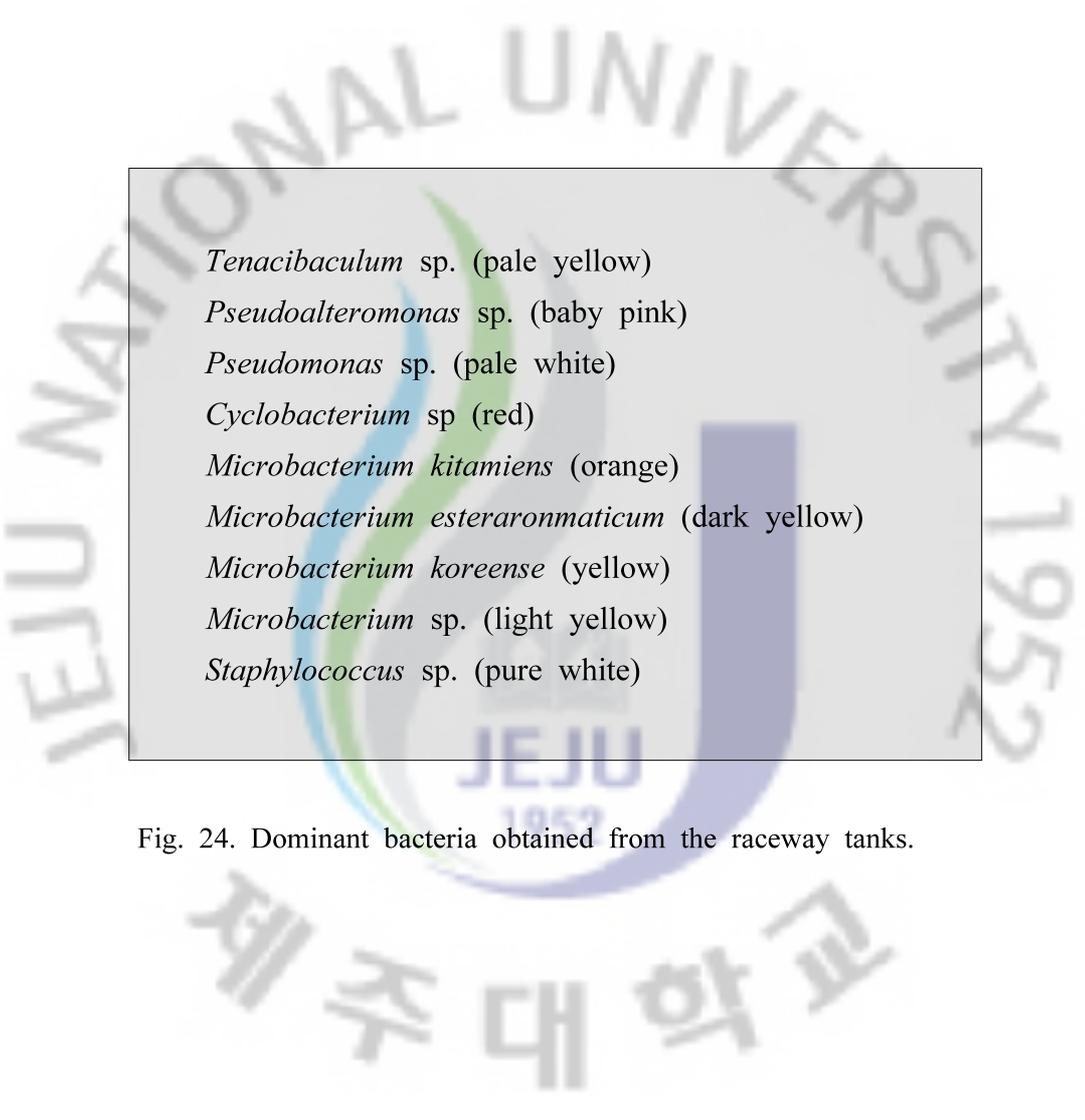
Fig. 23. Growth of Pacific white shrimp, *L. vannamei*, in four raceway tanks over a 42-day post-nursery culture using activated suspension method.

### 3. 활성유기물 부유방식 사육수의 세균학적 특성

#### 1) 세균계수

실험시작시의 각 tank의 총세균수는  $1.61 \times 10^6$  -  $3.65 \times 10^6$  CFU/mL이며, 15일째에는 이보다 약간 낮은  $4.1 \times 10^5$  to  $1.76 \times 10^6$  CFU/mL의 범위였다(Table 8, Fig. 25). 15일째에는 tank 2를 제외한 tank 1, 3, 4에서 감소되어  $4.13 \times 10^5$  -  $5.31 \times 10^5$  CFU/mL의 범위를 보였다. 30일째에는 다시  $4.6 \times 10^5$  -  $1.99 \times 10^6$  CFU/mL으로 증가하였다. 42일째에는 tank 3, 4는 다소 감소한  $5.13 \times 10^5$ ,  $7.33 \times 10^5$  CFU/mL이나 tank 1, 2는 각각  $2.59 \times 10^6$ ,  $2.89 \times 10^6$  CFU/mL으로 증가하였다.

*Vibrio* 는 실험 시작시에 4개의 tank에서  $4.00 \times 10^2$  -  $1.27 \times 10^4$  CFU/mL의 범위였으나, 15일과 30일째에는 다소 감소된 이후 42일째에 다시  $8.4 \times 10^3$  -  $2.47 \times 10^4$ 으로 증가하였다(Table 9, Fig. 26). Tank 1은 시작시와 42일째에 각각  $1.27 \times 10^4$ ,  $1.11 \times 10^4$  CFU/mL으로 모두  $10^4$  CFU/mL 이상이였으며, 15일, 30일에는  $10^3$  CFU/mL 범위였다. Tank 2는 15일째에 검출되지 않았으며, 42일에  $1.90 \times 10^4$  CFU/mL으로 크게 증가하였다. Tank 3은 15일에  $1.67 \times 10^4$  CFU/mL로 높아진 이후 30일에 시작시, 42일째에  $8.40 \times 10^3$ 였다. Tank 4는 지속적으로  $10^3$  CFU/mL를 유지하다가 42일째에  $2.47 \times 10^4$  CFU/mL으로 증가 하였다.



*Tenacibaculum* sp. (pale yellow)  
*Pseudoalteromonas* sp. (baby pink)  
*Pseudomonas* sp. (pale white)  
*Cyclobacterium* sp (red)  
*Microbacterium kitamiens* (orange)  
*Microbacterium esteraromaticum* (dark yellow)  
*Microbacterium koreense* (yellow)  
*Microbacterium* sp. (light yellow)  
*Staphylococcus* sp. (pure white)

Fig. 24. Dominant bacteria obtained from the raceway tanks.

Table 9. The total bacterial count in four tanks of white shrimp, *L. vannamei* using activated suspension method during 42-day post-nursery culture (mean±S.D. CFU/mL)

Days	tank 1	tank 2	tank 3	tank 4
0	$3.65 \times 10^6$ $\pm 1.13 \times 10^6$	$3.05 \times 10^6$ $\pm 1.46 \times 10^6$	$1.79 \times 10^6$ $\pm 5.03 \times 10^5$	$1.61 \times 10^6$ $\pm 4.77 \times 10^5$
15	$5.20 \times 10^5$ $\pm 0$	$1.76 \times 10^6$ $\pm 1.60 \times 10^5$	$4.13 \times 10^5$ $\pm 1.15 \times 10^4$	$5.31 \times 10^5$ $\pm 7.00 \times 10^4$
30	$1.88 \times 10^6$ $\pm 4.57 \times 10^5$	$4.60 \times 10^5$ $\pm 8.72 \times 10^4$	$1.33 \times 10^6$ $\pm 8.70 \times 10^5$	$1.99 \times 10^6$ $\pm 1.22 \times 10^6$
42	$2.59 \times 10^6$ $\pm 2.95 \times 10^6$	$2.89 \times 10^6$ $\pm 2.50 \times 10^5$	$5.13 \times 10^5$ $\pm 2.72 \times 10^5$	$7.33 \times 10^5$ $\pm 1.67 \times 10^5$

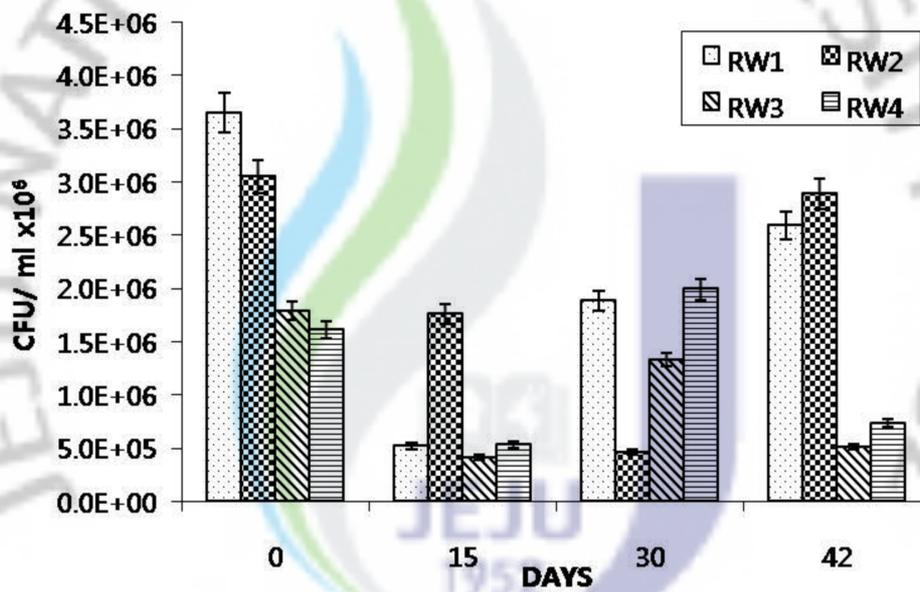


Fig. 25. Comparison of total bacterial count in four tanks of white shrimp, *L. vannamei* using activated suspension method during 42-day post-nursery culture. Asterisks are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Table 10. *Vibrio* count (mean±S.D. CFU/mL) in four tanks of white shrimp, *L. vannamei* using activated suspension method for 42-day post-nursery culture.

Days	tank 1	tank 2	tank 3	tank 4
0	1.27×10 <sup>4</sup> ±2.31×10 <sup>2</sup>	4.00×10 <sup>2</sup>	3.20×10 <sup>3</sup> ±8.00×10 <sup>2</sup>	5.33×10 <sup>3</sup> ±6.11×10 <sup>2</sup>
15	2.20×10 <sup>3</sup> ±1.40×10 <sup>3</sup>	0	1.67×10 <sup>4</sup> ±1.43×10 <sup>4</sup>	2.60×10 <sup>3</sup>
30	2.47×10 <sup>3</sup> ±3.24×10 <sup>3</sup>	8.93×10 <sup>2</sup> ±7.00×10 <sup>2</sup>	0	1.29×10 <sup>3</sup> ±9.00×10 <sup>2</sup>
42	1.11×10 <sup>4</sup> ±6.90×10 <sup>3</sup>	1.90×10 <sup>4</sup> ±3.20×10 <sup>3</sup>	8.40×10 <sup>3</sup> ±1.00×10 <sup>3</sup>	2.47×10 <sup>4</sup> ±1.30×10 <sup>3</sup>

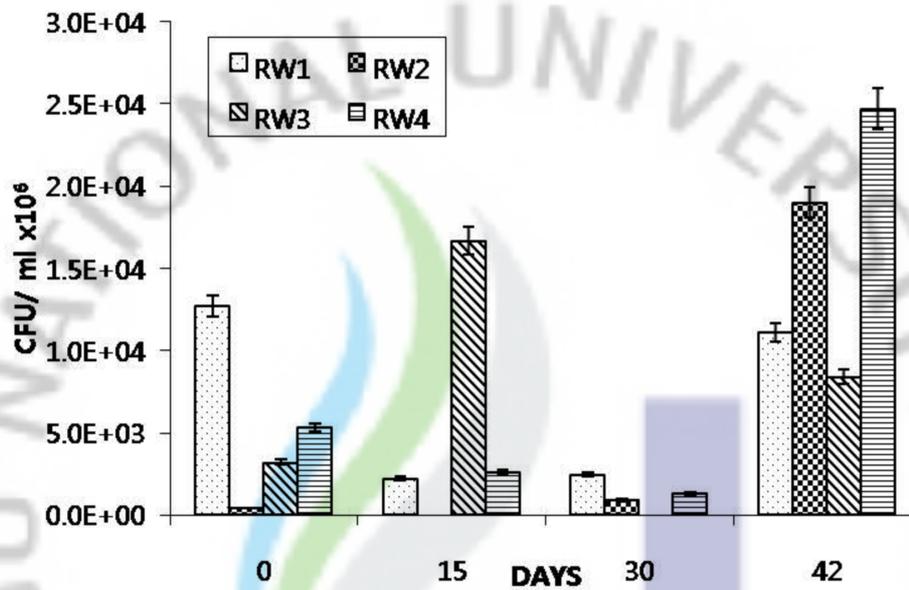


Fig. 26. *Vibrio* count (mean±S.D. CFU/mL) in four tanks of white shrimp, *L. vannamei* using activated suspension method for 42-day post-nursery culture. Asterisks are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 2) 세균군집의 특성

실험기간동안 총 313 bacterial isolate를 분리 하여 형태, 생화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열 분석에 근거하여 gamma Proteobacteria, alpha Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Cytophagales Flavobacterium-Bacteroides 등의 5개 group으로 구분 하였다. 16S rRNA 염기서열에 근거하여 조사한 세균군은 13 genus (*Microbacterium*, *Tenacibaculum*, *Cyclobacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Thalassospira*, *Formosa*, *Exiguobacterium*, *Stappia*, *Yangia*) 였으며 계통수(phylogenetic tree)를 에 작성하였다(Fig. 27).

## 3) 세균군집의 구성

사육기간 동안 사육수에서 우점종의 구성과 비율을 조사하였다. 13개의 genus 중 *Microbacterium* spp., *Tenacibaculum* sp., *Pseudomonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp. 그리고 *Vibrio* spp. 그룹이 우점하였다. 실험 시작시에 *Microbacterium* spp.가 tank 1을 제외하고는 모든 tank에서 우점하였으나, 15일째에는 이 그룹은 모든 tank에서 전혀 관찰되지 않았으며, 30일과 42일에 다시 증가하는 경향을 보였다. *Tenacibaculum* sp. 는 tank 1에서는 전 기간 지속적으로 관찰되었으나, tank 2-4는 실험 시작시에는 전혀 출현하지 않다가 이후 간헐적으로 관찰되었다. *Vibrio* spp.는 15일에 tank 2 (7%), tank 1 (2%) 및 42일에 tank 1 (5%)를 제외하고는 모든 tank에서 전기간 1% 이하로 출현하였다(Tables 11-18).

Table 11. Identified (17 spp.) and unidentified (18 spp.) bacterial species isolated from biofloc water based on 16S ribosomal RNA sequences

Isolates #	Species	Length (bp)	Percentage.(%)
RW14	<i>Halomonas</i> sp.	1370	99 Plus / Plus
RW29	<i>Vibrio shilonii</i> strain MP-3	1393	100 Plus / Plus
RW54	<i>Cyclobacterium limum</i> strain HY9	1365	95 Plus / Plus
RW09	<i>Tenacibaculum aestuarii</i> strain SMK-4	1370	98 Plus / Plus
RW39	<i>Vibrio fortis</i> strain LMG 21559	1393	99 Plus / Plus
RW57	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	1387	100 Plus / Minus
RW45	<i>Microbacterium kitamiense</i>	1265	99 Plus / Plus
RW49	<i>Vibrio</i> sp. 'Artemid'	1345	99 Plus / Minus
RW35	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain SR1	1386	100 Plus / Minus
RW53	<i>Vibrio natriegens</i> (ATCC 14048T)	1391	99 Plus / Plus
RW46	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	1316	99 Plus / Plus
RW28	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	1369	100 Plus / Plus
RW42	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	1274	99 Plus / Plus
RW58	<i>Microbacterium jejuense</i>	1319	100 Plus / Plus
RW20	<i>Microbacterium koreense</i>	1322	99 Plus / Plus
RW06	<i>Microbacterium</i> sp. CNJ797 PL04 e	1222	99 Plus / Plus
RW30	<i>Staphylococcus</i> sp. TUT1203	1387	100 Plus / Plus

Table 11. Continued

<b>Unidentified bacterial strains</b>			
RW01	Uncultured bacterium clone S25_781	1373	99 Plus / Plus
RW13	Uncultured bacterium clone S25_781	1373	99 Plus / Plus
RW05	Uncultured bacterium clone S25_781	1373	99 Plus / Plus
RW23	Uncultured gamma proteobacterium clone UA07	1346	99 Plus / Plus
RW03	Uncultured bacterium clone S23_1160	1329	99 Plus / Plus
RW18	Uncultured marine bacterium clone Ch11.40	1379	99 Plus / Plus
RW38	Uncultured bacterium clone S25_781	1368	99 Plus / Plus
RW50	Uncultured <i>Vibrio</i> sp. 'Artemia'	1388	99 Plus / Minus
RW49	Uncultured <i>Vibrio</i> sp. 'Artemia'	1345	99 Plus / Minus
RW51	Uncultured bacterium clone S25_781	1371	99 Plus / Plus
RW41	Uncultured bacterium clone S25_781	1372	99 Plus / Plus
RW40	Uncultured gamma proteobacterium clone UA07	1303	99 Plus / Plus
RW36	Uncultured gamma proteobacterium clone UA07	1348	99 Plus / Plus
RW11	Uncultured bacterium clone S25_781	1372	99 Plus / Plus
RW12	Uncultured bacterium clone S25_781	1367	99 Plus / Plus
RW07	Uncultured bacterium clone S25_781	1374	99 Plus / Plus
RW19	Uncultured marine bacterium clone Ch11.40	1378	99 Plus / Plus
RW17	Uncultured marine bacterium clone Ch11.40	1380	99 Plus / Plus

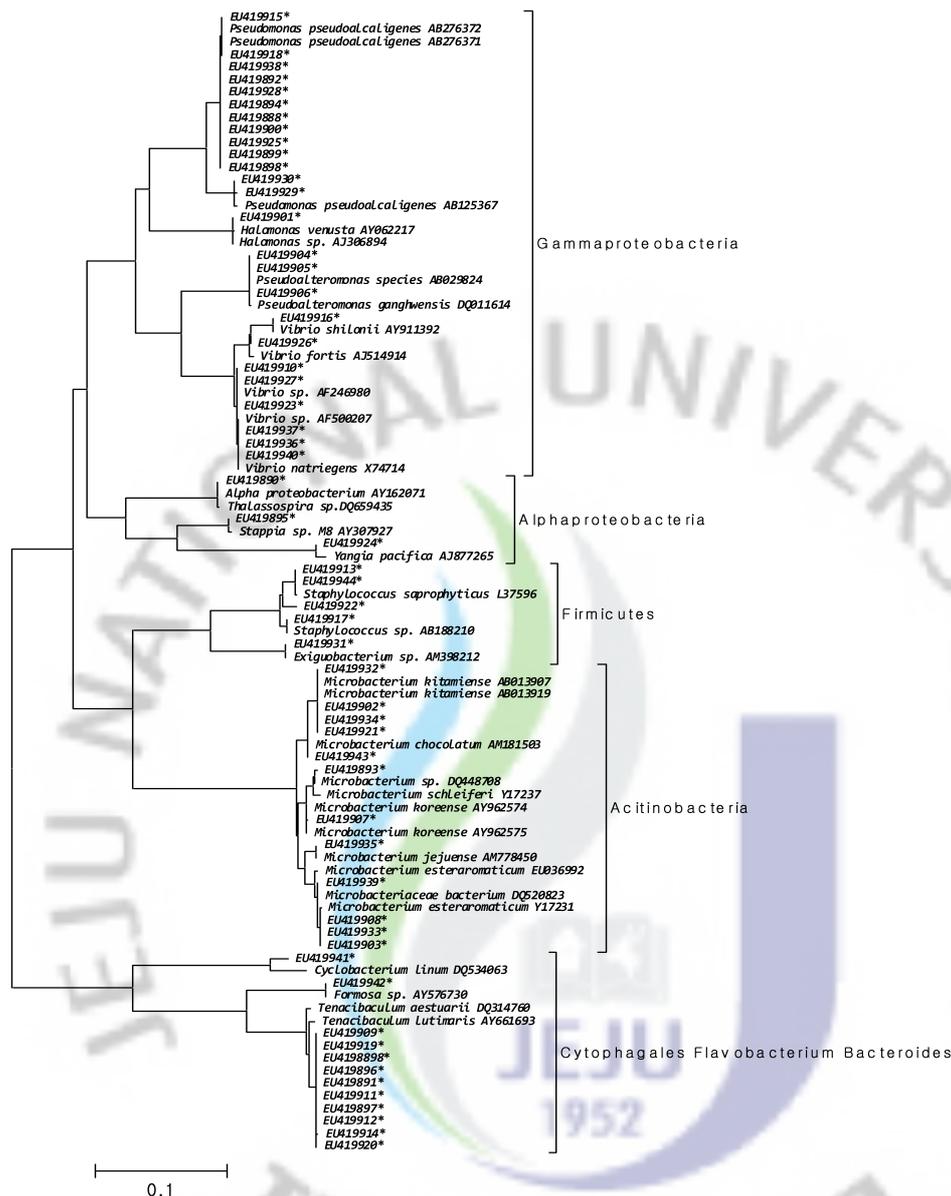


Fig. 27. Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA sequences retrieved from the different isolated colonies (Asterisk). The tree was constructed from the sequence obtained in this study and reference sequences by neighbor joining procedures. Accession numbers of reference sequences and 16S rRNA sequence of isolates are provided in the figure.

Table 12. Ratio (%) of bacterial community distributions during 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, *L. vannamei* in tank 1 using activated suspension method

Bacterial groups	Days			
	0	15	30	42
<i>Microbacterium</i> spp.	66.66	-	-	10.52
<i>Tenacibaculum</i> sp.	11.11	14.28	92.30	42.11
<i>Staphylococcus</i> spp.	5.55	-	-	-
<i>Cyclobacterium</i> sp.	5.55	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	56.14	-	47.37
<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	-	28.57	3.85	-
<i>Vibrio</i> spp.	11.11	<1	3.85	<1
Other groups	<1	<1	<1	<1

Table 13. Parameters of water quality during a 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, *L. vannamei* in tank 1 using activated suspension method

Parameters	day 0	day 15	day 30	day 42
Temperature	28.4	30.2	30.4	30.4
DO	5.84	11.57	11.74	6.69
Salinity	32.2	32.3	31.9	30.6
pH	7.98	7.39	6.71	6.95
TAN	1.5	0.6	1.8	1.3
NO <sub>2</sub>	4	18	24	40

Table 14. Ratio (%) of bacterial community distributions during 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, *L. vannamei* in tank 2 using activated suspension method

Bacterial groups	Days			
	0	15	30	42
<i>Microbacterium</i> spp.	36.86	-	74.98	46.66
<i>Tenacibaculum</i> sp.	-	66.66	-	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	5.26	-	-	-
<i>Cyclobacterium</i> sp.	5.26	-	-	6.6
<i>Pseudomonas</i> spp.	15.79	26.66	4.16	-
<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	36.84	-	20.8	46.66
<i>Vibrio</i> spp.	< 1	<7	<1	<1

Table 15. Parameters of water quality during a 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, *L. vannamei* in tank 2 using activated suspension method

Parameters	day 0	day 15	day 30	day 42
Temperature	28.7	30.4	30.2	30.1
DO	5.91	10.28	4.97	6.89
Salinity	32.5	32	31.7	31.5
pH	7.81	7.28	6.5	7.01
TAN	0.8	0.5	1	0.9
NO <sub>2</sub>	3.5	22	27	27

Table 16. Ratio (%) of bacterial community distributions during 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, *L. vannamei* in tank 3 using activated suspension method

Bacterial groups	Days			
	0	15	30	42
<i>Microbacterium</i> spp.	55	-	100	8.32
<i>Tenacibaculum</i> sp.	-	80	-	55.55
<i>Staphylococcus</i> spp.	10	-	-	-
<i>Cyclobacterium</i> sp.	-	-	-	2.77
<i>Pseudomonas</i> spp.	20	13.33	-	5.5
<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	15	6.66	-	27.77
<i>Vibrio</i> spp.	-	< 1	-	<1

Table 17. Parameters of water quality during a 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, *L. vannamei* in tank 3 using activated suspension method

Parameters	day 0	day 15	day 30	day 42
Temperature	28.9	30.4	29.9	30.6
DO	7.51	9.46	7.43	5.7
Salinity	32.2	33.3	32.1	31.5
pH	7.98	7.34	6.58	7.01
TAN	0.5	0.5	0.2	0.8
NO <sub>2</sub>	3.6	22	27	36

Table 18. Ratio (%) of bacterial community distributions during 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, *L. vannamei* in tank 4 using activated suspension method

Bacterial groups	Days			
	0	15	30	42
<i>Microbacterium</i> spp.	28.56	-	46.15	30
<i>Tenacibaculum</i> sp.	-	28.75	-	10
<i>Staphylococcus</i> spp.	-	-	-	5
<i>Cyclobacterium</i> sp.	14.28	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	20.42		
<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	42.86	46.42	46.17	30
<i>Vibrio</i> spp.	14.28	3.75	7.69	20
Other groups	<1	<2	<1	5

Table 19. Parameters of water quality during a 42-day post-nursery culture with Pacific white shrimp, *L. vannamei* in tank 4 using activated suspension method

Parameters	day 0	day 15	day 30	day 42
Temperature	29.1	30.4	30	30.8
DO	8.52	10.41	6.52	6.04
Salinity	32.1	32.8	32.2	31.4
pH	7.91	7.45	6.87	7.04
TAN	0.8	0.6	1.8	2.5
NO <sub>2</sub>	3.5	20	21	30

#### 4. 활성유기물 부유법의 사육수가 새우의 성장과 면역효과에 미치는 영향

##### 1) 성장률, 생존율 및 사료효율

Biofloc 사육수를 농도별로 흰다리새우 치하를 63일간 사육한 결과, 성장률은 biofloc 75% 실험구(Exp.II)가 11.2 g으로 가장 높았으며 biofloc 50% (Exp.III)과 25% (Exp.IV)가 각각 10.87 g, 10.85 g으로 비슷하였으며, 100% 구(Exp.I)가 9.21 g, 0% 구(control)이 8.72 g의 순으로 가장 낮았다. FCR은 Exp.III과 IV가 각각 1.37, 1.38로 가장 낮았으며, Exp.I이 1.45, Exp.II가 1.65이였으며 control 구가 1.70으로 가장 높았다. 생존율은 Exp.I구가 98.8%, Exp.III, IV 및 control 구가 95-96%로 비슷하였으며 Exp. II가 88.8%로 가장 낮았다(Table 19).

주간성장율(weekly growth rate)은 0.78-1.05 g/w로서 실험구간 성장률의 순위와 같으며 체중에 관계없이 거의 일정하였다(Fig. 28).

Table 20. Summary of growth, FCR and survival rate in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp, *L. vannamei*

	Exp I	Exp II	Exp III	Exp IV	Control
Initial B.W.(g)	1.69	1.69	1.69	1.69	1.69
Final B.W.(g)	9.21	11.12	10.87	10.85	8.72
Total biomass (g)	546.2	592.7	626.1	621.7	497
Consumed feed (g)	793.9	980.2	857.4	860.2	846.9
FCR	1.45	1.65	1.37	1.38	1.70
Survival rate (%)	98.8	88.8	96.0	95.5	95.0

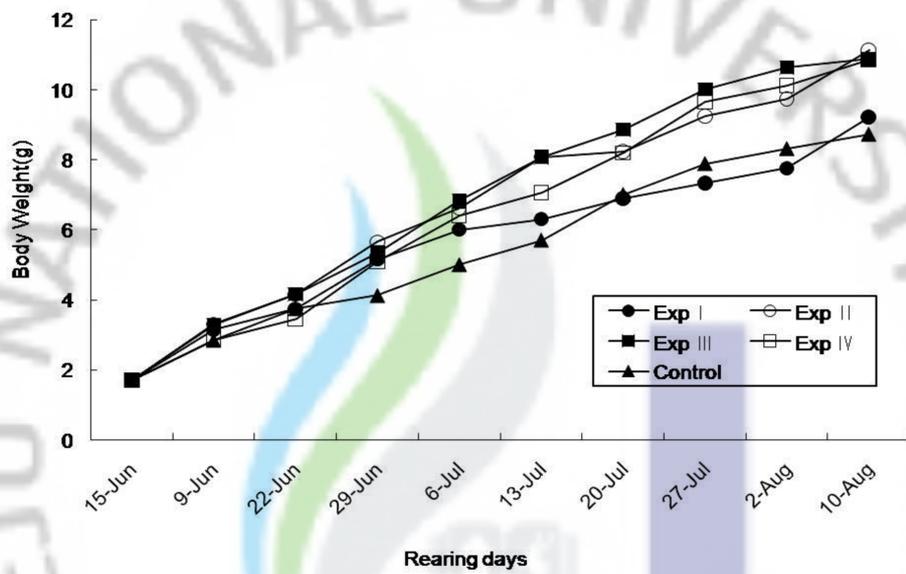


Fig. 28. Weekly growth of Pacific white shrimp, *L. vannamei* in five experimental groups during a 63-day culture trial.

## 2) 사육수의 수질

전 기간 사육수조의 수질환경 변화에서 수온은 26.5-29.4℃로서 실험구간 큰 차이가 없었고 용존산소(DO)는 전 기간 3.8-6.0 mg/L이며 평균 5.2-5.3 mg/L로서 새우 성장에 적합한 범위였다(Table 21). 염분은 30.1-35.1 psu의 범위였다. pH는 Exp. I에서 평균 6.6으로 가장 낮았으며 biofloc의 농도가 낮은 실험구로 갈수록 7.7까지 증가하였다. TSS (total suspended solids)는 Exp. I이 평균 912.0 mg/L로서 가장 높았으며 Exp. II-IV가 각각 739.2, 520.1, 275.2 mg/L의 순이고 control구가 43.9 mg/L로 가장 낮았다. VSS (volatile suspended solids)도 TSS와 마찬가지로 Exp.I이 385.7 mg/L로 가장 높으며, biofloc 농도가 낮아질수록 저하되어 control구에서는 11.0 mg/L를 보였다(Fig. 30). TAN (total ammonia nitrogen)은 Exp.I이 0.6 mg/L로서 가장 높았으며 biofloc의 농도와 비례하여 낮아졌다. TAN은 실험 둘째주부터 증가하기 시작하여 넷째주 이후에는 감소하였다(Fig. 32).

Nitrite-nitrogen은 Exp.I이 2.0 mg/L이며 biofloc 농도와 비례하여 낮아졌다. Nitrate-nitrogen의 농도는 Exp.I-III가 53.3-41.6 mg/L으로 차이가 없었으며 Exp.IV에서는 28.7 mg/L로 급격히 떨어졌다(Figs. 33-34). Chlorophyll-a의 농도는 Exp.I이 228.9  $\mu$ g/L로 가장 높았으며 biofloc 농도에 비례하여 낮아졌다. 그러나 전체적으로 Chl-a의 농도는 기간이 지속됨에 따라서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 31).

Table 21. Summary of water quality indicators for five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp *L. vannamei* (mean value with range)

	Water Temp.(°C)	DO (mg/L)	Salinity (psu)	pH	TSS (mg/L)	VSS (mg/L)	TAN (mg/L)	NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	Chl.-a (ug/L)
EXP I	28.6	5.3	33.5	6.6	912.0	385.7	0.6	2.0	53.3	228.9
	26.5-29.3	3.8-6.0	32.2-35.1	6.1-7.3	1144.5-694.6	476.4-252.4	2.29-0.1	4.37-0.09	94.8-25.1	375.8-107.7
EXP II	28.6	5.2	33.5	7.0	739.2	305.5	0.5	1.1	49.6	166.9
	26.7-29.4	3.8-6.0	32.5-34.7	6.3-7.6	924.4-479.1	366.3-224.2	1.1-0.1	2.53-0.04	91.0-29.1	267.5-80.3
EXP III	28.7	5.3	33.3	7.3	520.1	206.2	0.4	0.5	41.6	108.2
	26.6-29.4	4.5-6.0	32.1-34.4	6.4-7.7	675.2-407.0	243.8-158.7	0.99-0.04	1.20-0.02	72.8-16.7	160.9-51.1
EXP IV	28.7	5.3	33.1	7.4	275.2	111.3	0.3	0.1	28.7	60.3
	26.8-29.4	4.2-5.8	31.2-34.4	6.5-7.7	358.8-183.2	152.1-56.0	0.65-0.03	0.51-0.03	52.1-18.9	101.1-28.9
Control	28.5	5.3	32.8	7.7	43.9	11.0	0.0	0.0	0.2	1.1
	26.8-29.2	4.6-6.0	30.1-33.9	6.7-7.8	62-32	17.3-6.0	0.05-0	0.02-0	0.5-0.06	8.3-0.01

Water temperature, DO, salinity and pH were daily measured; TSS, VSS, TAN, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> and Chl-a were measured twice a week.

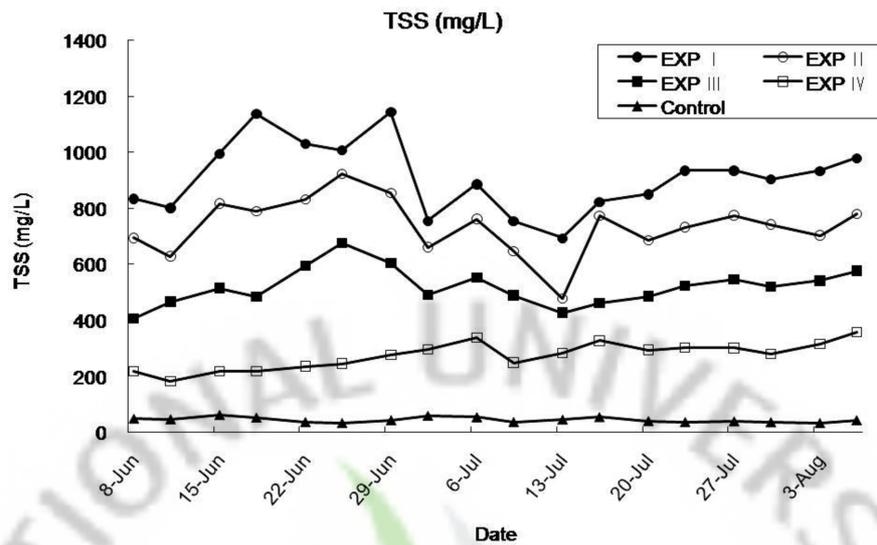


Fig. 29. Concentration of total suspended solids (TSS) in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp *L. vannamei*.

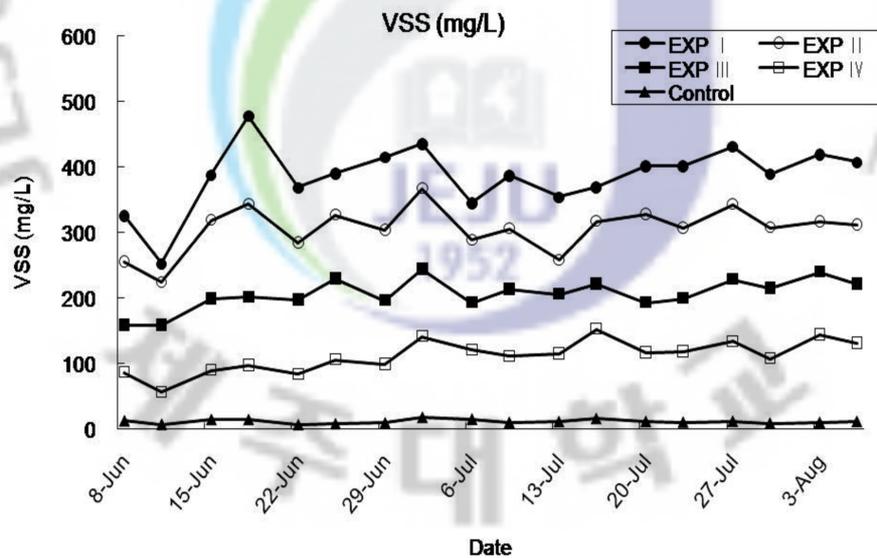


Fig. 30. Concentration of volatile suspended solids (VSS) in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp *L. vannamei*.

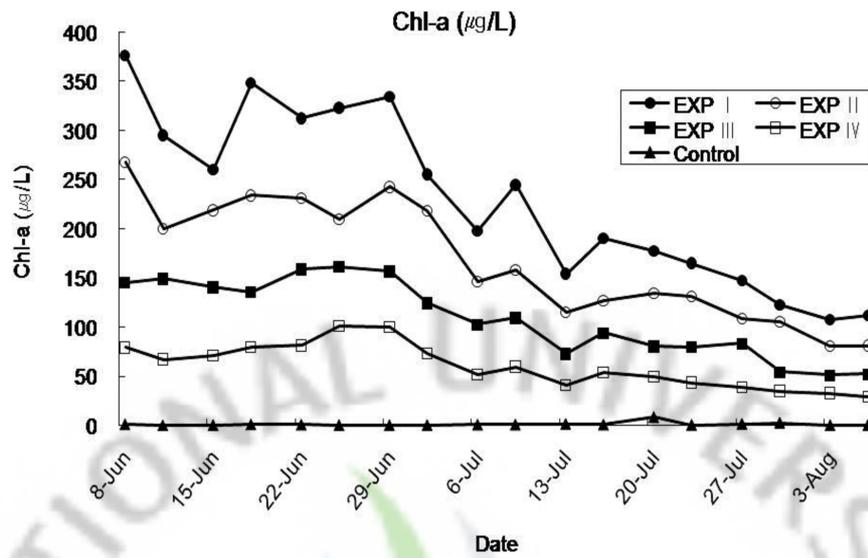


Fig. 31. Concentration of chlorophyll-a in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp *L. vannamei*.

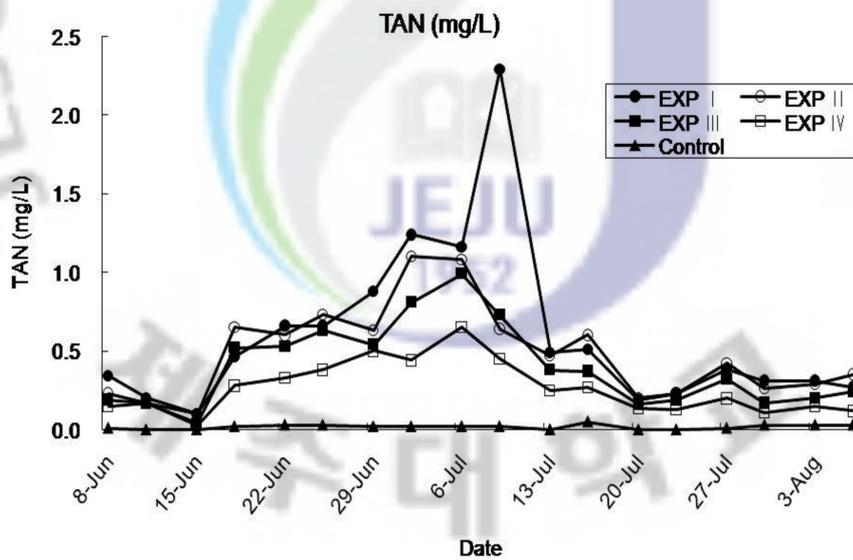


Fig. 32. Concentration of total ammonia-nitrogen (TAN) in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp *L. vannamei*.

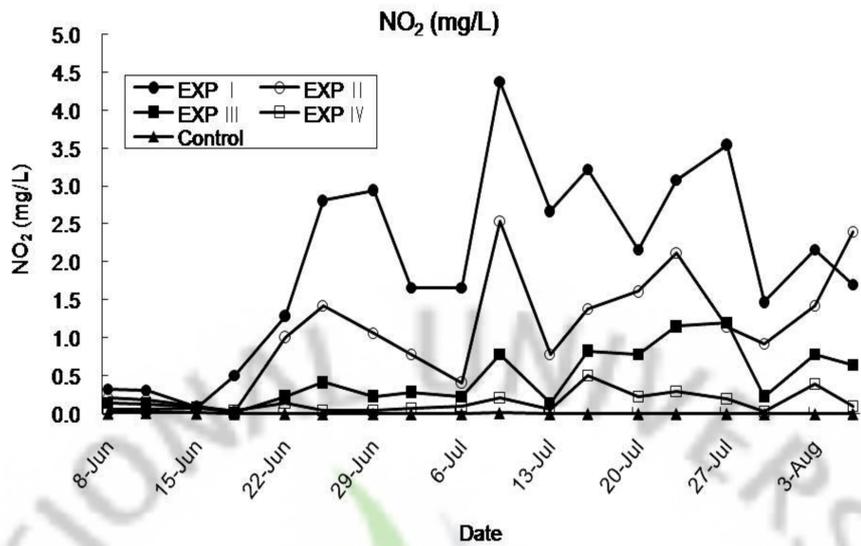


Fig. 33. Concentration of nitrite-nitrogen in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp *L. vannamei*.

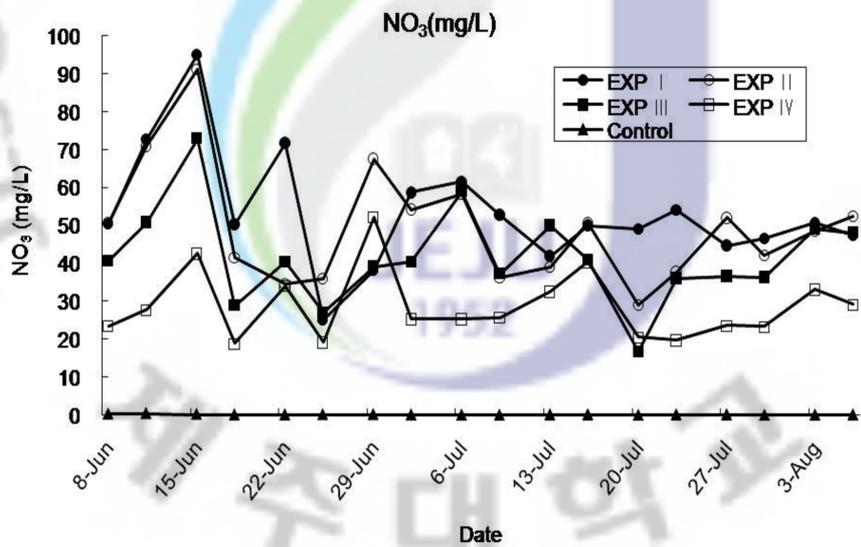


Fig. 34. Concentration of total nitrate-nitrogen in five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp *L. vannamei*.

### 3) 사육수의 총세균

전 기간 사육수의 unculturable bacteria의 수는 Exp.I에서 평균  $5.79 \times 10^6$ , Exp.II  $4.72 \times 10^6$ , Exp.III  $3.35 \times 10^6$ , Exp.IV  $2.68 \times 10^6$ 으로 biofloc 농도에 비례하여 낮아졌으며 control구는 0이었다. 총세균수는 실험 3주째인 6월 25일 가장 낮은  $4.58 \times 10^5$ - $9.20 \times 10^5$  /mL의 범위에서 5주째 다시 증가하여 최고 농도인  $1.17 \times 10^7$  /mL까지 상승하였다(Table 21, Figs. 35-36).



Table 22. Total bacterial counts of five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp *L. vannamei* (mean value based on 15-20 counts per tank)

Date	EXP I	EXP II	EXP III	EXP IV	Control
8-Jun-09	$4.22 \times 10^6$	$1.98 \times 10^6$	$2.63 \times 10^6$	$4.50 \times 10^5$	0
11-Jun-09	$4.41 \times 10^6$	$3.46 \times 10^6$	$2.73 \times 10^6$	$2.06 \times 10^6$	0
18-Jun-09	$2.13 \times 10^6$	$2.12 \times 10^6$	$1.56 \times 10^6$	$1.95 \times 10^6$	0
25-Jun-09	$9.20 \times 10^5$	$6.03 \times 10^5$	$6.87 \times 10^6$	$4.58 \times 10^5$	0
2-Jul-09	$4.79 \times 10^6$	$3.10 \times 10^6$	$2.41 \times 10^6$	$1.28 \times 10^6$	0
9-Jul-09	$1.17 \times 10^7$	$1.08 \times 10^7$	$6.41 \times 10^6$	$3.29 \times 10^6$	0
17-Jul-09	$5.25 \times 10^6$	$6.77 \times 10^6$	$6.00 \times 10^6$	$6.71 \times 10^6$	0
23-Jul-09	$6.20 \times 10^6$	$4.31 \times 10^6$	$3.16 \times 10^6$	$2.62 \times 10^6$	0
30-Jul-09	$1.15 \times 10^7$	$9.28 \times 10^6$	$4.64 \times 10^6$	$4.90 \times 10^6$	0
6-Aug-09	$6.77 \times 10^6$	$4.84 \times 10^6$	$3.27 \times 10^6$	$3.11 \times 10^6$	0
Mean	$5.79 \times 10^6$	$4.72 \times 10^6$	$3.35 \times 10^6$	$2.68 \times 10^6$	0.0

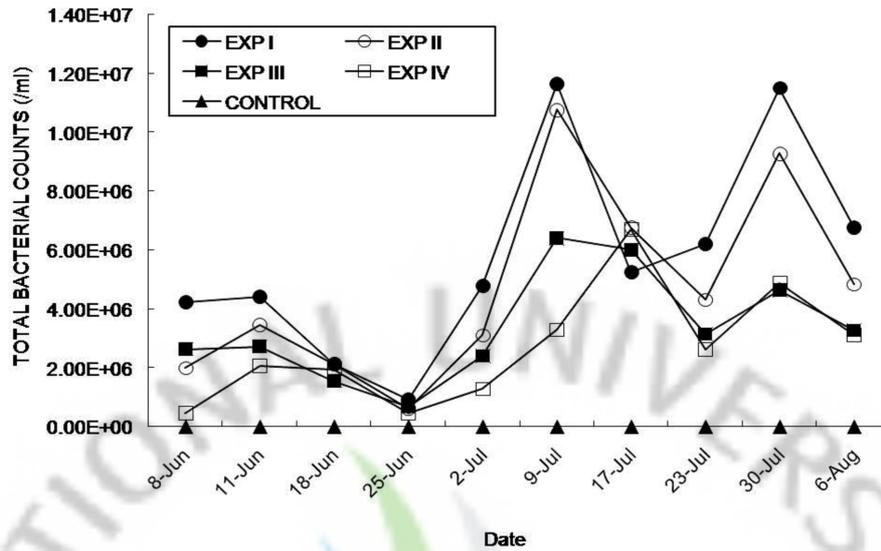


Fig. 35. Total bacterial counts of five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp *L. vannamei*.

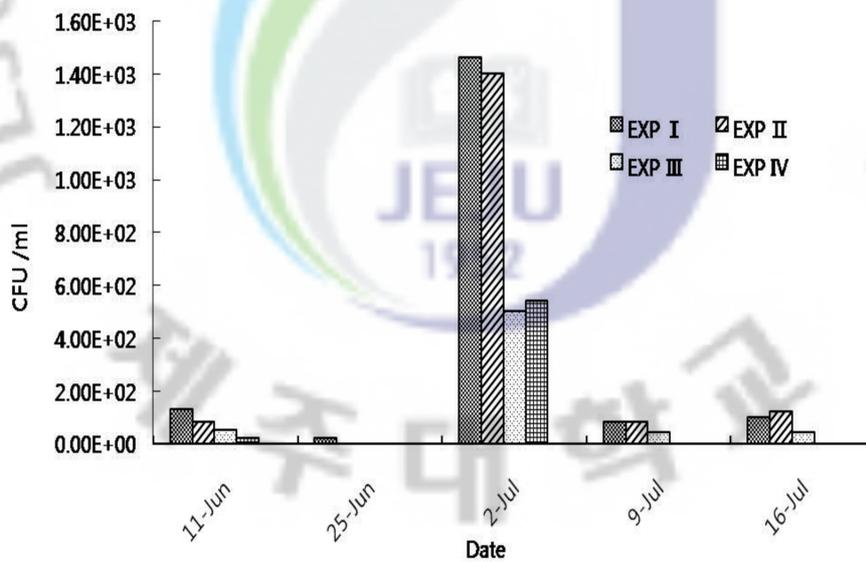


Fig. 36. Vibrio counts of five experimental groups during a 63-day culture trial with Pacific white shrimp *L. vannamei*.

#### 4) 면역력에 미치는 사육수의 효과

Biofloc이 흰다리새우의 면역기능의 증강 효과에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 실험구에서 사육한 새우의 총 혈구수(total haemocyte count, THC)와 혈구 종류별 출현빈도(Table 22), 혈구 종류별 출현 혈구수의 변화(Fig. 38)를 조사하였다. 그리고 면역활성을 탐색하기 위해 Phenoloxidase (PO)의 활성(Fig. 39)과 단백질의 농도(Fig. 40)를 조사하였다.

각 실험구의 THC는 대조구인 biofloc 0% 실험구에서  $2.30 \pm 0.25 \times 10^7$  cells/mL이었으며 biofloc이 25% Exp.IV에서는 THC가  $2.57 \pm 0.25 \times 10^7$  cells/mL로 약간 증가하는 경향이 있었으나 대조구와 유사하였다. 그러나 biofloc 50%와 75% 실험구 Exp.III과 Exp.II에서는 THC가 각각  $3.04 \pm 0.30 \times 10^7$  cells/mL과  $2.67 \pm 0.29 \times 10^7$  cells/mL로 대조구에 비해 유의하게 증가하였다. 반면 biofloc 100% Exp.I에서는 THC가  $1.79 \pm 0.25 \times 10^7$  cells/mL로 오히려 대조구보다 감소하였다(Table 22).

혈구 종류별 출현 빈도에 있어서 granular cell (GC)의 출현 빈도는 Exp.I 실험구가  $35.16 \pm 5.38\%$ 로 다른 실험구들보다 유의하게 높았으며, biofloc의 혼합비율이 적을수록 그 출현빈도는 점점 낮았다. 그리고 semigranular cell (SGC)의 출현빈도는 Exp.I 실험구에서  $52.89 \pm 4.85\%$ 로 가장 낮았으며, 그 외 실험구에서는 Exp.I에 비해 유의하게 높았다. 그러나 hyaline cell (HC)의 출현빈도는 대조구인 biofloc 0%인 실험구에서  $32.19 \pm 3.37\%$ 로 가장 높았으며 biofloc의 혼합 비율이 많아질수록 HC의 출현빈도는 낮아져 biofloc 100%인 Exp.I에서는  $11.95 \pm 2.04\%$ 로 가장 낮았다. 이 실험에서 일반적으로 모든 실험구에서 SGC의 출현빈도가 가장 컸으며 biofloc의 혼합비율이 클수록 GC의 출현빈도는 높아지고 반면 HC의 출현빈도는 낮아지는 경향이였다. 각 실험구에서 GC, SGC 그리고 HC의 혈구수의 변화(Fig. 11)는 Table 5의 혈구 종류별 출현빈도의 변화 양상과 비슷하였으나 GC와 SGC의 혈구수에서는 biofloc의 혼합비율이 Exp.II인 75%와 Exp.III인 50%가 가장 많았으며, HC의 혈구수는 biofloc의 혼합비율이 낮을 수록 많아지는 경향이였다.

PO활성(Fig. 40)은 biofloc 50%를 혼합한 Exp.3와 biofloc 25%를 혼합한 Exp.IV에서 PO활성이 각각  $0.64 \pm 0.05$ 와  $0.63 \pm 0.11$ 로 다른 실험구에 비해 유의하게 높은 값을 보였다. 반면에 biofloc이 혼합되지 않은 대조구에서는 PO 활성이  $0.20 \pm 0.03$ 으로 가장 낮았다.

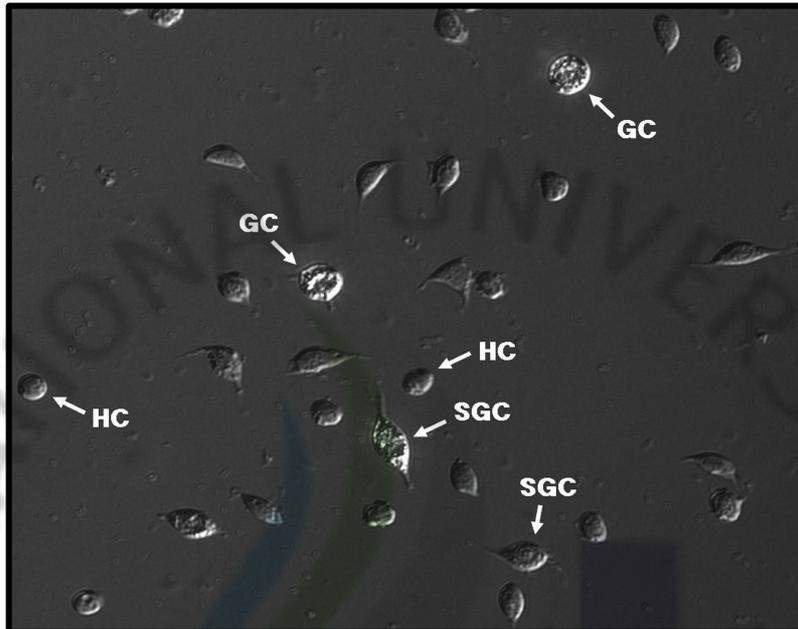


Fig. 37. Morphology of hemocytes in anticoagulant buffer imaged by phase-contrast light microscopy. GC: Granular cell with conspicuous large granules, HC: Hyaline cell with large nucleus and fewer cytoplasmic vesicles. SGC: Semigranular cells showing many cytoplasmic granules characteristically smaller than those of granular cells.

Table 23. Total haemocyte count and relative percentages of differential haemocyte count from haemolymph of *L. vannamei* reared in biofloc mixed water system

Experimental groups	% of biofloc	Total haemocyte count (cells/ml)	Differential haemocyte count (%)		
			GC	SGC	HC
Exp. I	100	$(1.79 \pm 0.25) \times 10^7$ <sup>a</sup>	35.16 $\pm$ 5.38 <sup>a</sup>	52.89 $\pm$ 4.85 <sup>a</sup>	11.95 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>
Exp. II	75	$(2.67 \pm 0.29) \times 10^7$ <sup>b</sup>	11.97 $\pm$ 1.27 <sup>b</sup>	74.97 $\pm$ 2.68 <sup>b</sup>	13.07 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>
Exp. III	50	$(3.04 \pm 0.30) \times 10^7$ <sup>b</sup>	5.60 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>	70.03 $\pm$ 2.00 <sup>b</sup>	24.37 $\pm$ 2.81 <sup>b</sup>
Exp. V	25	$(2.57 \pm 0.25) \times 10^7$ <sup>ab</sup>	4.05 $\pm$ 1.16 <sup>b</sup>	75.86 $\pm$ 3.16 <sup>b</sup>	20.09 $\pm$ 2.10 <sup>b</sup>
Control	0	$(2.30 \pm 0.25) \times 10^7$ <sup>ab</sup>	3.36 $\pm$ 1.57 <sup>b</sup>	64.45 $\pm$ 4.74 <sup>ab</sup>	32.19 $\pm$ 3.37 <sup>c</sup>

- GC : granular cell, SGC: semigranular cell, and HC: hyaline cell.

- Values are expressed as means $\pm$  SE (n = 15).

- Within this column, values followed by the same letters did not differ significantly ( $P > 0.05$ ).

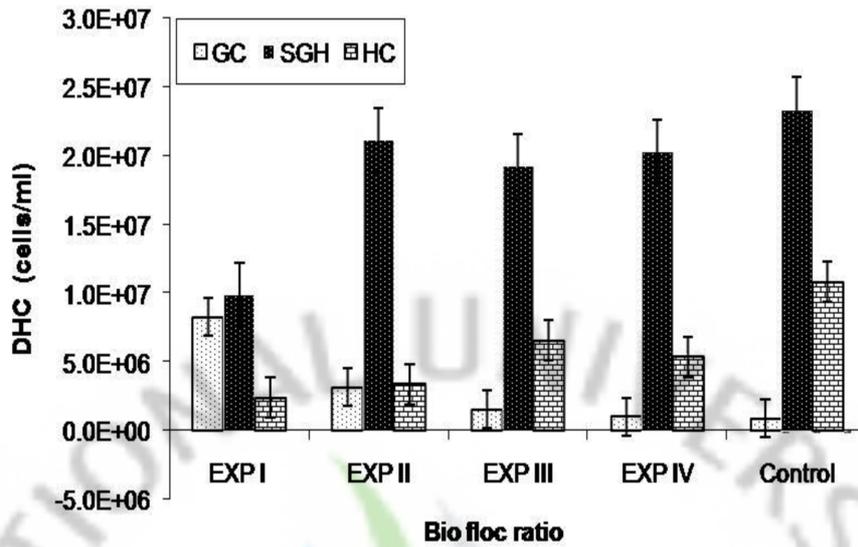


Fig. 38. Changes of differential haemocyte count from haemolymph of *L. vannamei* reared in biofloc mixed water system.

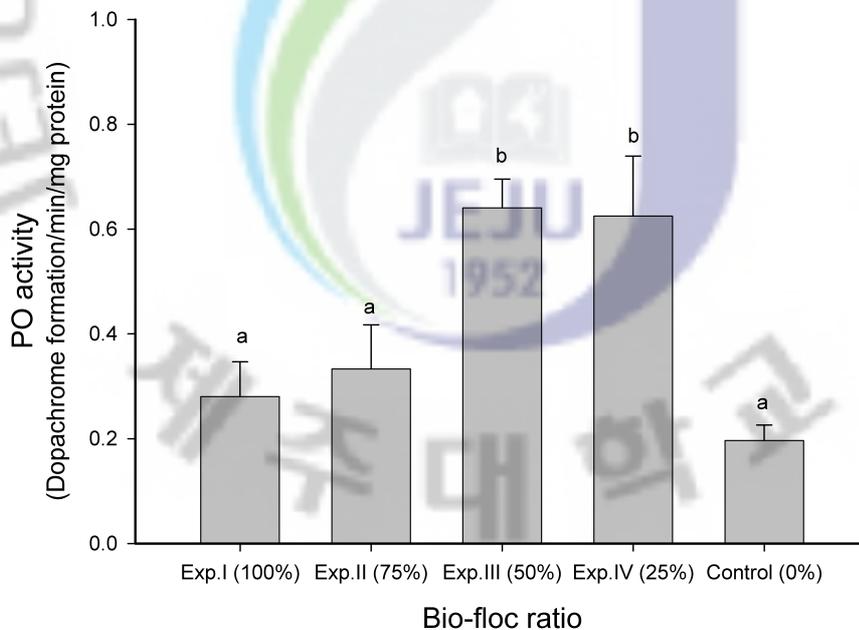


Fig. 39. Change of phenoloxidase (PO) activity into haemocyte from *L. vannamei* reared in various biofloc mixed water systems. Each point and bar indicates mean and standard error. Bars with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

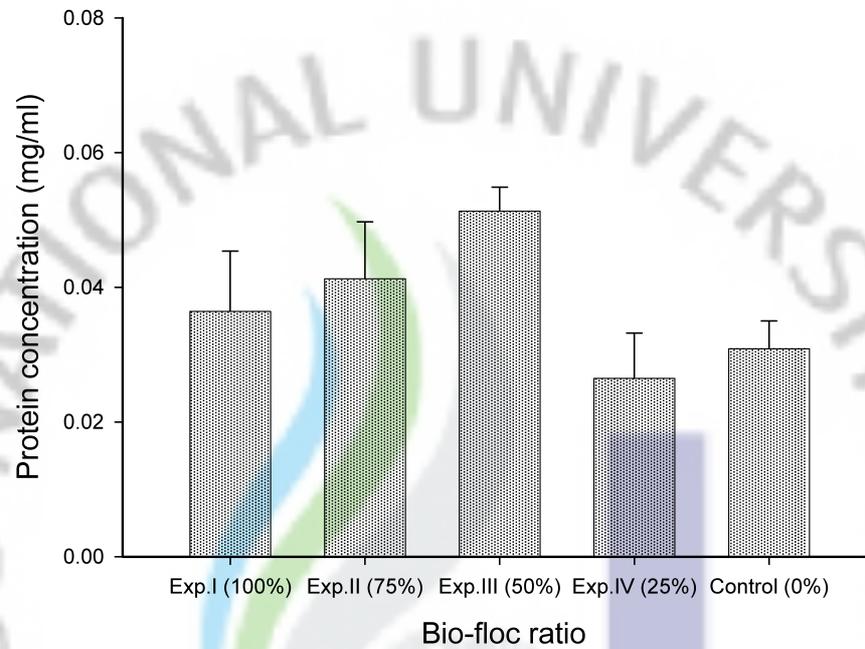


Fig. 40. Change of protein concentration of haemocyte from *L. vannamei* reared in various biofloc mixed water systems. Each point and bar indicates mean and standard error.

## IV. 고찰

### 1. 활성유기물 부유법을 이용한 축제식 고밀도 양식

**생산량 및 생존율** : HDPE liner pond에 흰다리새우 postlarva를 300 마리/m<sup>2</sup>의 밀도로 입식하고 사육수 교환없이 91일간 양식한 결과, pond 1과 2에서 각각 1,362 kg, 1,282 kg의 수확을 하였다. 단위면적당 생산량은 pond 1과 2가 각각 2.48, 2.33 kg/m<sup>2</sup>로서 지난 10년간 전국 평균 생산량인 0.112 kg/m<sup>2</sup>의 각각 22배, 20배 높으며, 정상 수확한 축제식 양식장의 생산량(0.3 kg/m<sup>2</sup>)보다도 약 8배가 높은 결과로서 현재까지 우리나라 축제식 새우양식에서 가장 높은 기록이다.

이와 유사하게 Browdy et al. (2001)은 0.25 ha의 HDPE pond에서 104 마리/m<sup>2</sup>의 밀도로 입식하고 사육수의 교환없이 단백질 함량이 다른 사료를 공급하여 흰다리새우를 양식한 결과, CP 30%과 CP 40% 실험구에서 각각 0.99 kg/m<sup>2</sup>, 1.0 kg/m<sup>2</sup>를 생산하였다. 이들의 생존율은 74.5-78.6%로서 이 연구의 70.1-72.6%와 비슷하지만 단위면적당 생산량은 이 연구의 약 40%에 머무르는데 이것은 입식밀도의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. McIntosh (2000a,b,c, 2001)는 중미에 위치한 Belize Aquaculture, Ltd. (BAL)에서 2000년에 활성유기물 부유방식과 더불어 질소의 비(C/N ratio)를 16:1까지 높임으로써 총면적 13.44 ha의 HDPE 양식장에서 평균 1.5 kg/m<sup>2</sup>의 높은 생산량의 흰다리새우를 수확하였으며 이는 1998년 대비 55%, 1999년 대비 14%가 증가한 생산량이다. 또한 사료에 어분 대신 밀이나 옥수수를 사용한 grain-based pellet (CP 18.5%)을 혼합 공급할 경우 C/N ratio가 20:1까지 상승하여 타가영양세균의 발달을 촉진시킨다(McIntosh, 2001). 유기탄소(organic carbon)은 질소와 더불어 타가영양세균의 성장에 필수적이며 타가영양상태를 잘 발달시키기 위해서는 높은 C/N ratio를 유지하는 것이 유리하다(Avnimelech, 1999; Ebling, 2008).

Samocha et al. (2007)은 40 m<sup>2</sup>의 raceway형 수조에서 다양한 농도의 당밀을 공급하여 흰다리새우를 중간육성한 결과, 높은 C/N ratio는 암모니아와 아질산염의 농도를 효과적으로 떨어뜨리지만 7.8 m<sup>2</sup>의 소형수조 실험에서는 유의적인 차이를 발견하지 못하여 C/N ratio는 사육환경에 따라서 암모니아 제거에 영향을 미친다는 것을 시사하였다. 이 연구에서 CP 38%의 배합사료를 사용하면서 주기적으로 당밀을 공급하여 평균 C/N ratio를 12 : 1로 높여주었다.

이 연구 결과 생산량은 일반 축제식이나 선행 연구들에 비해서 매우 높았지만 수

확시 새우의 평균 체중은 pond 1과 2가 각각 12.5 g, 12.2 g으로 우리나라의 일반 축제식에서 생산되는 평균 체중인 20.0 g보다 크게 작다. Browdy et al. (2001)은 이 연구 지역(북위 36.5°)보다 약간 낮은 위도인 미국의 사우스캐롤라이나(북위 34°)에서 104마리/m<sup>2</sup>의 흰다리새우를 사육한 결과, 이 연구와 유사한 체중인 11.7-12.6 g의 새우를 수확하였는데 이러한 낮은 성장률은 고밀도 양성에 기인하는 것인지는 확실치 않다. McIntosh (2008)은 보다 저위도 국가인 태국(중심 북위 14°)에서 기후대가 다른 3개 지역의 양식장을 선정하여 이 연구와 동일한 방식으로 고밀도로 흰다리새우를 양식한 결과, 기온이 높은 남부 양식장에서는 평균 체중 18.3 g을 얻었으나 동북부와 중부에서는 체중이 각각 17.5 g, 16.2 g으로 밀도 뿐 아니라 기후에도 영향을 받는 것으로 보고하였다. 이 연구는 종묘의 생산시기가 지연된 관계로 일반 축제식 양식장의 입식시기보다 5-6월보다 1-2개월 늦은 7월 10일 입식하여 10월 8일까지 91일간 사육하였기 때문에 성장기간의 부족으로 수확시 체중이 적을 가능성이 있다. 또한 일반 축제식보다 10배의 높은 고밀도 사육과 고위도 지역의 낮은 기온에 기인하는 것으로 판단된다. 이 실험에서 얻은 새우의 최종 체중이 우리나라의 기후에서 300마리/m<sup>2</sup>의 고밀도로 새우양식을 할 경우의 한계 체중인지 확인하기 위해서는 향후 밀도에 따른 세부적인 연구가 필요하다.

FCR의 경우, Browdy et al. (2001)은 CP 30%, 40%에서 각각 1.89, 1.92로서 CP 38% 사료를 공급한 이 연구의 1.38-1.39 보다 약 38%가 높다. 일반 축제식 양식장에서도 FCR은 1.7-2.0의 범위로 이 연구보다 크게 높으며 새우의 사육밀도가 높을수록 일반적으로 사료효율은 떨어지는 경향이 있다. BAL의 경우, 이 연구와 유사한 양식환경하에서 CP 22%의 사료를 공급하여 FCR을 2.2에서 2.0까지 떨어뜨린 것으로 보고하였다(McIntosh, 2001). 이 연구에서 사료효율이 좋은 이유는 체계적인 사료관리와 잘 형성된 biofloc 때문으로 판단된다. 효율적인 사료관리(feed management)는 새우의 생산비를 낮출 뿐 아니라 사육수 수질악화를 감소시키는 가장 중요한 양식관리 요인의 하나이다(Jory, 1995). 과잉 공급된 사료는 새우의 소화력을 저하시키며 잔량의 사료는 사육지 바닥에 축적되어 수질을 악화시킨다. 뿐만 아니라 사료공급은 새우의 상태, 새우의 분포 상태, 저질의 상태, 주야간 섭식습성 등에 따라서 적절히 조절하는 것이 바람직하다(Clifford, 1992). 이 연구에서 사료의 공급량은 1차적으로 새우의 주간성장율(weekly growth rate)을 측정하여 결정하였으며, 부가적으로 먹이망(feeding tray)의 조사, 새우의 탈피주기와 날씨의 변화 등을 관찰하여 과잉의

사료가 공급되지 않도록 사료량을 조절하였다. 이 연구에서 얻어진 낮은 FCR은 biofloc이 새우의 추가적인 먹이로 이용되었기 때문일 수도 있다. Avnimelech (1994)는 활성유기물 부유 방식의 틸라피아 양식장에서는 탄소와 질소의 비율(C/N ratio)를 적절히 조절하면 타가영양세균군(heterotrophic bacterial community)이 발달하며 세균군은 암모니아를 세균단백질로 동화함으로써 암모니아농도를 저하시키고 잘 발달된 세균군은 세균총(bacterial floc or biofloc)을 형성하여 틸라피아(*Tilapia mozambica*)는 biofloc을 섭식 하는것을 관찰하였다. 활성유기물 부유 방식에서 heterotrophic bacteria의 발달과 biofloc의 형성은 새우양식에도 많이 적용되고 있다. Biofloc은 타가영양세균으로만 구성되기 보다는 동식물플랑크톤, 유기물 등이 복합적으로 구성되며 다양한 영양분과 미량원소가 포함되어 새우의 성장, 생존을 및 사료효율에 많은 기여를 하고있다(Moss et al., 1999; Browdy et al., 2001; Burford and Lorenzen, 2004; Avnimelech, 2006; Wasielesky et al., 2006). 이 연구에서 흰다리새우의 잡식(omnivorous) 습성을 고려할 때 biofloc이 추가적인 먹이로 작용하여 사료효율의 향상에 기여했을 것으로 판단된다.

**사육수의 수질환경 :** 고밀도 양식에서 암모니아성 질소는 가장 큰 제한요인의 하나이다. 이 실험기간 동안 총암모니아성 질소(TAN)는 pond 1과 2가 각각 2.7, 2.43 mg/L로서 이중 독성이 되는 비이온화 암모니아는 평균 수온 25℃, pH 7.4를 기준으로 환산하면 0.038, 0.034 mg/L에 해당한다. 이러한 농도는 새우의 성장 적정 한계인 0.03 mg/L에 근접하지만 만성적으로 영향을 미치는 한계 암모니아 농도인 0.1 mg/L에는 크게 못 미친다(van Wky et al., 1999). 새우는 성체보다 유생시기가 암모니아에 대한 내성이 낮다. 홍다리얼룩새우(*Penaeus monodon*)의 postlarva의 경우, 96hr-LC<sub>50</sub>는 암모니아 농도가 0.2 mg/L이지만(Chen and Chin, 1988), 4.87 g의 치하는 0.95 mg/L로 높아진다(Chen and Lei, 1990). TAN의 농도는 7월말까지 1.0 mg/L를 유지했지만 2개월째인 8월에는 2-10 mg/L로 증가한 후 다시 떨어지는 경향을 보였다. TAN이 높았던 8월의 새우 체중은 1-5 g으로 이 기간 동안의 평균 암모니아 농도는 0.1 mg/L보다 낮아 새우의 성장에 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다.

아질산성 질소(nitrite-N)의 평균 농도는 pond 1과 2가 각각 6.0, 5.3 mg/L였으며 TAN이 감소하는 8월말부터 급격하게 증가하는 경향을 나타냈다. 아질산염의 형성은 질화과정(nitrification)의 첫 번째 과정으로 암모니아의 산화에 의하여 만들어지는데 새우의 성장에 적합한 농도는 1.0 mg/L 이하로 알려져 있다(van Wky et al.,

1999). Chen and Chin (1988)과 Chen and Lei (1990)은 홍다리얼룩새우의 암모니아 독성연구와 마찬가지로 아질산염에 대한 96hr-LC<sub>50</sub>를 조사한 결과, 유생과 치하가 각각 12.6, 171 mg/L 이었다. 그러나 흰다리새우는 일반적으로 홍다리얼룩새우보다 아질산염에 대한 내성이 높다. Cohen et al. (2005)은 활성유기물 부유방식의 흰다리새우의 중간육성에서 아질산염 농도가 26 mg/L의 아질산염 농도가 1주일간 지속되었으나 새우의 생존과 성장에는 영향을 미치지 않았으며, Mishra et al. (2008)도 20 mg/L의 아질산염 농도가 2주간 계속되었으나 96.2%의 생존율을 얻었다. 이 실험에서 아질산염 농도가 가장 높았던 9월 중 20 mg/L 이상은 2일간 으로 새우의 성장과 생존에 치명적인 영향은 미치지 않은 것으로 판단된다. 그러나 9월 평균 농도는 13.6 mg/L로서 이러한 농도에 장기간 노출이 되면 새우의 성장에 많은 영향을 미칠 것으로 사료된다.

아질산염의 농도가 TAN의 감소와 더불어 급격히 증가하는 것은 이 실험에서 자가영양세균(*autotrophic bacteria*)에 의한 질산화 과정이 진행되는 증거이다. 타가영양상태가 잘 발달된 축제식 양식장이라도 식물플랑크톤과 *Nitrosomonas*와 같은 세균에 의한 자가영양에 의한 TAN의 질산화과정이 함께 진행된다(Boyd and Clay, 2002; Cohen et al., 2005). 이 연구에서는 사육수를 최소한으로 교환하면서 추가적인 당밀을 공급함으로써 질소와 유기탄소의 높은 농도를 지속시키고 충분한 양의 산소와 폭기를 함으로써 타가영양상태의 발달과 biofloc의 형성을 촉진시켰다. 이와 같은 사육조건 하에서 높은 생산성을 얻었으나 이 연구에서 타가영양세균이 얼마나 발달하고 우점하였으며 결과적으로 형성된 biofloc이 이 연구결과에 어느 정도 기여했는지는 분명하지 않다. 많은 선행 연구들이 이와 유사한 조건에서 타가영양상태의 발달과 역할을 보고하고 있지만 biofloc의 성장에 미치는 효과와 같은 소수의 응용적인 연구(Wilson et al., 2006)를 제외하고는 타가영양세균의 종조성과 기능에 대한 연구는 전무하다. 이러한 이유 중의 하나는 타가영양세균의 대부분은 배양 불가능한 세균(*unculturable bacteria*)으로서 접근방법이 매우 어렵기 때문이다. 향후 GS-FLX 등과 같이 많은 유전자를 동시에 동정할 수 있는 초고속 pyrosequencing 방법(Metzker, 2005; Nyren, 2007)을 이용하여 사육수의 세균군집에 대한 분석이 필요할 것이다.

## 2. 활성유기물 부유법에 의한 고밀도 중간육성 및 중간양성

**중간육성** : 활성유기물 부유방식으로 흰다리새우 유생을 35일간 중간육성을 실시하는 동안 총 암모니아성 질소(TAN)와 아질산성 질소(NO<sub>2</sub>-N)의 평균 농도는 각각 3.86, 7.74 mg/L으로 매우 높은 농도였다(Table 1; Fig. 2). TAN은 사육 10일째 20 mg/L까지 상승한 이후 3주 이후부터는 낮은 농도를 유지하였으며 아질산염의 농도는 3주째부터 급격하게 상승하였는데 이러한 질소화합물의 심한 농도 변화는 활성유기물 부유방식의 새우양식에서 흔히 나타나는 것으로 주로 식물플랑크톤과 질화세균에 의한 질화과정에 기인한다(Avnimelech, 1999; Browdy et al., 2001; Thakur and Lin, 2003). 그럼에도 불구하고 이 연구에서 나타난 질소화합물의 농도는 비슷한 방식을 이용한 다른 연구들과 비교하여 여전히 높다고 할 수 있다. Mishra et al. (2008)은 사육수 교환율 3.35%/day로 71일간 흰다리새우를 중간육성한 결과 TAN의 평균농도는 2.56 mg/L 이었으며, Samocha et al. (2007)은 60일간의 사육에서 0-8.62 mg/L (평균 1.0 mg/L)의 범위였다. 활성유기물 부유방식 사육에서는 처음에는 TAN가 증가한 후 점차 감소하는 것이 일반적인데, TAN의 농도의 변화와 감소하는 기간은 초기 사육수에 존재하는 식물플랑크톤의 역할에 의해서도 좌우되지만 질화세균군(nitrifying bacterial community)의 발달과 사육수의 유기물 및 탄소의 양과 밀접한 관계를 갖는다(Zhu and Chen, 2001; Cohen et al., 2005). 이 실험에서 평균 TAN 농도가 높은 원인 중의 하나는 종묘입식 전에 사육수에 질화세균 및 타가영양세균의 활성화를 위한 에너지원으로 과량의 새우사료(탄소원과 질소원으로서)를 공급하였기 때문으로 추측된다 (1일째 TAN 농도 5.0 mg/L). 그러나 3주째부터 TAN은 0.2-3.0 mg/L의 범위로 급격히 낮아지는데, 이것은 아질산염으로의 질화과정이 촉진되면서 사육수는 점차 식물플랑크톤의 자가영양상태에서 세균군(biofloc)으로의 천이가 진행되는 것으로 해석된다.

암모니아(NH<sub>3</sub>)와 아질산염은 새우에게 매우 유독하며 독성의 정도는 종의 내성, 노출기간 및 pH, 수온, DO 등의 수질환경요인에 좌우된다(Hargreaves, 1998; Sower et al., 2004; Barajas et al., 2006). 이 연구와 유사한 환경에서 중간육성을 실시한 Mishra et al. (2008)은 TAN의 최고 농도가 27.04 mg/L 조건 하에서 약 96%의 생존율을 얻었지만, 이 연구에서는 최고 20 mg/L의 TAN 농도에서 생존율 58.1-93.6%를 얻은 것과 비교하면 생존율에 있어서 상당한 차이가 있다. 그러나 이 연구에서 새우에게 직접 해를 입히는 비이온화 암모니아 농도는 2.2 mg/L (pH 8.2, 수온 29.4°C)

이었으며, 후자의 경우는 약 0.19 mg/L (pH 6.8, 수온 28.0°C)로서 pH에 따라서 비이온화 암모니아의 농도가 크게 차이가 나는 것을 알 수 있다. 암모니아에 대한 노출이 비록 단기간(최대 24시간)이라 하여도 이것이 어느 정도 새우에게 스트레스로 작용했는지는 정확히 알 수는 없지만, TAN 농도가 10일째까지 4.0 mg/L (약 0.4 mg/L NH<sub>3</sub>) 이상으로 계속 유지된 점으로 미루어 새우의 초기 성장과 생존에 적지 않은 스트레스로 작용했을 가능성이 높다.

아질산염의 농도는 모든 tank에서 TAN의 농도가 감소하기 시작하는 3주째부터 급격하게 증가하여 사육 26일째부터 10-32 mg/L의 농도가 지속되었다(Fig. 2). 정도의 차이는 있지만 사육 후반기에 나타나는 아질산염 농도의 상승은 활성유기물 부유방식 고밀도 사육시스템을 이용하는 다른 연구에서도 자주 관찰된다(Samocho et al., 2000, 2002; Browdy et al., 2001). Cohen et al. (2005)는 50일간의 흰다리새우 중간육성 과정 중 6주 이후부터 아질산염 농도가 10.9-26.4 mg/L으로 상승하였지만 새우의 성장과 생존에 영향을 미치지 않은 것으로 보고하고 있다. 활성유기물 부유방식에서는 아질산염 내성 현상이 자주 보고되는데 이것은 새우유생이 시간이 경과함에 따라 상승하는 아질산염의 농도에 적응하기 때문인 것으로 해석되고 있지만(Chen and Lei, 1990; Chen and Chin, 1988; Cohen et al., 2005), 이에 대한 정확한 기작과 내성 범위 등의 규명을 위해서는 앞으로 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이 연구에서는 후반기에 고농도의 아질산염에 노출된 tank 3과 4의 생존율이 각각 93.6, 58.1%로 크게 차이가 나는 점으로 미루어 이것이 아질산염에 의한 것인지 아니면 다른 환경요인에 의한 것인지는 확실치 않다.

사육기간 동안 사육수의 교환은 tank에 따라서 0.88-1.55%/day로서 다른 유사한 시스템의 1.1-3.35%/day와 비슷하거나 낮게 유지되었으나(Cohen et al., 2005; Mishra et al., 2008), 앞서 언급된 바와 같이 사육 후기에 급속도로 진행되는 아질산염의 축적은 본 시스템의 문제점으로 나타났다. 아질산염의 축적은 질산염으로의 산화과정이지연 혹은 억제됨으로서 발생하는데 이것은 사육수 내에 질산염이 과량으로 축적되어 있거나 용존산소의 부족 등에 기인하기도 한다. *Nitrobacter*와 같은 질화세균은 산소에 매우 민감하기 때문에 용존산소의 부족은 이 세균의 활성을 크게 떨어뜨리며 심할 경우에는 질산염이 아질산염으로 전환되는 역반응이 일어나기도 한다(Komaros et al., 1996; Komaros and Lyberatos, 1998; van Wyk., 1999).

활성유기물 부유방식에서 TAN과 아질산염의 농도를 낮추기 위해서 추가적으로

탄소(carbon)를 공급하기도 한다(Avnimelech, 1999; Samocha et al., 2007). 탄소는 새우사료에도 어느 정도 함유되어 있지만 외부로부터 추가적으로 탄소원(주로 당밀)을 공급함으로써 C:N ratio를 높여 줄 경우, 이들을 에너지원으로 하는 세균이 활성화되어 TAN과 아질산염을 질산염으로의 전환이 촉진된다. 또한 이러한 질소화합물은 세균단백질로 동화되어 새우의 추가적인 먹이원이 된다는 사실은 여러 연구에서 밝혀져 있으며(Avnimelech et al., 1994; Moss et al., 1999; Burford and Lorenzen, 2004). 이 연구에서는 탄소원으로서 당밀을 0.09-0.13 L/day의 양으로 공급한 결과, TAN 농도의 감소는 관찰되었지만 아질산염 농도의 변화는 크게 변화하지 않았다. 이것은 비교적 짧은 사육기간으로 충분하게 세균군이 안정화되지 못한 이유도 있을 수 있지만 시스템에 축적된 높은 질산염 농도에 기인할 수도 있다. 또한 질소화합물의 세균단백질로의 재동화 과정은 이 연구에서 이론적으로 낮은 FCR (0.59-0.70)을 설명해 줄 수 있다.

입식밀도가 9,090/m<sup>3</sup>으로 가장 높았던 tank 4의 생존율은 58.1%, 주간성장율(weekly growth rate)도 0.0158로 가장 낮았다. 입식밀도가 3,750-7,500/m<sup>3</sup>의 경우 생존율은 75.5-93.6%로서 비교적 높게 나타났으며 수확시 새우의 체중은 0.071-0.108 g으로 활성유기물 부유방식의 중간육성 시설과 방법은 양식현장에서의 활용 가능성을 충분히 보여주고 있다. 동 연구에서와 같이 1개월의 중간육성으로 약 0.1 g의 치하를 생산할 경우, 본 양성기간의 단축, 성장률 향상, 출하시기의 조절 등의 여러 가지 효과를 얻을 수 있다. 특히 흰다리새우는 대하와는 달리 인위적인 성숙유도가 가능하여 종묘생산 시기를 자유롭게 조절할 수 있기 때문에 중간육성 종묘의 조기 입식을 통한 양식새우의 조기 출하와 경우에 따라서는 연간 2회를 생산함으로써 양식경쟁력을 높일 수 있다.

이 연구결과(tank 3의 7,500마리/m<sup>3</sup> 기준)에 근거하여 100만 마리(약 3 ha 양식장의 입식량 기준)의 흰다리새우 유생을 중간육성 하기 위해서는 약 130톤의 사육수조가 필요하다. 그러나 향후 양식현장에서의 적용을 위해서는 보다 고밀도의 중간육성을 위한 대규모 시설에 대한 연구가 요구된다. 또한 이 연구에서 나타난 초기의 높은 TAN 농도와 후반기에 관찰되는 아질산염 농도의 급격한 증가 현상을 해결하기 위해서는 세균군의 활성화에 의한 종묘입식 이전의 사육수의 안정화와 탈질화를 위한 혐기성 수조와 같은 시스템 보완 등을 포함한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

**중간양성** : 중간육성(nursery culture)은 새우 종묘(postlarva)를 본양성 이전에 별도의 시설에서 1-2개월 사육하는 과정을 말하지만, 중간양성(post-nursery 혹은 intermediate culture)은 중간육성과 본양성 기간 사이에 새우의 밀도와 시설 등을 재조절하여 별도로 사육하는 단계를 말한다(Samocha et al., 2000). 중간육성은 생존율과 사료효율을 향상시키고 야외에서의 양성기간을 단축시키는 등의 장점으로 보편화된 과정의 하나이지만(Sandifer et al., 1991; Samocha et al., 2002) 중간양성은 적용된 사례가 많지 않다. Van Wyk (2000, 2001)는 순환여과방식(RAS)을 이용한 실내 고밀도 새우양식에서 중간육성, 중간양성 및 본양성을 각각 2개월씩 3단계 방식으로 운영한 결과, 기존의 1단계 방식보다 연간 생산량을 75% 이상 높임으로써 중간양성 단계의 효율성을 보여주었다. 상품크기의 새우를 실내 양식시설에서 생산하기 위해서는 약 5-6개월이 소요되는데, 1단계 방식은 연간 2회 수확할 수 있는데 비하여 3단계 방식은 이론적으로 6회 수확이 가능하다. 따라서 중간양성을 적용한 3단계 방식은 생산성 향상과 시설의 효율적인 운영 면에서는 바람직하지만 연중 안정적으로 종묘를 공급해야하는 부담이 뒤따른다.

이 실험은 중간육성을 마친 흰다리새우 종묘를 중간육성과 동일한 4개의 raceway tank에서 42일간 중간양성하여 체중 1.45-2.03 g의 새우를 2.49-4.22 kg/m<sup>3</sup> 생산하였다(Table 1). 이것은 새우종묘배양장의 평균 생산량 약 0.2 kg/m<sup>3</sup> (PL<sub>12-15</sub>의 종묘 60,000마리/m<sup>3</sup> 기준)의 12-20배, 일반 축제식 새우양식장(생산량 0.3 kg/m<sup>3</sup> 기준)의 8-14배에 달한다. 이에 앞서 Handy et al. (2004)은 74일간 흰다리새우의 중간육성을 통하여 3.18 kg/m<sup>3</sup>을 생산하였으며, Cohen et al. (2005)은 50일간 중간육성으로 4.33 kg/m<sup>3</sup>을 생산하여 이 연구와 비슷한 결과를 보여주었다. ASM방식을 이용한 중간육성에서 현재까지 보고된 가장 높은 생산량은 Mishra et al. (2008)이 얻은 7.64 kg/m<sup>3</sup>으로 이들은 수면적 68.5 m<sup>2</sup>의 raceway형 수조에서 흰다리새우 유생을 71일간 사육하였다.

ASM방식을 이용한 새우 고밀도 사육에서 생존율과 생산량은 사육수의 수질환경 및 영양염 농도에 크게 영향을 받는다(Barajas et al., 2006; Cohen et al., 2005). 이 연구에서의 생존율은 40.6-54.4%로서 이와 유사한 앞선 연구들에서 보고된 90% 이상(Cohen et al., 2005; Mishra et al., 2008)에 비해서 크게 낮았는데 이것은 사육수의

수질환경과 관련이 있는 것으로 추측된다. 활성유기물 부유방식의 새우양식시스템에서는 고밀도의 새우와 세균에 의한 산소의 소비, 유기물의 산화 등으로 용존산소가 크게 부족한 것이 일반적이지만, 사육기간 동안 모든 tank에서 용존산소는 새우의 산소요구량을 초과하는 5.0 mg/L 이상을 유지하였다. 이것은 시스템에 설치된 oxygen generator의 가동 및 venturi를 통한 지속적인 공기의 공급과 사육수의 교반에 의한 것으로 판단된다. pH는 사육 초기의 약 8.0에서 4주째까지는 6.5까지 하강하였으며, 이러한 양상은 ASM방식에서 자주 관찰되는 현상으로서 주로 활발한 질산화과정의 결과에 기인한다(Ebeling et al., 2006). 그러나 4주 이후에는 사육수 교환으로 pH는 7.0 전후를 유지함으로써 전반적으로 새우의 생존에는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

ASM방식에서 질소화합물( $\text{NH}_3$ 와  $\text{NO}_2\text{-N}$ )은 새우의 성장과 생존에 가장 큰 영향을 미치지만 농도의 조절이 가장 어려운 부분이기도 하다(Cohen et al., 2005; Samocha et al., 2007). 사육기간 동안 총암모니아성 질소(TAN)가 가장 높았던 tank 4에서 평균 농도는 1.42 mg/L이었지만 이중 유독성인 비이온화 암모니아( $\text{NH}_3$ ) 농도는 약 0.023 mg/L (tank 4의 pH 7.3, 수온 30°C 기준)으로 새우의 유해농도인 0.1 mg/L (van Wyk, 1999)에 비해 크게 낮다. 또한 tank 1과 4에서 하루 동안 TAN의 농도가 6.0 mg/L ( $\text{NH}_3$  0.096 mg/L) 까지 상승한 적이 있으나(Fig. 2) 이것도 새우의 생존에는 영향을 미칠 만한 농도는 아니었다. Wajsbrodt et al. (1990)에 따르면 이 연구에서와 비슷한 크기의 새우치하의 경우 96hr- $\text{LC}_{50}$ 의  $\text{NH}_3$  농도는 1.43 mg/L이며, Frias-Espicueta et al. (2000)은 흰다리새우 postlarva의 12hr- $\text{LC}_{50}$ 의 농도를 0.70 mg/L으로 보고하고 있어 이 연구에서 나타난  $\text{NH}_3$ 의 최고 농도와는 큰 차이가 있다.

아질산성 질소는 전 사육기간에 걸쳐 꾸준히 상승하여 2주째부터는 모든 tank에서 10 mg/L 이상의 높은 농도가 계속 유지되었으며 또한 전 기간의 평균 농도도 18.45-22.07 mg/L으로 높게 나타났다. 이러한 농도는 Sower et al. (2004)이 보고한 흰다리새우 치하의 아질산염에 대한 96h- $\text{LC}_{50}$  (8 mg/L)보다는 크게 높다. 그러나 활성유기물 부유방식에서는 사육 후반기로 진행됨에 따라서 질산염과 함께 아질산염 농도가 증가하는 현상이 나타나는 것이 일반적인데(Browdy et al., 2001; Cohen et al., 2005) 이러한 환경 하에서 새우는 시간이 경과함에 따라 점차 높은 아질산염 농도에 어느 정도 적응하는 것으로 알려져 있다(Chen and Lei, 1990; Chen and Chin,

1988). Cohen et al. (2005)은 흰다리새우의 중간육성 기간동안 26 mg/L 이상의 아질산염 농도가 1주일간 지속되었지만 97.5% 이상의 생존율을 얻었으며 이와 유사하게 Mishra et al. (2008)도 중간육성 과정에서 20 mg/L 이상의 농도가 2주간 지속되었으나 생존율 96.2%, 생산량 7.23 kg/m<sup>3</sup>을 수확하여 이러한 주장을 뒤받침 해준다. 그러나 이 실험에서는 모든 tank에서 10-45 mg/L의 높은 농도가 4주일 동안이나 유지되었으며 후반기의 4일 동안에는 35 mg/L 이상의 농도가 지속되어 앞선 연구들에서 관찰된 새우의 아질산염에 대한 적응한계를 범위를 벗어났을 가능성이 있으며 이것은 이 실험에서 얻은 낮은 생존율과 관계가 있을 것으로 판단된다. 그러나 이와 같이 장기간의 높은 아질산염의 농도에도 불구하고 타가영양을 기본으로 하는 이 실험에서 얻은 40% 이상의 생존율은 식물플랑크톤의 자가영양에 의존하는 축제식양식장 조건에서는 기대하기 불가능한 결과로서 충분히 주목할 만하다. 활성유기물 부유방식 조건 하에서의 새우의 아질산염에 대한 적응은 이 시스템의 중요한 장점의 하나가 될 수 있으며 적응능력의 범위와 기작에 관해서는 향후 많은 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

이 사육기간 동안 암모니아와 아질산염의 농도가 상승할 경우에는 일부의 사육수를 환수하거나 당밀을 공급하였다. 사육수의 평균 환수율은 2.7-3.4%/day로서 앞선 연구들의 1.1-3.59% (Cohen et al., 2005; Samocha et al., 2007; Mishra et al., 2008)와 크게 차이가 나지 않았다. 당밀은 질화세균의 질산화과정을 촉진시키기 위하여 C:N ratio를 높일 목적으로 사육수에 첨가하는 추가적인 탄소원으로 주로 사용되는데 (Avnimelech, 1999; Samocha et al., 2007), 이 실험에서는 TAN의 농도는 감소하지만 아질산염의 제거에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

질소화합물은 새우에게 유해하기도 하지만 ASM방식에서는 새우의 부가적인 먹이원으로 작용한다(Burford and Lorenzen, 2004). 이와 같은 조건 하에서 타가영양세균은 사육수의 유기질소를 동화하여 세균단백질로 전환시키는데, 과량으로 증식한 세균은 세균총(bacterial floc)을 형성하며 이것은 다시 잡식성인 흰다리새우에게 섭취되어 새우단백질로 전환된다(Avnimelech, 1999; Moss, 2000; McIntosh, 2001; Burford et al., 2004). 이러한 질소의 재동화 과정은 FCR을 낮추는데 크게 기여한다. 새우는 초기 성장 기간에는 FCR이 매우 높은 것이 일반적이지만 이 실험에서 얻어진 낮은 FCR (0.79-1.29)은 이러한 질소동화와 재순환과정을 설명해준다. 유사한 조건하에서 Mishra et al. (2008)은 1.03, Cohen et al., (2005)은 0.86-0.96의 FCR을 얻은 것으로 보

고하여 이 실험의 FCR 범위와 크게 차이가 나지 않는다.

중간양성은 종묘의 크기와 성장률 측면에서는 중간육성단계와 유사하지만 생산량의 극대화, 즉 최대 biomass를 얻기 위한 사육관리 측면을 고려하면 본 양성을 위한 연구들과 비교하는 것도 바람직하다. ASM방식을 이용한 본양성(grow-out) 시스템은 90년대에 기본형이 개발된 이래 주로 상업화를 위한 대형의 사육시스템의 개발과 새우생산에 의한 수익성 위주의 실험이 이루어졌기 때문에 정확한 연구결과가 보고되지 않는 경향이 있다. ASM방식을 이용한 대형의 상업용 양성시스템은 WMC (Waddell Mariculture Center, South Carolina, USA)에서 1999년 개발한 수면적 55 m<sup>2</sup>의 prototype과 2001년 시설한 282 m<sup>2</sup>의 그린하우스형 raceway가 대표적이다(Weirich et al., 2002). WMC는 이 시설을 이용하여 15.4 g의 흰다리새우를 3.3 kg/m<sup>2</sup> 생산하였으며(Weirich et al., 2002; McAbee et al., 2003) 이후 생산량은 매년 증가하여 현재는 6.8 kg/m<sup>2</sup>까지 생산이 가능한 것으로 알려져 있다(C. L. Browdy, personal communication). WMC 보다는 규모는 작지만 최근 TAES (Texas Agricultural Experiment Station, Texas, USA)는 중간육성용으로 개발된 수면적 68.5 m<sup>2</sup>의 시스템을 이용하여 94일간의 본양성을 실시한 결과, 18.4 g의 흰다리새우를 9.29 kg/m<sup>2</sup> 생산하여 상업화의 가능성을 보여 주었다(T. M. Samocha, personal communication). 전통적인 RAS 방식에 의한 새우의 양성기술로는 HBOI (Harbor Branch Oceanographic Institute, Florida, USA)에서 개발된 70 m<sup>2</sup> raceway system이 잘 알려져 있는데, 여기에서는 180일의 양성으로 14.1 g의 새우를 2.07 kg/m<sup>2</sup> 생산되어 ASM방식에 비해 생산성이 낮다(van Wyk, 2000, 2001).

이 실험에서 사용된 수면적 18 m<sup>2</sup>의 raceway (tank 3)에서 얻어진 4.22 kg/m<sup>2</sup>의 생산량은 앞서 보고된 본양성의 연구결과들과 크게 차이가 나지 않지만, 생산성이 높은 상업적 규모의 본양성 시스템을 개발하기 위해서는 효율적인 탈질소 과정의 시설을 포함한 시스템의 보완과 확장, 단백질 함량이 낮은 전용사료의 개발, 사육수의 수질관리 등에 관한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 3. 활성유기물 부유방식 사육수의 세균학적 특성

Heterotrophic bacteria는 pH, DO, 암모니아, 아질산염, 질산염 등의 수질환경은 미세한 변화에도 매우 민감하다(Timmons et al., 2002). 실험 day 0에 4개 tank 모두에서 구성비율의 차이는 있지만 7 genera의 hetero 혹은 autotrophic bacteria가 분리되었다. *Cyclobacterium* sp. and *Staphylococcus* sp. 는 오직 day 0과 day 42에만 발견되었다. Tank 1의 *Tenacibaculum* sp.와 tank 4의 *Pseudoalteromonas* sp. 와 *Vibrio* sp.는 전 기간에 걸쳐 나타났다. Day 15에 tank 1과 4에의 *Tenacibaculum* sp., *Pseudomonas* spp., and *Pseudoalteromonas* spp. 의 비율은 다른 세균군에 비해 높았는데 이것은 이 시기의 DO 농도의 증가(> 9 mg/L)에 의한 것으로 판단된다. 특히 *Tenacibaculum* sp. 는 자연상태에서 강한 호기성으로 알려져 있는데 (Pineiro-Vidal, Riaza & Santos 2008), 이 실험결과에서도 6 mg/L 이상의 DO 환경하에서 *Tenacibaculum* sp.가 잘 성장하였다. 이와 비슷하게 다른 호기성 세균군인 *Pseudomonas* spp. 와 *Pseudoalteromonas* spp. 도 높은 비율로 관찰되었는데 이들 세균군에 의해 사육수의 nitrification과 denitrification 과정이 일어나는 것으로 추측된다(Knowles, 1982).

이 실험에서 *Tenacibaculum* sp., *Pseudomonas* spp. 및 *Pseudoalteromonas* spp.는 *Microbacterium* spp.의 출현을 억제하는 것으로 추측된다. 이것은 이 실험에서 확인되지는 않았지만, 이들 3가지 세균군이 *Microbacterium* spp.의 성장을 길항적으로 억제할 수 있는 가능성이 있는데, 실제로 병원성 세균에 대한 길항작용은 수산양식의 환경 하에서 많이 알려져 있다 (Ringo and Gatesoupe, 1998; Verschuere et al., 2000).

이 실험에서 *Vibrio* spp.는 실험 시작일(day 0)의 tank 1 (11.1%)와 tank 4 (14.3%)를 제외하고는 전 기간에 걸쳐 대부분 매우 낮은 비율로 출현하였다. *Vibrio*는 다른 양식종과 마찬가지로 새우에게도 병원성이기도 하지만 많은 종들이 비병원성으로 아질산의 암모니아로의 환원이나 (Bonin, 1996) 다른 병원균의 경쟁적 억제 (competitive inhibition) 기능 등 유익한 역할을 수행하기도 한다(Vandenberghe et al., 1999; Moss et al., 2000). Vandenberghe et al., (1999)는 *L. vannamei*의 노플리우스와 조에아 유생사육시 유생의 건강도는 *V. alginolyticus*의 존재와 상관관계가 있음을 보고하였다. Moss et al., (2000)은 *L. vannamei*의 장내 세균상의 85% ( $10^9$  CFU/g of gut tissue)가 *Vibrio* spp.와 *Aeromonas* spp.로 구성되어 있음을 발견하였으며, Gomez-Gil et al., (1988)은 건강한 *L. vannamei*의 간체장과 혈림프에 각각  $10^5$  CFU/g,  $10^4$  CFU/mL의 높은 비율로 *Vibrio*가 존재함으로 발견하였다. 이 연구에서는 각 수조의

사육수에 다양한 농도로 존재하는 *Vibrio*의 기능은 조사되지 않았으며, 향후 보다 정확한 분석과 실험을 통하여 이들의 역할이 연구되어야 할 필요가 있다.

이 연구에서 분리된 총 313 bacterial isolate는 6개 group (gamma Proteobacteria, alpha Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Cytophagales-

Flavobacterium- Bacteroides), 13개 genus로 구분되었는데 이중 *Microbacterium* spp., *Tenacibaculum* sp., *Pseudomonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp. and *Vibrio* spp. 그룹이 우점하였다. ASM방식의 새우양식에서 이들 우점군의 역할은 향후 연구되어야 하며 또한 동정된 17종 외의 미동정 18종에 대한 추가적인 동정과 기능에 대한 연구도 이루어져야 할 것이다.

이 연구에서는 culturable bacteria만 조사, 분석되었으며 unculturable bacteria는 조사되지 않았다. 자연에 존재하는 많은 heterotrophic bacteria가 unculturable 종들임을 고려할 때 이 연구의 접근방법에는 많은 어려움이 있었다. ASM방식의 고밀도 새우양식에서 세균상의 정량적, 정성적 분석 시도에 많은 의미가 있다고 하겠다.

#### 4. 활성유기물 부유법의 사육수가 새우의 성장과 면역력에 미치는 영향

Biofloc은 일반적으로 다양한 종류의 미생물들의 복합체로서 구성되어 있으며 여기에 생물의 사체, 유기물의 파편, 원생생물, 조류 등 다양하고 복잡한 종류의 물질들이 혼합되어 이루어져 있다(Jorand et al., 1995). 대부분의 biofloc은 살아있는 미생물들로 이루어져 있으며 60~70%가 유기물질로 이루어져 있고 30~40%가 무기물질로 이루어져 있다(Wilen et al., 2003). 그리고 그 크기도 수  $\mu\text{m}$ 에서 1000  $\mu\text{m}$ 까지 다양하고 모양도 아주 다양하다(Chu and Lee, 2004; Schryver, et al., 2008). 따라서 biofloc은 양식장내의 새우의 먹이로 이용되어 질수 있으며 우수한 영양원으로 활용될 수 있음을 알 수 있다. 이 연구에서도 biofloc을 함유한 실험구에서 총 생체량이 대조구에 비해 높고 FCR에서는 대조구에 비해 매우 낮았다. 따라서 이러한 결과는 biofloc이 새우의 좋은 먹이로 이용되고 있음을 보여주고 있다.

또한 미생물의 세포벽을 구성하고 있는 주성분인  $\beta$ -glucan이나 lipopolysaccharide (LPS)들은 새우의 면역기능을 증강시킨다고 널리 알려져 있기 때문에 면역을 증강시키는 면역증강제로서의 기능을 할 가능성이 매우 높다 (Lee et al., 2000; Chang et al., 2003; Sritunyalucksana et al., 2002). 이 연구에서도 biofloc을 넣은 실험구가 biofloc을 넣지 않은 대조구에 비해 GC나 SGC의 출현 비율이 높고 또한 PO 활성화도

높다. 이러한 결과는 biofloc를 구성하고 있는 살아있는 미생물이나 그 사체들을 먹이로 이용하여 미생물의 세포벽을 구성하고 있는 성분인  $\beta$ -glucan이나 lipopolysaccharide(LPS)가 새우의 체내에서 면역증강 효과를 보여주었기 때문이라고 볼 수 있다.

새우의 가장 중요한 방어 시스템인 proPO activating system (proPO-AS) 면역 체계에서 박테리아 또는 바이러스가 체내로 침입하거나, 먹이로 체내에 유입되면 이들의 세포벽 구성성분인  $\beta$ -glucan이나 lipopolysaccharide과 같은 물질들이 체액 내의  $\beta$ -glucan binding protein ( $\beta$ -GBP)와 결합하고 (Vargas-Albores et al., 2000; Du et al., 2007; Okumura, 2007), 이어서 혈구 세포 중 과립성 세포 즉 granular cell (GC)과 semigranular cell (SGC)의 수용체와 결합하여 활성화 되면 활성화된 GC와 SGC에서는 탈과립(degranulation)이 일어난다. 이들 과립 내에는 proPO외에 pro-proPO activating factor, peroxinectin, crustin 등 면역관련 단백질들이 많이 존재한다 (Destoumieux et al., 2000; Vargas-Albores et al., 2004). 이 연구에서 혈구의 단백질 농도가 biofloc이 혼합된 실험구의 새우에서 biofloc을 혼합하지 않은 대조구에 비해 높고, HC의 수는 감소하고 GC와 SGC의 수는 증가하는 것으로 보아 biofloc을 먹이로 체내에 유입된 미생물들의 세포벽 구성성분인  $\beta$ -glucan이나 lipopolysaccharide가 면역과 관련된 여러 가지의 단백질을 생합성하는데 기여하고 있음을 보여주고 있다.

HC는 phagocytosis를 담당하고 있다고 알려져 있으며(Smith and Söderhäll, 1983; Söderhäll et al., 1986; Thörnqvist et al., 1994), GC는 proPO system에 관련된 물질의 저장 및 방출 그리고 Cytotoxicity에 관여한다고 알려져 있다 (Johansson and Söderhäll, 1985; Söderhäll et al., 1985). 그리고 SGC도 GC와 같이 proPO system에 관련된 물질의 저장 및 방출 그리고 cytotoxicity, encapsulation에도 관여하고 있다 (Smith and Söderhäll, 1983; Söderhäll et al., 1986; Thörnqvist et al., 1994; Persson et al., 1987; Kobayashi et al., 1990; Johansson and Söderhäll, 1985; Söderhäll et al., 1985). 이 연구에서 biofloc의 농도가 높은 실험구일 수록 GC의 비율이 높고 biofloc의 조성 농도가 낮을 수록 HC의 비율이 낮은 결과는 biofloc이 GC와 SGC의 활성화 야기시키지만 HC의 활성화에는 관계가 적다는 것을 보여준다. 이는 biofloc을 구성하고 있는 미생물들은 먹이로 이용되는 것들이며 병원성을 일으키는 미생물들은 매우 빈약하다는 것을 의미한다. 즉, biofloc의 미생물들은 대부분 소화 흡수되어 세포벽

구성성분인  $\beta$ -glucan이나 lipopolysaccharide가 체내에서 GC와 SGC의 활성을 야기시킬 뿐이며, 미생물 자체가 체내로 감염되어 이를 방어하기 위한 HC의 phagocytosis가 거의 일어나지 않고 있다는 것을 알 수 있다.

Biofloc 100% Exp. I에서 THC의 수가 가장 적고 biofloc 50% Exp. III에서 THC의 수가 가장 많았으며 또한 PO 활성도 높았다. 이러한 결과는 양식장 내의 적절한 biofloc의 농도조절이 요구된다. Chang et al.(2003)은  $\beta$ -glucan을 먹이에 섞어 먹였을 때  $\beta$ -glucan의 농도가 많을수록 THC의 수도 증가하지만  $\beta$ -glucan의 혼합 비율이 2%일 때는 오히려 감소하는 결과를 보여주고 있다. 또한 인위적으로 바이러스나 세균을 감염시켰을 때 일정 기간 동안 THC의 수가 감소하는 경향이 있다 (Yu,1993; Huaton et al., 1997; Goarant and Boglio, 2000; Song et al., 2003). 그러나 이러한 현상에 대한 원인규명이 미흡하여 앞으로 biofloc이 생체내 면역체계에 미치는 상세한 연구가 필요하다고 본다.

## 요 약

이 연구는 친환경적인 새우양식산업화를 위해 활성유기물 부유방식에 의한 흰다리새우의 사육환경 요소와 사육밀도에 따른 양성특성, 사육수 biofloc의 세균특성, 흰다리새우의 면역활성을 조사하였다. 수면적 550 m<sup>2</sup>의 HDPE(high density polyethlen) line pond에 흰다리새우의 postlarva를 300마리/m<sup>2</sup>의 밀도로 입식하고 사육수 교환없이 91일간 양식한 결과, pond 1과 2에서 각각 1,362 kg, 1,282 kg의 수확을 하였다. 단위면적당 생산량은 각각 2.48, 2.33 kg/m<sup>2</sup>로서 전국 평균 생산량인 0.112 kg/m<sup>2</sup>의 20-22배 높으며, 정상 수확한 축제식 양식장의 생산량(0.3 kg/m<sup>2</sup>)보다도 약 8배가 높았다. C/N ratio를 높이기 위하여 유기탄소원(당밀)을 추가적으로 공급하는 것은 사육수의 타가영양상태로의 전환을 촉진시키는데 효과가 있었다. FCR은 1.38로서 일반 축제식에 비해 약 40% 낮았으며 이것은 효율적인 사료공급체계와 사육수의 biofloc이 추가적인 먹이원으로 작용한 것으로 판단된다. 새우 체중은 12.2-12.5 g으로 성장률이 낮았는데, 이것은 짧은 양성기간, 고위도 지역에서의 고밀도 사육환경 등의 복합적인 요인에 기인하는 것으로 추측된다. 암모니아성 질소의 평균 농도는 0.038 mg/L, 아질산염은 6.0 mg/L 이하로서 사육수를 교환하지 않았음에도 불구하고 새우의 성장 적정범위 이하를 유지하였다. 따라서 활성유기물 부유방식을 이용한 축제식 양식장에서의 미생물총 기술은 수질의 악화와 바이러스 전염의 문제점을 해결해 줄 뿐 아니라 생산성을 크게 향상시킬 수 있음이 확인되었다.

활성 유기물 부유방식을 이용한 흰다리새우의 고밀도 육상수조 사육방법을 개발하기 4개의 raceway 수조(12.9 m<sup>2</sup> 및 18 m<sup>2</sup>)에서 흰다리새우의 중간육성과 중간양성 실험을 실시하였다. 중간육성 실험을 위하여 postlarva (PL<sub>3</sub>-PL<sub>10</sub>)를 3,750-9,090/m<sup>3</sup>의 서로 다른 밀도로 입식하고 35일간 사육한 결과, 생존율은 4,090/m<sup>3</sup> 밀도의 tank에서 93.6%로 가장 높았으며, 9,090/m<sup>3</sup>의 tank에서 58.1%로 가장 낮았다. 수확시 평균 체중은 0.071-0.108 g 이었으며 FCR은 0.59-0.70으로 매우 낮았다. TAN 농도는 사육 10일째 전 tank에서 20 mg/L까지 상승한 이후 점차 감소하여 3주째부터 크게 낮아졌으며 아질산염 농도는 3주째부터 급격하게 상승하여 타가영양상태로의 전환이 관찰되었다.

중간육성과 동일한 수조에 중간 육성된 흰다리새우 치하(B.W. 0.08-0.09 g)를

3,000-5,455 마리/m<sup>3</sup>의 밀도로 입식하고 42일간 환수율 2.7-3.4%/day로 중간 양성한 결과, 생산량은 2.49-4.22 kg/m<sup>3</sup>으로 일반 새우종묘배양장의 12-20배, 축제식 양식장의 8-14배에 달하였다. 수확시 tank에 따라서 새우의 평균 체중은 1.45-2.03 g, 생존율은 38.2-48.0%, FCR은 0.79-1.29이었다. 총암모니아성 질소의 농도는 평균 1.11-1.42 mg/L이며 최고 6.0 mg/L (NH<sub>3</sub> 농도, 0.096 mg/L)까지 상승하였으나 새우에게 영향을 미칠만한 농도는 아니었다. 아질산성 질소는 사육 초기부터 꾸준히 상승하여 전 기간 평균 18.45-22.07 mg/L으로 높게 유지되었다. 또한 아질산성 질소는 모든 tank에서 4주간 10 mg/L 이상의 농도가 지속되었으며 후반기 4일 동안은 35-45 mg/L의 높은 농도를 보여주어 새우의 생존에 영향을 미친 것으로 판단된다. 그러나 이 실험에서 보여준 장기간의 높은 아질산염의 농도에도 불구하고 최저 38%의 새우가 생존한 점은 미생물총이 잘 형성된 ASM 조건에서 아질산염에 대한 새우의 적응능력을 설명해주며 이에 대한 기작과 내성한계 등에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

활성 유기물 부유방식의 세균학적 특성을 조사하기 위하여 4개의 중간육성 raceway 수조로부터 배양가능한 세균종과 종조성을 분석하였다. Culturable bacteria의 총세균수는  $4.13 \times 10^5$ - $3.73 \times 10^6$  CFU/mL 범위였다. 배양된 세균은 생화학적 및 형태학적 특성에 근거하여 총 313 colony를 분리하였으며 이중 16S rRNA sequencing에 의하여 13속 57종을 확인하였고, phylogenetic tree가 작성하였다. 4개의 tank에서 공통적으로 우점하는 종은 *Microbacterium spp.*, *Tenacibaculum sp.*, *Pseudomonas spp.*, *Pseudoalteromonas sp.* and *Vibrio spp.* 이었다.

활성유기물 부유방식의 사육수가 흰다리새우의 성장과 면역기능의 증강 효과에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 실험구의 수질특성과 혈구세포의 활성도를 조사하였다. THC (total haemocyte count)는 대조구인 biofloc 0% (Control) 실험구에서  $2.30 \pm 0.25 \times 10^7$  cells/mL이었으며 biofloc이 25% (Exp.IV) 에서  $2.57 \pm 0.25 \times 10^7$  cells/mL로 유사하였다. 그러나 biofloc 50% (Exp.III)와 75% (Exp.II)에서는 THC가 각각  $3.04 \pm 0.30 \times 10^7$  cells/mL과  $2.67 \pm 0.29 \times 10^7$  cells/mL로 대조구에 비해 유의하게 증가하였다. 반면 biofloc 100% (Exp I)에서는 THC가  $1.79 \pm 0.25 \times 10^7$  cells/mL로 유의하지는 않지만 오히려 대조구보다 감소하는 경향을 보였다.

혈구 종류별 출현 빈도에 있어서 granular cell (GC)의 출현 빈도는 Exp. I 이 35.16±5.38%로 다른 실험구들보다 유의하게 높았으며, biofloc의 혼합비율이 적을수록 그 출현빈도는 점점 낮았다. 그리고 semigranular cell (SGC)의 출현빈도는 Exp. I 에서 52.89±4.85%로 가장 낮았으며, 그 외 실험구에서는 Exp. I 에 비해 유의하게 높은 값을 나타냈다. 그러나 hyaline cell (HC)의 출현빈도는 대조구인 biofloc 0% (Control)인 실험구에서 32.19±3.37%로 가장 높은 값을 보였으며 biofloc의 혼합 비율이 많아질수록 HC의 출현빈도는 낮아지는 경향을 보여 biofloc 100%인 Exp. I 에서 11.95±2.04%로 가장 낮았다. 이 실험에서 일반적으로 모든 실험구에서 SGC의 출현빈도가 가장 컸으며 biofloc의 혼합비율이 클수록 GC의 출현빈도는 높아지고 반면 HC의 출현빈도는 낮아지는 경향을 보였다. PO활성은 biofloc 50%(Exp.III)에서 PO활성이 0.614로 다른 실험구에 비해 유의하게 높고, 반면에 biofloc이 혼합되지 않은 대조구에서는 PO 활성이 0.197로 가장 낮았다.

이 연구에서 biofloc을 넣은 실험구가 biofloc을 넣지않은 대조구에 비해 GC나 SGC의 출현 비율이 높고 또한 PO 활성도 높게 나타났다. 이러한 결과는 biofloc를 구성하고 있는 살아있는 미생물이나 그 사체들을 먹이로 이용하여 미생물의 세포벽을 구성하고 있는 성분인  $\beta$ -glucan이나 lipopolysaccharide (LPS)들이 새우의 체내에서 면역증강 효과를 보여주었기 때문이라고 볼 수 있다.

## 참 고 문 헌

- Almeida, J.S., M.A.M. Rais and M.J.T. Carrondo. 1995. Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 46, 479-484.
- Austin, B. 1988. *Marine Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227-235.
- Avnimelech, Y. 2000. Nitrogen control and protein recycling: activated suspension ponds. *Global Aquaculture Advocate*, 3, 23-24.
- Avnimelech, Y. 2006. Bio-filters: The need for a new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering*, 34, 172-178.
- Avnimelech, Y., M. Kochva and S. Diab. 1994. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. *Israeli Journal of Aquaculture*, 46, 119-131.
- Barajas, F.M., R.S. Villegas, G.P. Clark, J. G. Mosqueda and B. L. Moreno. 2006. Daily variation in short-term static toxicity of unionized ammonia in *Litopenaeus vannamei* (Boone) postlarvae. *Aquaculture Research*, 37, 1406-1412.
- Bonin, P. 1996. Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: a dissimilatory pathway. *FEMS Microbiol Ecology*, 19, 27-38.
- Boyd, C.E. and J.W. Clay. 2002. Evaluation of Belize Aquaculture, Ltd: A Super-intensive Shrimp Aquaculture System. In: Review report prepared under the World Bank, Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific (NACA), World Wildlife Fund (WWF) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment, 1-17.
- Bratvold, D., J. Lu and C.L. Browdy. 1999. Disinfection and microbial community establishment and shrimp production in a prototype biosecure pond. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30, 422-432.

- Bratvold, D. and C.L. Browdy. 2001. Effects of plastic sand, or additional vertical substrates on shrimp production water quality and microbial ecology in an intensive culture system. *Aquaculture*, 195, 81-94.
- Briggs, M., S. Funge-Smith, R. Subasinghe and M. Phillips. 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. RAP publication 2004/10. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, 92 pp.
- Brock, J.A., R.B. Gose, D.V. Lightner and K. Hasson. 1997. Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the Americas. In: Diseases in Asian Aquaculture III. Fish Health Section., Flegel, T.W. and I.H. McRae, eds. Asian Fisheries Society. Manila, Philippines, 275-284.
- Browdy, C.L., D. Bratvold, A.D. Stokes and R.P. McIntosh. 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: The new wave. Browdy, C.L. and D.E. Jory, eds. Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture, *Aquaculture*, The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 20-34.
- Browdy, C.L. and S.M. Moss. 2005. Shrimp culture in urban, super-intensive closed systems. In: Urban Aquaculture. Costa-Pierce, B., A. Desbonnet, P. Edwards and D. Baker, eds. CABI Publishing, Oxfordshire, UK. 173-186.
- Burford, M.A. and K. Lorenzen. 2004. Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediments remineralization. *Aquaculture* 229, 129-145.
- Burford, M.A., P.J. Thompson, R.P. McIntosh, R.H. Bauman and D.C. Pearson. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system. *Aquaculture*, 232, 525-537.
- Campos, E., X. Flotats. 2003. Dynamic simulation of pH in anaerobic processes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 109, 63-76.
- Chang, C.F., M.S. Su, H.Y. Chen and I.C. Liao. 2003. Dietary  $\beta$ -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunology*, 15, 297-310.
- Chen, J.C. and T.S. Chin. 1988. Joint action of ammonia and nitrite on tiger prawn (*Penaeus monodon*) postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 19,

143-148.

- Chen, J.C. and S.C. Lei. 1990. Toxicity of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* juveniles. *Journal of the World Mariculture Society*, 21, 300-306.
- Clifford, H.C. III. 1992. Marine shrimp pond management: a review. In: Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. Chamberlain, G.W., J. Villalón and J. Wyban, eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 110-137.
- Cohen J.M., T.M., Samocha J.M., Fox R.L. Gandy and A.L. Lawrence. 2005. Characterization of water factors during intensive raceway production of juvenile (*Litopenaeus vannamei*) using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacultural Engineering* 32, 425-442.
- Cowey, C.B. & C.Y. Cho. 1991. Nutritional strategies and aquaculture waste. In: Proceedings of the 1st International Symposium on Nutritional strategies in management of aquaculture wastes using biological approaches. Cho, C.Y. and C.B. Cowey, eds. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 45-52.
- Davis, D. A. and C. R. Arnold, 1998. The design, management, and production of a recirculating raceway system for the production of marine shrimp. *Aquaculture Engineering*, 17, 193-211.
- Decamp, O., L. Conquest, J. Cody and I. Forster, 2007. Effect of shrimp stocking density on size-fractionated phytoplankton and ecological groups of ciliated protozoa within zero-water exchange shrimp culture systems. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38, 395-406.
- Destoumieux, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps and E. Bachère. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Science*, 113, 461-469.
- Du X.J, X.F. Zhao and J.X. Wang. 2007. Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Molecular Immunology*, 44, 1085-1094.
- Ebeling, J.M. and C. LaFranchi. 1990. Results of long-term weather and water quality

- monitoring at a shrimp pond research facility in Hawaii, Presented at the World Aquaculture Society Meeting, June, 1990, Halifax, Canada.
- Ebeling, J.M., M.B., Timmons and J.J. Bisogni. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257, 346-358.
- Ebeling, J. M. 2008. Carbon:Nitrogen balance impacts nitrogen removal process in microbial-based aquaculture system. *Global Aquaculture Advocate*, 11, 38-40.
- Estuardo C., M.C. Marti, C. Huilini, E.A. Lillo and M.R. von-Bennewitz. 2008. Improvement of nitrate and nitrite reduction rate prediction. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11, 1-10.
- FAO. 2006. State of world aquaculture 2006. FAO technical report. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Fishery Resources Division, Rome.
- Flegel, T.W. 1997. Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 433-442.
- Frias-Espericueta, M.G., M. Harfush-Melendez and F. Paez-Osuna. 2000. Effects of ammonia on mortality and feeding of postlarvae shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65, 98-103.
- Gilliland, S.E., F.F. Busta, J.J. Brinda and J.E. Campbell. 1976. Aerobic plate count. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Speck, M.L., ed. American Public Health Association, Washington, USA, 107-130.
- Goarant, C., E. Boglio. 2000. Changes in haemocyte counts in *Litopenaeus stylirostris* subjected to sublethal infection and to vaccination. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31, 123-129.
- Gomez-Gil, B., L. Tron-Mayén, A. Roque, J.F. Turnbull, V. Inglis and A.L. Guerra-Flores. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 163, 1-9.
- Handy, M., T. M. Samocha, S. Patnaik, R. L. Gandy and D. A. McKee. 2004. Nursery trial compares filtration system performance in intensive raceways. *Global*

- Aquaculture Advocate, 8, 77-79.
- Hargreaves, J.A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture pond. *Aquaculture*, 166, 181-212.
- Hauton, C., J.A. Williams and L.E. Hawkins. 1997. The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Marine Biological Ecology*, 211, 115-128.
- Heo, M.S., S.G. Sohn, D.S. Sim, J.W. Kim, M.A. Park, S.H. Jung, J.S. Lee, D.L. Choi, Y.J. Kim and M.J. Oh. 2000. Isolation and characterization of white spot syndrome baculovirus in cultured penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). *Journal of Fish Pathology*, 13, 7-13 (in Korean).
- Holt, J.G. 1984. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth edition, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Hopkins, J.S., P.A. Sandifer, C.L. Browdy and J.D. Holloway. 1999. Comparison of exchange and no-exchange water management for the intensive culture of marine shrimp. *Journal of Shellfish Research*, 13, 441-445.
- Itoi, S., A. Niki and H. Sugita. 2006. Changes in microbial communities associated with the conditioning of filter material in recirculating aquaculture systems of the puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Aquaculture*, 256, 287-295.
- Jang, I.K., H.S. Han and H.J. Lim. 2006. Viral infection rate in wild brood stock of the fleshy shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) from Korean waters. In: *Proceeding of the World Aquaculture Society, Firenze, Italy*, 95 pp.
- Jang, I.K., Y.R. Cho, J.Y. Lee, H.C. Seo, B.L. Kim, J.S. Kim and H.W. Kang. 2007a. Selective predatory effect of river puffer on WSSV- infected shrimp in culture of shrimp with river puffer under laboratory scale. *Journal of Aquaculture*, 20, 270-277 (in Korean).
- Jang, I. K., J.C. Jun, G.J. Jo, Y.R. Cho, H.C. Seo, B.L. Kim and J.S. Kim. 2007b. Polyculture of fleshy shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with river puffer (*Takifugu obscurus*) in shrimp ponds. *J. Aquaculture*, 20, 278-288 (in Korean).
- Jang, I.K. and J.C. Jun. 2005. Current status of shrimp diseases and its control in

- Korea. In: Proc. the 1st Korea-U.S. Seminar and Workshop on the Sustainable Marine Shrimp Culture, August 8-12, 2005, Incheon, Korea, 27-28.
- Jang, I.K., J.S. Kim, K.J. Cho, H.C. Seo, Y.R. Cho, A. Gopalakannan and B.L. Kim. 2008. Intensive culture of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under limited water exchange. I. Indoor nursery culture of postlarvae. Journal of Aquaculture, 21, 339-345 (in Korean).
- Jang, I.K., H.S. Han and H.J. Lim. 2006. Viral infection rate in wild brood stock of the fleshy shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) from Korean waters. Proceeding of the World Aquaculture Society, Firenze, Italy, 95 pp.
- Jang, I.K., X.H. Meng, H.C. Seo, Y.R. Cho, B.R. Kim, G. Ayyaru and J.S. Kim. 2009. A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstocks and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Aquaculture, 287, 40-45.
- Jayasree, L., P. Janakiram and R. Madavi. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). Journal of the World Aquaculture Society, 37, 523-532.
- Johansson, M.W. and K. Söderhäll. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish blood cells. Journal of Cell Biology, 106, 1795-1803.
- Johnson, C.N., S. Barnes, J. Ogle and D.J. Grimes. 2008. Microbial community analysis of water, foregut and hindgut during growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in closed system aquaculture. Journal of the World Aquaculture Society, 39, 251-25
- Jorand, F., F. Zartarian, F. Thomas, J.C. Block, J.Y. Bottero, G. Villemin, V. Urbain and J. Manem. 1995. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated-sludge flocs. Water Research, 29, 1639-1647.
- Jory, D.E. 1995. Feed management practices for a healthy pond environment. Pages 119-143 In: Swimming Through Troubled Water: Browdy C.L. and J.S. Hopkins, eds. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Kim, D.H., B.R. Kim, J.S. Kim, H.C. Seo, S.K. Kim, J.H. Kim and I.K. Jang, 2004.

- Combined effects of temperature and salinity on survival and hemolymph osmoregulation of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Aquaculture*, 246-250 (in Korean).
- Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46, 43-70.
- Kobayashi, M., M.W. Johansson and K. Söderhäll. 1990. The 76 kDa cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promote encapsulation in vitro. *Cell and Tissue Research*, 260, 113-118.
- Komaros, M. and G. Lyberatos. 1998. Kinetic modeling of *Pseudomonas denitrificans* growth and denitrification under aerobic, anoxic and transient operating conditions. *Water Research*, 32, 1912-1922.
- Komaros, M., C. Zafiri and G. Lyberatos. 1996. Kinetics of denitrification by *Pseudomonas denitrificans* under growth conditions limited by carbon and/or nitrate or nitrite. *Water Environment Research*, 68, 934-945.
- Landesman, L. 1994. Negative impacts of coastal aquaculture development. *World Aquaculture*, 25, 12-17.
- Leber, K.M. and G.D. Pruder. 1988. Using experimental microcosms in shrimp research: the growth enhancing effect of shrimp pond water. *Journal of the World Aquaculture Society*, 19, 197-203.
- Lee, S.Y., K.A. Soderhall. 2000. A Lipopolysaccharide-and  $\beta$ -1,3-Glucan-binding Protein from Hemocytes of the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 1337-1343.
- Lightner, D.V. 1999. The Penaeid Shrimp Viruses TSV, IHHNV, WSSV and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *Journal of Applied Aquaculture*, 9, 27-52.
- Lotz, J.M. and D.V. Lightner. 2000. Shrimp Biosecurity: Pathogens and Pathogen Exclusion. In: *Controlled and Biosecure Production Systems*. Bullis, R.A. and G.D. Pruder, eds. Proceedings of a Special Session - Integration of Shrimp and Chicken Models, The Oceanic Institute, Waimanalo, Hawaii, USA, 67-74.
- Main K.L. and P. Van Wyk. 1999. Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. In: *Florida Department of Agriculture and Consumer Services*. (P. Van

- Wyk. eds.) Tallahassee, Florida, USA, 1-5.
- Malone, R.F., B.S. Chitta and D.G. Drennan. 1993. Optimizing nitrification in beads filters for warm water recirculating aquaculture systems. In: Techniques for modern aquaculture.(J. K., Wang, ed.) American Society Aquaculture Engineering, St. Joseph, Michigan, USA, 315-325.
- McAbee, B.J., C.L. Browdy, R.J. Rhodes and A.D. Stokes. 2003. Greenhouse raceways considered for super intensive U.S. shrimp production. Global Aquaculture Advocate, 6, 40-41.
- McGinnis S. and T.L. Madden. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Research, 32, 20-25.
- McIntosh, R.P. 1999. Changing paradigms in shrimp farming: I. General description. Global Aquaculture Advocate, 2, 40-47.
- McIntosh, R. P. 2001. High rate bacterial systems for culturing shrimp. In: Brune, D.E., G. Schwartz, A.G. Eversoleb, J.A. Colliera and T.E. Schwedler, eds. Proceedings from the Aquacultural Engineering Society's 2001 Issues Forum. Aquaculture Engineering Society. Shepherdstown, West Virginia, USA, 117-129.
- McIntosh, R.P. 2000. Changing paradigms in shrimp farming: V. Establishment of heterotrophic bacterial communities. Global Aquaculture Advocate, 3, 52-54.
- Metzker, M.L. 2005. Emerging technologies in DNA sequencing. Genome Research, 15, 1767-1776.
- Mishra, J.K., T.M. Samocha, S. Patnaik, M. Speed, R.L. Gandy and A. Ali. 2008. Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), under limited discharge condition. Aquaculture Engineering, 38, 2-15.
- Moss, S.M., and G.D. Pruder. 1995. Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp (*Penaeus vannamei*) Boone, reared under intensive culture conditions. Journal of Experimental Marine Biological Ecology, 187, 175-191.
- Moss, S.M., G.D. Pruder, K.M. Leber, and J.A., Wyban. 1992. The relative enhancement of *Penaeus vannamei* growth by selected fractions of shrimp pond

- water. *Aquaculture*, 101, 229-239.
- Moss, S.M., S.M. Arce, F.R.O. Calderon, C.A. Otoshi, D. Moss, J.M. Lotz, D.V. Lightner, B.J. Argue and G.D. Pruder. 1998. Breeding for disease resistance in penaeid shrimp: experiences from the U.S. marine shrimp farming program. First Latin American shrimp culture congress and Exhibition, Panama City, Panama.
- Moss, S.M., W.J. Reynolds and L.E. Mahler. 1998. Design and economic analysis of a prototype biosecure shrimp growout facility. In: Moss S.M., ed. U.S. Marine Shrimp Farming Program Biosecurity Workshop. Honolulu, Hawaii, USA. The Oceanic Institute. 67-74.
- Moss, S.A., G.D. Pruder, and T.M. Samocha. 1999. Environmental management and control: controlled ecosystem and biosecure shrimp growout systems. In: Controlled and biosecure production systems. Bullis R.A. and G.D. Pruder, eds. Preliminary Proceedings of a Special Integration of Shrimp and Chicken Models, 27-30 April, Sydney, Australia, World Aquaculture Society, 87-91.
- Moss, S.M. 2000. Benefits of a microbially dominated intensive shrimp production system: a review of pond water studies at the Oceanic Institute. *Global Aquaculture Advocate*, 3, 53-55.
- Moss, S.M., B.R. LeaMaster and J.N. Sweeney. 2000. Relative abundance and species composition of gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31, 255-263.
- Moss, S.M., 2002. Dietary importance of microbes and detritus in penaeid shrimp aquaculture. In: Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. Lee C.S. and P. O'Bryen, eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 1-18.
- Nyren, P. 2007. The history of pyrosequencing. *Methods in Molecular Biology*, 373, 1-14.
- Okumura, T. 2007. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*,

22, 68-76.

- Otoshi, C., S.M. Arce and S.M. Moss. 2003. Growth and reproductive performance of broodstock shrimp reared in a biosecure recirculating aquaculture system versus a flow-through pond. *Aquaculture Engineering*, 29, 93-107.
- Persson, M., L. Cerenius and K. Söderhäll. 1987. The influence of hemocyte number on the resistance of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *Journal of Fish Disease*, 10, 471-477.
- Pineiro-Vidal, M., A. Riaza and Y. Santos. 2008. *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 58, 21-25.
- Reid, B. and C.R. Arnold. 1992. The intensive culture of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei* Boone in a recirculating raceway system. *Journal of the World Aquaculture Society*, 23, 146-153.
- Ringo, E. and F.J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160, 177-203.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Sakai, K., K. Nakamura, M. Wakayama and M. Moriguchi. 1997. Change in nitrate conversion direction from oxidation to reduction heterotrophic bacteria depending on the aeration conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84, 47-52.
- Sakazaki, R., K. Tamura, T. Kato, Y. Obara, S. Yamai and K. Hobo. 1968. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. *Japanese Journal of the Medical Science and Biology*, 21, 325-331.
- Samocha, T.M., T. Blacher, J. Cordova and A. De Wind. 2000. Raceway nursery production increases shrimp survival and yields in Ecuador. *Global Aquaculture Advocate*, 3, 66-68.
- Samocha, T.M., L. Hamper, C.R. Emberson, A.D. Davis, D. McIntosh, A.L. Lawrence and P. van Wyk. 2002. Review of some recent developments in sustainable shrimp

- farming practices in Texas, Arizona and Florida. *Journal of Applied Aquaculture*, 12, 1-42.
- Samocha, T.M., S. Patnaik, M. Speed, A.M. Ali, J.K. Mishra, J.M. Burger. 2006. Use of recirculating technologies for nursery production of penaeid shrimp. *Proceedings of the Sixth International Conference on Recirculating Aquaculture*, July 21-23, 2006, Roanoke, Virginia, 48-56.
- Samocha, T.M., S. Patnaik, M. Speed, A.M. Ali, J.M. Burger, R.V. Almeida, Z. Ayub, M. Harisanto, A. Horowitz and D.L. Brock, 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Engineering*, 36, 184-191.
- Sandifer, P.A. and J.S. Hopkins. 1996. Conceptual design of a sustainable pond-based culture system. *Aquacultural Engineering*, 15, 41-52.
- Sandifer, P.A., A.D. Stokes and J.S. Hopkins. 1991. Further intensification of pond shrimp culture in South Carolina. In: *Shrimp culture in North America and the Caribbean*. Sandifer P.A, ed. *Advances in World Aquaculture 4*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 84-95.
- Santos, B.H. & J.M. Ebeling. 1990. Pond grow-out of three species of Penaeid shrimps in Hawaii. Presented at the World Aquaculture Society Meeting, June 10-14, Halifax, Canada.
- Scarpa, J. 1998. Freshwater recirculating systems in Florida. In: *Proceedings of the US Marine shrimp farming program biosecurity workshop*, Moss S.M., ed. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 67-70.
- Schneider, O., M. Chabrilion-Popelka, H. Smidt, O. Haenen, V. Sereti, E. H Eding and J.A.J. Verreth. 2007. HRT and nutrients affects bacterial communities grown on recirculation aquaculture system effluents. *FEMES Microbial Ecology*, 60, 207-219.
- Schryver, De P., R. Crab, T. Defoirdt and N. Boon, W. Verstraete. 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277, 125-137.
- Sich, H. and J. van Rijn. 1992. Distribution of bacteria in a biofilter-equipped semi intensive fish culture unit. *Special Publication in European Aquaculture Society*, 17, 55-7

- Smith, V.J. and K. Söderhäll. 1983.  $\beta$ -1,3-glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. *The Biological Bulletin*, 164, 299-314.
- Söderhäll, K., A. Wingren, M.W. Johansson and K. Bertheussen. 1985. The cytotoxic reaction of hemocytes from freshwater crayfish, *Astacus astacus*. *Cell Immunology*, 94, 326-332.
- Söderhäll, K. and V.J. Smith. 1986. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition and defense system in arthropods. In: *Humoral and Cellular Immunity in Arthropods*. Wiley, New York. 251-285.
- Song, Y.L., C.I. Yu, T.W. Lien, C.C. Huan and M.N. Lin. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 14, 317-331.
- Sowers, A., S.P. Young, P. Shawn, J. Isely, J. Jeffery, C.L. Browdy and J.R. Tomasso. 2004. Nitrite toxicity to *L. vannamei* in water containing low concentrations of sea salt or mixed salts. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35, 445-451.
- Sritunyalucksana, K., S.Y. Lee and K. Söderhäll. 2002. A  $\beta$ -1,3-glucan binding protein from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and comparative immunology*, 26, 237-45.
- Sugita, H., H. Nakamura and T. Shimada. 2005. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture*, 243, 403-409.
- Tamura, K., M. Nei and S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 11030-11035.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Thakur, D.P. and C.K. Lin. 2003. Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquaculture Engineering*, 27, 159-176.
- Thörnqvist, P.O., M.W. Johansson and K. Söderhäll. 1994. Opsonic activity of cell

- adhesion proteins and  $\beta$ -1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. *Developmental and comparative immunology*, 18, 3-12.
- Timmons, M.B. 1984. Use of foam fractionation in aquaculture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 27, 247-279.
- Timmons, M.B., J.M. Ebeling, F.W. Wheaton, S.T. Summerfelt and B.J. Vinci. 2002. *Recirculating Aquaculture Systems*. 2nd Edition Cayuga Aqua Ventures, New York, 769 pp.
- Van Wyk, P. 1999. Harbor Branch Shrimp Production Systems. In: *Production of marine shrimp in freshwater recirculating aquaculture systems*. Crawford B., ed. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, FL, USA, 222 pp.
- Van Wyk, P. 2000. Culture of *Penaeus vannamei* in single-phase and three-phase recirculating aquaculture systems. *Global Aquaculture Advocate*, 3, 41-43.
- Van Wyk, P. 2001. Designing efficient indoor shrimp production systems: a bioeconomic approach. In: *The new wave: Proceedings of the special session on sustainable shrimp culture*. Browdy C.L. and D.E. Jory, eds. Aquaculture 2001, The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 44-56.
- Vandenbergh, J., L. Verdonck and R. Robles-Arozarena. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2592-2597.
- Van-Rijn J., Y. Tal and Y. Barak. 1996. Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2615-2620.
- Vargas-Albores, F., G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 191, 13-21.
- Vargas-Albores, F., G. Yepiz-Plascencia, F. Jimenez-Vega, A. Avila-Villa. 2004. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. *Comparative biochemistry and physiology. Part B. Biochemistry & molecular biology*, 138, 415-22.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology*

- Review, 64, 655-671.
- Viadero, R.C. and J.A. Noblett. 2002. Membrane filtration for removal of fine solids from aquaculture process water. *Aquaculture Engineering*, 26, 151-169.
- Wajsbrodt, N., A. Gasith, M.D. Krom and T.M. Samocha. 1990. Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 497-504.
- Wasielesky, W., H. Atwood, A. Stokes and C.L. Browdy. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258, 396-403.
- Weirich, C.R., C.L. Browdy, D. Bratvold, B.J. McAbee and A.D. Stokes. 2002. Preliminary characterization of a prototype minimal exchange super-intensive shrimp production system. *Proceedings of the IVth International Conference on Recirculating Aquaculture*. Virginia Tech University, Blacksburg, Virginia, USA, 255-270.
- Wilen, B.M., B. Jin and P. Lant. 2003. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research*, 37, 2127-2139.
- Meng, X.H., I.K. Jang, H.C. Seo and Y.R. Cho. 2009. White spot syndrome virus quantification in blue crab (*Portunus trituberculatus*) hatchery-produced larvae and wild populations by TaqMan real-time PCR, with an emphasis on the relationship between viral infection and crab health. *Aquaculture*, 291, 18-22.
- Yu, J.P. 1993. Haemocyte classification, density, and percentage of the prawn *Penaeus japonicus*. *Journal of the Ocean University of Qingdao*, 23, 107-114.
- Zhu, S. and S. Chen, 2001. Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquaculture Engineering*, 25, 1-11.

## 감사의 글

박사과정을 수료한지 언 8년만에 지난하게 끌어왔던 논문이 막상 이렇게 끝을 맺고 보니 허전함 마음도 없지 않지만, 감개무량하며, 끝을 낸 후의 뿌듯함은 무엇과도 비교할 수 없는 소중한 경험이라 생각이 듭니다. 이 모든 결과는 항상 관심과 애정으로 저를 이끌어 주신 많은 분들의 덕분이며 항상 감사한 마음 잊지 않고 살겠습니다.

제가 여기까지 올 수 있도록 지도해 주신 이영돈 교수님께 먼저 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 부족함이 많은 저를 항상 믿고 격려해 주신 점 감사하고 한편으로 죄송스러울 뿐입니다. 교수님의 인간적인 가르침 마음 속 깊이 새기고 국가와 민족을 위해 더 열심히 봉사하며 살아 가도록 하겠습니다. 또한 바쁘신 와중에도 부족한 저의 논문을 심사해주시고 날카로운 지적과 소중한 조언을 아끼지 않으신 한창희 교수님, 최광식 교수님, 허문수 교수님께 진심으로 깊은 감사를 드립니다.

부족함이 많은 제가 박사과정을 무사히 마칠 수 있었던 것은 서해특성화연구센터 서형철박사, 조영록박사, 김종식박사, 김문환, 김창덕, 원정제, 오세갑, 김용평 동료직원들의 헌신적인 도움이 있었기에 가능한 일이었습니다. 감사한 마음 잊지 않고 소중하게 간직하겠습니다. 많이 부족한 저에게 인간적인 애증의 가르침과 연구자의 길이 무엇인지 몸소 행동으로 보여주시고 논문을 기꺼이 허락해주시고 다듬어주신 장인권 센터장님께 특별히 감사를 드립니다. 여러날을 자료정리에 고생한 김수경, 김은지, 배선헌, 윤홍석에게도 감사의 마음을 전합니다.

모든 일을 맡아 해주고 지원을 아끼지 않은 제주대학교 해양과환경연구소 송영보, 이치훈 등 후배들 에게도 감사의 마음을 전합니다. 힘들어 할때마다 용기와 따뜻한 배려와 관심으로 마음을 전하는 김봉석의 우정과 늘 한결 같은 마음으로 힘이 되어준 이주석, 김부영 후배에게 고맙다는 마음을 전합니다. 아직 자식노릇도 제대로 못하는 둘째 아들을 위해 병석에 계시면서도 새벽마다 기도로 끝까지 변함없는 믿음을 주시는 아버지, 어머니께 깊이 감사드립니다. 못난 동생을 대신해 집안의 대소사를 말없이 이끌어 나간 형과 형수님, 내사랑하는 아들 홍석, 재석이, 가족 모두에게 감사 드립니다.

일일이 언급하지 못했지만 늘 마음속으로 응원을 보내준 친구들과 수산과학원 선배님과 후배님들께도 고마운 마음을 전합니다. 끝으로 우리나라의 새우양식산업 발전을 위해 고생하시는 새우양식어업인과 한국새우양식협회 회원들에게도 감사의 마음을 전하며 미력하나마 이 논문이 한국 새우양식발전에 도움이 되기를 소망합니다.

2010년 1월 눈내리는 겨울밤에.



