

이때패류 어미관리를 위한 미세조류 기반 폐쇄-순환여과시스템 개발 연구: I. 성 성숙 유도

김정우, 허영백, 한종철, 박영철

국립수산과학원 남동해수산연구소

Development studies of microalgae-based closed recirculating bivalves adults conditioning system: I. Induction of the gametogenesis

Chung Yoo Kim, Young Baek Hur, Jong Chul Han and Young chul Park

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

ABSTRACT

Techniques were developed for holding and conditioning of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in a closed recirculating system. Experimental adults were used 500 oysters (x two system, total 1,000 oysters) which were collected in 20th March 2016 from long-line aquaculture farm at the south coast of Korea. During conditioning periods concentrated live microalgae as Isochrysis sp. 15×10^7 cells/mL, Tetraselmis sp. 2×10^7 cells/mL and Pheodactylum sp. 18×10^7 cells/mL were added 5 L every day, respectively which micro algae were functioned as diets and biological filter. Over all experimental periods total water exchange rate was 21.3% (daily 0.5%). Over 42 days conditioning, female and male oysters were matured 90.9% and 94.4%, respectively. Survival rate was 98.7%. Mean shell height (8.3 mm), total wet weight (19.2 g), meat wet weight (5.0 g) and shell wet weight (13.6 g) were significantly increased ($P < 0.05$). Water quality parameters including the water temperature ($22.1 \pm 0.4^\circ\text{C}$), salinity (24.9 ± 04), dissolved oxygen (5.1-7.9 mg/L) and pH (7.93 ± 0.15) were kept stable. Concentration of dissolved inorganic nutrient as ammonia (1.96-0.35 mg/L), nitrite (0.03-0.16 mg/L), nitrate (1.34-0.47 mg/L), DIP (0.42-0.03 mg/L) and silicate (3.83-0.00 mg/L) were significantly decreased throughout experiment except nitrite which was increased ($P < 0.05$), but nitrogenous components stayed below toxic levels (ammonia 0.0-5.5 mg/L, nitrite 0.0-460.0 mg/L) which indicated that closed recirculation system with microalgae based bio-filter could supply sufficiently environment condition to holding and conditioning of oyster.

Keywords : *Crassostrea gigas* conditioning, gametogenesis, recirculation, microalgae-based

서 론

국내 굴 등 패류 인공종묘생산 기술은 1997년 국립수산과학원 남해종묘배양장 (현 남동해수산연구소 남해양식연구센터)

에서 개발 기 보급되어 2000년 16개 민간 상업적 인공종묘생산 업체에서 2015년 경상남도에서만 34개 업체 전국 40개 업체로 늘어나 굴 인공종묘 200만 연과 피조개, 가리비, 개조개 등을 10억 마리 이상 생산 공급하고 있다 (경상남도, 2015). 그러나 증가된 종묘생산 업체 수에 비해 생산량은 거의 정체되어 있는 실정이다. 이와 같은 현상은 여러 가지 문제점이 있겠지만, 주요한 원인은 연안 환경변화에 의한 수질악화 등으로 생물사육 관리에 실패하여 발생한 것이다. 이러한 문제점은 최근 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 연안 환경오염, 기후변화, 유해 미세조류 발생 (예; 적조), 병원성 박테리아 (예: *Vibrio* spp.) 의 출현과 같은 여러 가지 문제점으로 굴을 포함한 패류 양식산업 전체가 많은 어려움을 겪고 있다 (FAO, 2011). 이러한 문제점을 해결하기 위해 새로운 사육방법을 개발하고자 다

Received: September 24, 2016; Revised: September 27, 2016;
Accepted: September 30, 2016

Corresponding author : Young-baek Hur

Tel: +82 (55) 860-7701, e-mail: hur0100@korea.kr
1225-3480/24632

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

양한 연구와 시도가 있었지만, 그 중 대표적인 방법이 환경과 분리된 폐쇄식 순환여과방식을 이용하는 것이다. 순환여과방식은 주로 지금까지 어류양식장에서 많이 이용하였지만, 패류양식에 있어도 질병, 병원생물, 해적생물, 유해물질 등 외부 요인으로부터 격리시킬 수 있고, 온도, 염분, 먹이와 같은 성장에 영향을 미치는 환경 요인의 인위적 개선, 그리고 수확시기 조절 및 시장접근성 등 측면에서도 높은 이득이 있는 것으로 평가된 부분도 있지만 (Bolton and Thielker, 1982), 상업적 생산에 따른 채산성 문제, 단일생물 고밀도 사육에 따른 종 특이성 질병발생 가능성과 같은 문제점이 발견되어 1982년 이후부터 연구가 중단된 상태였는데, 최근 수처리 기술과 관련 인프라가 발전되면서 기술적 측면에서 일부 문제가 되었던 부분이 해결됨에 따라 생물독성, 인위 성 성숙 프로그램 개발, 기후변화 영향, 먹이공급 등 실험실적 폐쇄순환여과 시스템을 이용한 패류생산 연구가 진행되고 있다 (MacMillian *et al.*, 1994; Buchanan *et al.*, 1998; Roger and Segovia, 2010; Kuhn *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Florence *et al.*, 2015). 하지만 폐쇄순환여과 시스템을 이용한 상업적인 패류 생산은 아직까지 채산성이 맞지 않는 실정이다 (Buzin *et al.*, 2015). 그러나 인공종묘생산을 위한 실내 어미 성숙관리는 시스템 용량이 양성에 비해 상대적으로 높지 않기 때문에 충분히 적용 가능성이 있을 것으로 판단된다. 특히 국내 패류인공종묘 생산은 하절기 수질문제 등으로 인해 비교적 수질이 안정적이고, 수질관리가 용이한 동절기에 상업적인 대규모 종묘생산이 이루어지고 있다. 그러나 우리나라에서 생산되고 있는 굴, 피조개, 개조개, 가리비류 등의 이매패류는 하계 산란형 또는 조기 종묘생산을 위해 동절기 실내에서 인위적인 성 성숙을 유도하여 필요한 수정난을 확보하고 있다. 일반적으로 동절기 어미의 인위성숙유도는 가온해수 유수 및 인위 배양된 미세조류를 먹이생물로 공급하면서 관리하는 방법을 이용하고 있다. 이 방법은 생산된 다량의 가온수와 함께 공급된 먹이생물이 외부로 버려지게 됨에 따라 많은 양의 에너지가 소모되고, 유입되는 해수의 수질변동에 따라 오염된 해수에 노출되어 어미관리에 실패하는 경우가 많이 발생하고 있다. 따라서 폐쇄순환여과 시스템을 활용하여 어미관리를 하면 이와 같은 문제점을 효과적으로 해결할 수 있어 굴 (Buchanan *et al.*, 1998; Roger and Segovia, 2010) 과 바지락 (Lee *et al.*, 2014) 을 대상으로 성숙유도를 한 결과 성공적으로 생식소 발달이 관찰되어 상업적 활용의 가능성을 제시하였지만, 높은 폐사율과 안정적 관리 측면에서 지속적 기술개발의 필요성을 제기하였다. 뿐만 아니라 지금까지 50년 이상의 연구결과로 어류양식장에서 순환여과시스템 (RAS) 을 활용하여 대상생물을 사육 관리하는 개념과 시스템구성 그리고 관리방법은 비교적 잘 정립되어 있지만 (Timmons and Ebeling, 2007; Martins *et al.*, 2010), 패류

를 RAS에 수용하여 사육하는 것은 대사산물과 생리적 조건의 차이로 인해 어류양식과는 별도로 필요한 개념을 다시 정립할 필요성이 있음을 재차 강조하고 있다 (Buzin *et al.*, 2015).

한편, RAS에서 새로운 생물학적 여과생물로 미세조류를 기반으로 하는 순환여과시스템의 개발 가능성을 제시하였는데 (Martins *et al.*, 2010), 미세조류는 COD, BOD, 영양염, 중금속 및 병원생물을 저감하는 능력이 있기 때문에 폐수처리에 활용이 가능하고 (Muñoz and Guieysse, 2006), 동시에 혼합양식을 하면 패류의 먹이 역할을 할 수 있기 때문에 부수적인 효과를 얻을 수 있다. 예를 들어 새우-미세조류-굴을 통합양식하면 사육수의 교환을 현저히 줄일 수 있고, 고밀도로 배양된 미세조류는 굴의 먹이와 병원생물 (*Vibrio vulnificus*) 의 발생을 억제하여 새우의 질병도 줄일 수 있어 매우 효과적인 생산이 가능했고 (Wang, 2003), 이 기술을 응용하여 High-rate algal ponds, HRAP 기술로 발전하였다 (Oswald, 1988). 그리고 이 기술은 다시 Partitioned aquaculture systems (PAS) 로 발전되어 나일틸라피아, American catfish (Brune *et al.*, 2003) 의 상업적 양식에 이용하고 있다. 또한 최근에는 RAS + HRAP 기법을 이용하여 바다농어를 키우면 무기질소와 인의 축적이 순환여과시스템에서 현저히 줄어들어 생존율을 기존 RAS만 이용하는 것보다 높일 수 있음을 밝혔다 (Metax *et al.*, 2006). 그리고 인공종묘배양장에서 이 방법을 활용하면 용존성유기탄소, 박테리아 및 인산염을 제거하는데 매우 효과적으로 사육수의 교환을 줄일 수 있다. 그러나 유수식 시스템에서는 배양중인 미세조류가 흘러 나가버리기 때문에 효과가 없는 것으로 평가하였다 (Martins *et al.*, 2010). 그러나 기본적으로 실내에서 이매패류를 사육관리 할 경우 사육수의 흐름이 없으면 배설된 분과 이물질이 배출되지 않아 사육중인 패류에 좋지 않은 결과를 초래할 수 있기 때문에 일정 유속의 수류의 흐름도 반드시 있어야 한다. 따라서 본 연구는 기본적으로 RAS + PAS 기법을 병용하여 사육관리 중인 패류 어미의 먹이를 겸한 생물학적 여과생물로 미세조류 (부유성 미세조류 + 부착성규조) 를 기반으로 새로운 폐쇄 순환여과식 어미사육 시스템을 개발하여 상업적 인공 종묘배양장에서 인위적인 성 성숙 유도에 활용하게 함으로써 비효율적인 생산방법을 개선하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 순환여과 사육시스템의 설계 및 구성

시스템은 한 번에 굴 어미를 기준으로 최대 500마리가 수용되도록 설계하였다. 이는 일반적으로 우리나라에서 운영되고 있는 상업적 인공종묘배양에서 1회 어미 관리를 할 때 필요한 마리수이다. 전체 시스템 구성은 어미수용수조 10개와 생물학

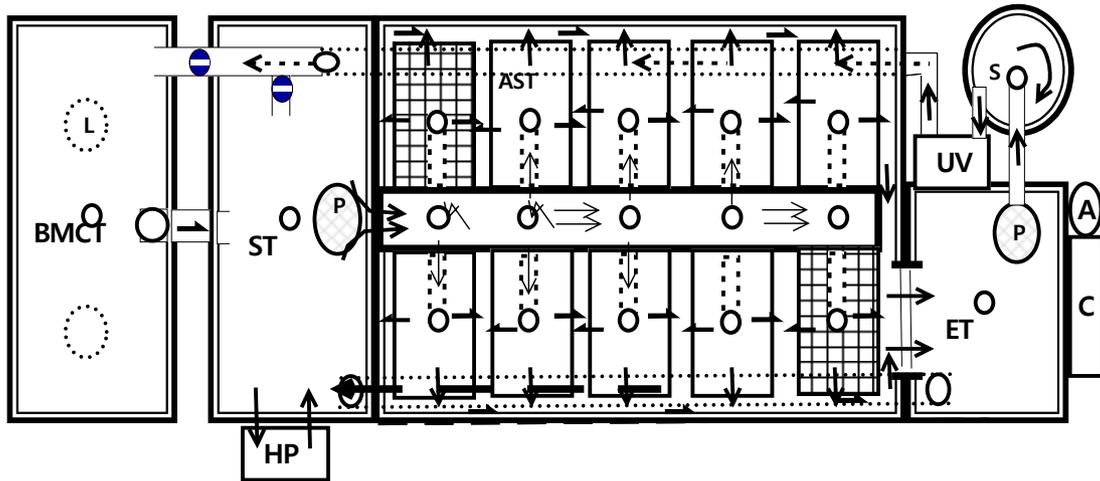


Fig. 1. Schematic diagram of the closed recirculation adults conditioning system used in this study. Black arrow: water flow direction, AST: adults stocking tank, ST: service tank, HP: heat pump, BMCT: Biofilter with microalgae culture tank, L: Light, ET: Effluent tank, P: submersible Pump, UV: ultraviolet lamp, C: Control panel, A: air blower, S: protein skimmer.

적 여과 및 먹이생물배양수조, 사육수 온도조절 및 먹이혼합공급 서비스수조, 퇴수조, 단백질 스키머 장치, 자외선 살균장치, 온도조절 장치, 순환펌프, 에어블로워 및 조명장치로 하나의 시스템을 구축 시켰다 (Fig. 1). 어미수용수조는 불투명 포맥스 재질의 사각수조로 크기는 W 36 x L 65 x H 40 cm³, 수용적 100 L 로 좌우 각각 5칸씩 1열로 배열되어 총 10칸으로 구성되어 있고, 좌우 사이에 투명 폴리카보네이트 재질의 W 30 x L 320 x H 50 cm³ 사각 수로형 분배조를 어미수용수조와 동일길이 만큼 설치하여 T형으로 아래쪽에서 좌우 어미수용수조와 직경 40 mm PVC 파이프로 연결되게 한 후 위쪽에는 스텐드 파이프를 세워 사육수가 각각의 어미수용수조에 동일하게 공급되게 하였고, 아래쪽에는 배수밸브를 설치하여 청소가 용이하도록 하였다. 그리고 분배조가 설치되어 있는 면을 제외하고 전체 20 cm 간격으로 배수로를 만들어 물의 흐름을 원활하게 하였다. 생물학적 여과 및 먹이생물 배양수조는 투명 폴리카보네이트와 포맥스 혼합 재질로 W 100 x L 200 x H 120 cm³, 수용적 2,000 L 의 사각수조로 바닥면은 불투명 포맥스 재질로 되어 있고, 그 외 면은 빛의 투과를 원활하게 하기 위해 투명 폴리카보네이트 재질로 되어있다. 상부에는 100 watt LED 투광등을 2개 설치하였다.

사육수 온도조절 및 먹이생물혼합 공급 서비스 수조는 생물학적 여과 및 먹이생물배양 수조와 동일한 크기로 전체 불투명 포맥스 재질로 만들었고, 한쪽 면에 인라인 히터펌프 (Deail, 1ps heating 3,024 kcal/h, cooling 2,069 kcal/h, Korea) 두 대가 직렬로 연결되어 사육수의 온도조절을 가능하도록 하였다. 퇴수조는 W 100 x L 100 x H 120 cm, 수용적 1,000 L 의 사각수조로 전체 불투명 포맥스 재질로 되어 있고, 한쪽

면에는 직경 30 x H 250 cm, 수용적 180 L 의 PVC 재질의 단백질 스키머와 25 watt 2중관 UV-C 자외선 살균등 (Philips, Poland) 4개를 직렬로 연결한 자외선 살균장치가 부착되어 있다. 그리고 모든 수조에는 산소공급과 교반 그리고 단백질 스키머 장치의 에어 벤츄리를 구동하기 위하여 설치된 에어블로워 (Hiblow, 80 L/min, Korea) 을 이용 공기를 공급할 수 있도록 하였다. 각각의 수조에는 바닥면에 스텐드 파이프 (PVC 직경 50 mm) 를 설치하여 청소와 수위 조절이 가능하도록 하였다. 그리고 사육수의 순환과 단백질 스키머 작동을 위해 침수형 수중펌프 (LG-wilo, 350watt, 200watt, Korea) 두 대를 설치하였다. 또한 사육수의 증발을 방지하기 위하여 전체 수조의 상부 면은 투명 폴리카보네이트 평판으로 덮어주었다. 구성된 전체 순환여과 시스템의 운영 수량은 6,000 L 이었다. 한편, 전체 시스템에 부착된 구동장비는 전자동으로 통합 운전이 가능하도록 자동운전 장치를 별도 설치하였다.

2. 시스템 운영 및 성 성숙 유도

1) 시스템 운전 조건

전체 순환여과시스템에는 부직포 백필터 (10 μm) 로 여과한 해수를 채우고 다시 여기에 지하담수를 혼합하여 염분 농도를 25.0로 조절하였다. 패류 어미수용수조 전체로 흐르는 유수량은 200 L·min⁻¹ 로 1일 40회전으로 유지하였고, 이 중 100 L min⁻¹ 은 단백질스키머와 자외선처리를 한 후 다시 서비스수조와 먹이배양겸용 생물학적여과조로 각각 90% : 10% 로 되돌아가게 하였고 이 때 각각의 수조로 돌아 들어가는 유량은 밸브를 이용하여 조절하였다. 나머지 잉여 퇴수는 퇴수조와 서비스수조 사이에 연결된 평형관로 (직경 50 mm x 3개)

를 통해 자연적으로 서비스수조로 돌아가게 하였다. 단백질스키머와 자외선조사 처리는 24시간 연속 처리하였다. 그리고 시스템 전체의 온도조절은 인라인 히터펌프와 연결된 디지털 자동온도조절기로 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 정밀도로 조절되게 하였다. 그리고 먹이배양겸용 생물학적여과조 상부에는 100 watt LED 투광등 2개를 이용 $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 으로 24시간 연속 조명하였다. 그리고 안정적 산소공급과 교반을 위하여 연속적으로 전체 수조에 에어스톤을 이용 통기를 시켰고, 증발을 방지하고 전체 시스템 수조 표면에 부착성 미세조류 등이 자연 착생하도록 투명 폴리카보네이트 덮개를 덮고 운전을 하였다. 매일 오전 10시 다기능수질측정기 (YSI 650 MD, USA) 로 수온, 염분, DO 및 pH를 측정하였고, 이 때 단백질스키머 운전 등의 따른 미세증발로 염분의 변동이 1.0 이상이 발생할 경우는 일정량의 지하담수를 첨가해 염분을 25.0 ± 1.0 수준으로 재조정하였다. 그러나 안정화 운전 기간 동안에는 온도조절은 하지 않았고, 별도의 미세조류도 첨가하지 않고 시스템의 안정적 운전 상태를 확인하였다.

2) 성 성숙 유도

성숙유도 실험에 이용한 패류 어미는 굴 *C. gigas*로 경남 통영시 인평동 주변해역에서 양성 중이던 만 1년생 양식산 ($N = 1,200$, 평균 각장 54.5 ± 7.2 mm, 평균 각고 107.8 ± 13.1 mm) 을 2016년 3월 20일 구입하여 국립수산물확원 남동해수산연구소 남해양식연구센터로 선박을 활용 해상 이송하여 수용적 4톤 사각 FRP 수조에서 15일간 자연해수 유수 및 인위 배양된 미세조류 *Tetraselmis* sp.와 *Pheodactylum* sp.를 동일 비율로 혼합하여 연속공급하면서 순치하였다. 이 기간 동안 이동 등의 스트레스에 따른 폐사 개체를 제거하였고, 실험에 이용한 개체는 건강한 것만 선별하여 이용하였다. 실험은 먼저 패각에 붙어 있는 이물질을 제거하고, 여과해수로 세척한 후 사각플라스틱 어미바구니 ($55 \times 35.5 \times 10 \text{ cm}^3$) 20개에 각각 50마리씩 수용한 다음 2개의 순환여과시스템 (2 반복) 어미사육수조 10개 칸에 각각 한 바구니씩 한 개의 순환여과시스템에 각각 500 마리를 수용하였다. 실험기간 중 수온은 실험 개시 시부터 7일까지는 인위적인 온도상승 없이 자연 환경상태의 수온을 유지하였다. 이 후는 매 2일 간격으로 1.0°C 씩 상승시켜 22.0°C 까지 상승시킨 후 실험 종료 시까지는 유지시켰다. 실험기간 동안 어미 굴의 생리적 안정을 유지하고, 생물학적 여과기능을 활성화시키기 위해 자체 구성한 미네랄 혼합제제 (특허출원관계상 비공개) 와 실내 인위 배양된 미세조류를 공급하였다. 공급된 미세조류는 염분변화를 최소화하기 위해 증공사막 농축기 (자체제작) 로 농축 후 *Isochrysis* sp. (15×10^7 cells/mL), *Tetraselmis* sp. (2×10^7 cells/mL) 와 *Pheodactylum* sp. (18×10^7 cells/mL) 을 각각 5 L 씩 1

일 1회 매일 오전 10시 먹이배양겸 생물학적여과조에 혼합시켜 24시간 재 배양되게 하였다. 먹이공급은 단백질스키머와 자외선살균장치에 의해 여과-살균 처리된 후 되돌아오면서 유입 (10 L min^{-1}) 되는 처리수와 혼합 희석되고, 순차적으로 수위차에 의해 서비스 수조로 흘러 들어가게 되면 다시 서비스 수조에서 사육수와 혼합되어 어미수용수조로 사육수와 함께 공급되게 하였다. 그 외 시스템 운영조건은 안정화 운전조건과 동일하게 하였다. 실험 기간 동안 자연증발과 미세조류 첨가에 따른 염분상승을 보정하기 위해 일정량의 담수 첨가는 있었지만, 시스템 내부 청소 및 새로운 사육수 교환은 하지 않았다. 시험기간 동안 매일 오전 10시에 수온, 염분, DO, pH를 다기능수질측정기 (YSI 650MD, USA) 로 현장에서 바로 측정하였고, 채수하여 $1 \mu\text{m}$ Whatman GF/C 로 여과한 후 수질분석용으로 시료로 이용하였다. 그리고 폐사개체를 확인하여 제거하고 기재하여 누적폐사율을 조하였고, 매 7일 간격으로 무작위로 각각의 시스템에서 20마리의 굴을 채취하여 생물조사용 시료로 활용하였다.

3) 수질분석

분석된 수질항목은 암모니아질소 ($\text{NH}_4\text{-N}$), 아질산질소 ($\text{NO}_2\text{-N}$), 질산질소 ($\text{NO}_3\text{-N}$), 용존무기질소 (DIN), 인산염 (DIP), 규산규소 ($\text{SiO}_2\text{-Si}$) 이다. 각 항목은 해양환경공정시험 방법 (국토해양부, 2010) 에 따라 분석되었고 각 성분별 분석 방법은 다음과 같다. 암모니아질소는 Indophenol 청색법, 아질산질소는 α -NED 법, 질산질소는 Cu-Cd 칼럼을 이용한 아질산질소 환원법으로 측정하였다. 용존무기질소는 암모니아질소, 아질산질소, 질산질소의 합으로 나타내었고, 용존무기인과 규산규소는 Ascorbic acid를 이용한 몰리브덴 청법으로 분석하였다.

4) 생식소발달 및 생리적 변화 조사

생식소발달 및 생리적 변화 조사는 매 7일 간격으로 시스템별 무작위로 각각 20 마리씩 (total = 40) 굴 어미를 채집하여 이용하였다. 채취된 굴 어미는 먼저 패각에 붙어 있는 이물질을 제거하고 여과해수로 세척한 다음 습포지로 패각외부의 수분을 제거한 다음 크기요소 (각장, 각고, 각폭) 은 버니어캘리퍼스 (Mitutoyo, Japan) 로 0.1 mm 까지 측정하였고, 무게요소 (전중, 육중 각중) 은 직시전자저울 (Mettler, USA) 로 0.1 g 까지 측정하였다. 육중과 각중은 먼저 전중을 측정한 후 개각하여 육과 패각을 분리한 다음 습포지로 수분을 제거한 후 각각의 습중량을 측정하였다. 측정된 자료를 이용하여 비만도는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Condition index (CI)} = \frac{\text{wet meat weigh}}{\text{Wet meat wight} + \text{wet shell wight}} \times 100$$

Table 1. New water supply and water exchange rate during experimental periods

RAS	Period (day)	New water supply (L)				Water exchange rate (%)			
		Feed water		Flash water		Total (a+b)	Daily (M ± s.d.)	Total	
		Daily	Total (a)	Daily (M ± s.d.)	Total (b)				
System	A	42	15.0	634	15.6 ± 2.8	655	1,285	0.51 ± 0.05	21.4
	B	42	15.0	634	15.2 ± 2.8	637	1,267	0.50 ± 0.05	21.1
Total	Mean	42	15.0	634	15.4	646	1,276	0.5	21.3
	s.d.	-	-	-	0.3	12.7	12.7	0.0	0.2

중량측정이 완료된 육은 생식소조사용 시료로 활용하였다. 생식소조사는 조직절편을 이용하여 Morales-Alamo and Mann (1989) 과 Chung 등 (2001) 의 방법을 응용하여 영상 장치가 부착된 측정현미경 (Nikon MM-800, Japan) 의 영상을 이용해서 각 개체의 생식소 상태와 성 (수컷, 암컷, 미분화 단계) 을 조사 구분하였다. 절편 제작은 먼저 각각의 굴의 구순과 아가미 뒤쪽에서 직각으로 4-5 mm 두께의 조직을 절단 후 Davidson's 용액에 고정하였다. 다시 고정된 조직시료를 1 mm로 제작한 후 파라핀에 봉입 후 이것을 4-6 μm 로 조직절편을 만든 후 슬라이드 글라스에 붙인 다음 Gill's hamatoxylin-eosin 염색을 하였다 (Howard and Smith 1983). 생식소 발달 단계는 5단계 inactive stage (0), early active stage (1), late active stage (2), ripe stage (3), spent stage (4) 로 나누어 각 단계별로 점수를 부여해 지수화 해서 생식소발달지수 (GI) 를 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Gonad index (GI)} = \frac{(\text{NRVS0}) + (\text{NRVS1}) + (\text{NRVS2}) + (\text{NRVS3}) + (\text{NRVS4})}{\text{Total N observed animals}}$$

여기서 N은 전체 조사된 굴 어미개체수이고, NRVS는 각 생식소발달 단계별 주어진 값의 개체 합이다 (Chung *et al.*, 2001).

생존율은 매일 오전 중 폐사마리수를 확인 후 전체 폐사마리수를 누적하여 일간 생존율을 계산하였다.

3. 통계처리

자료는 일반선형모델로 분석하였다. 생식소 발달지수, 비만도, 성장요소 (각장, 각고, 각폭), 무게요소 (전중, 육중, 각중) 및 용존성무기영양염 (암모니아, 아질산, 질산, 인산인, 규산염) 대하여 일간변화를 ANOVA로 분석 후 유의성이 인정되면, 사후검정으로 Duncan's multiple range test로 평균 간의 유의성을 분석하였다. 유의수준은 P < 0.05로 하였다. 모든 분석은 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 분석하였다.

결 과

1. 시스템 운영 및 수질변화

전체 42일 간의 실험기간 동안 보충된 사육수는 먹이생물에 포함된 배양수와 염분 조절을 위한 첨가된 담수가 각각 평균 634 L 와 646 L 로 전체 1,276 L 이었다. 평균 일간 사육수의 교환율은 0.5%였고, 전 사육기간 동안 교환된 총 사육수는 21.3%이었다 (Table 1). 실험기간 동안 수온, 염분, 용존산소 및 pH 변화를 조사한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 수온은 실험개시 시 16.3℃에서 서서히 증가시켜 실험 21일째 22.7℃로 상승되었고, 이 후 실험종료 시까지 22.1 ± 0.4℃ (CV = 0.11) 로 유지되었다. 그리고 염분변화는 24.9 ± 0.4 (CV = 0.02) 이었고, 용존산소 (Do) 는 7.9-5.1 (Mean ± s.d., 5.97 ± 0.6, CV = 0.10) mg/L 이었고, pH는 7.93 ± 0.15 (CV = 0.02) 로 조사되었다.

실험기간 동안 조사된 암모니아 (NH₄-N), 아질산 (NO₂-N), 질산 (NO₃-N), 용존성무기질소 (DIN), 용존성무기인 (PO₄-P) 및 규산염 (SiO₂-Si) 의 농도변화를 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 전체 조사된 수질요소들의 농도는 아질산을 제외

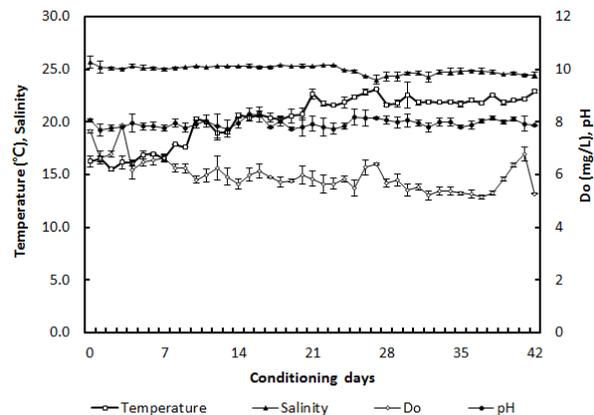


Fig. 2. Change of water temperature, salinity, dissolved oxygen (Do) and pH during the conditioning periods in the closed recirculating system.

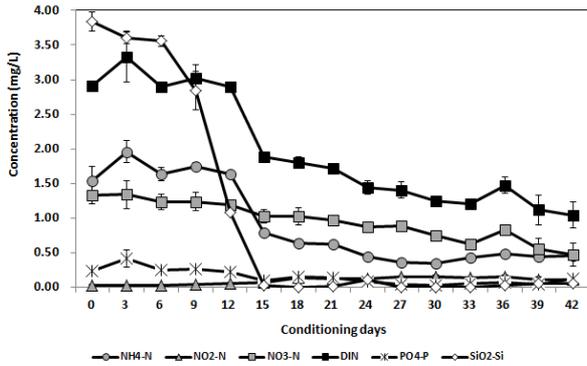


Fig. 3. Change in the ammonia (NH₄-N), nitrite (NO₂-N), nitrate (NO₃-N), dissolved inorganic nitrogen (DIN), dissolved inorganic phosphate (PO₄-P) and silicate (SiO₂-Si) concentration during the conditioning periods in the closed recirculating system.

하고 실험기간이 경과함에 따라 유의적 ($P < 0.05$) 으로 감소하는 경향을 보였다. 수질요소별 변화를 보면 암모니아는 1.958-0.353 mg/L 의 범위로 실험 12일까지는 1.535 mg/L 이상을 보이다가 이 후 감소하여 시험 24일째부터는 0.485-0.353 mg/L 으로 유의적 ($P < 0.05$) 인 변화는 나타나지 않았다. 아질산은 사육기간이 경과함에 따라 약간 증가하는 경향을 보였는데, 사육 15일까지는 평균 0.044 mg/L 로 유의적인 변화가 없었지만, 이 후 부터는 유의적 ($P < 0.05$) 으로 증가하여 사육 36일째는 0.158 mg/L 까지 증가한 후 다시 감소하여 42일째 0.114 mg/L 로 감소하였다. 질산은 실험 개시시부터 사육 12일까지는 평균 1.270 mg/L 로 약간 감소하는 경향을 보였지만 유의적 ($P < 0.05$) 인 차이는 없었다. 그러나 이 후 부터는 유의적 ($P < 0.05$) 으로 감소하여 실험종료 시인 42일째 0.476 mg/L 을 보였다. 이에 따라 용존성무기질소 농도는 암모니아와 질산의 농도 변화에 따라 비슷한 경향으로 실험 12일째까지는 평균 3.010 mg/L 수준을 보이면서 유의적인 차이는 없었지만, 이 후 부터는 유의적으로 감소하여 실험 종료 시에는 1.047 mg/L 로 감소하였다.

용존성무기인 농도는 0.420-0.032 mg/L 의 범위를 보였고, 전체적으로 실험 기간이 경과함에 따라 유의적 ($P < 0.05$) 으로 감소하는 경향을 보였지만, 3일째 0.420 mg/L 로 가장 높은 농도를 보인 후 감소하여 15일 이 후부터는 급격히 감소하여 0.153 mg/L 이하의 수준을 보였다. 그리고 규산염의 농도는 급격한 감소변화를 보였는데, 실험 15일까지는 유의적으로 감소하여 실험개시 시 3.841 mg/L 에서 0.035 mg/L로 전체 농도의 99.1% 수준으로 감소하였다. 이 후 실험종료 시까지는 평균 0.031 mg/L 로 유의적인 변화는 없었다.

2. 생식소발달 및 생리적 변화

실험개시 시 생식소 발달단계를 조사한 결과 전체 40마리

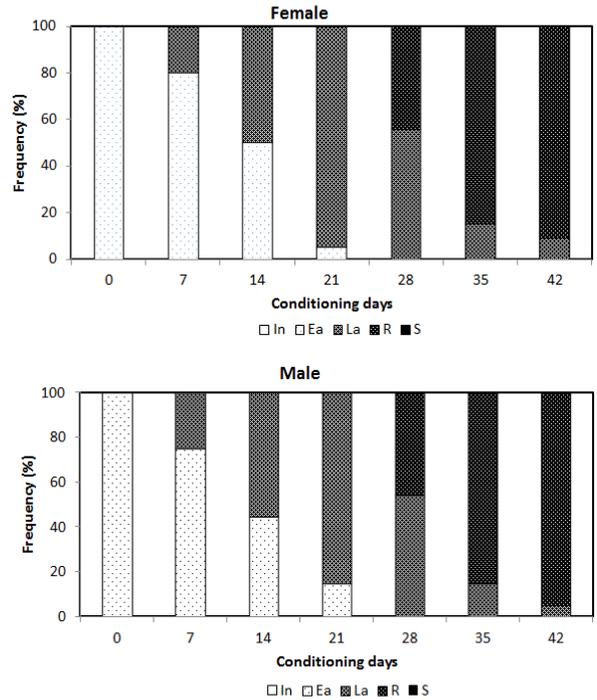


Fig. 4. Frequency distribution of gonad development stage of *Crassostrea gigas* during conditioning periods managed in the closed recirculation system. In: inactive stage; Ea: early active stage; La: late active stage; R: ripe stage; S: spent stage.

중 암·수 구분이 되지 않은 비활성기 상태가 32.5% 이었고, 생식소가 구분되어진 암·수는 각각 13마리와 14마리로 초기활성기 상태 이었는데, 급격히 발달하여 실험 42일 만에 암컷은 90.9%, 수컷은 94.4% 방란·방정 가능한 완전히 성숙된 생식소로 발달하였다 (Fig 4). 전체 생식소발달지수 (GI) 는 사육기간이 경과함에 따라 35일째까지는 유의적 ($P < 0.05$) 으로 증가하였고, 이 후는 비교적 증가하는 경향은 나타났지만 유의성은 없었다. 비만도 변화는 실험 7일째 유의적 ($P < 0.05$) 인 증가가 일시적으로 나타났지만, 이후 생식소의 발달과 함께 약간 감소하는 경향을 보였지만 전체적으로는 실험개시 시의 비만도와 비교하면 유의적인 감소는 나타나지 않았다 (Fig 5).

실험기간 동안 전체 누적 폐사 개체는 A와 B시스템에서 각각 9마리와 4마리로 평균 6.5마리로 나타났고, 전체 평균 생존율은 98.7%로 매우 높은 생존율을 보였다 (Fig 6). 실험기간 동안 크기 요소인 평균 각장과 각폭의 변화는 유의적인 차이가 없었지만, 각고는 유의적인 변화가 관찰되었다 ($P < 0.05$). 각장과 각고의 크기변화는 비슷한 경향을 보였는데, 각장은 실험개시 시 평균 54.5 mm 에서 실험종료 시 59.2 mm 로 유의적인 성장변화는 없었지만, 평균 4.6 mm 성장하였고, 각고는

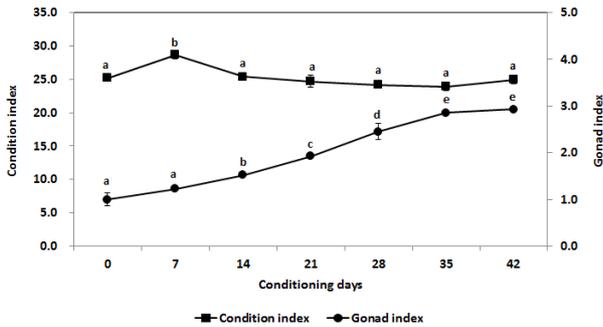


Fig. 5. Change of condition and gonad index of *Crassostrea gigas* during conditioning periods managed in the closed recirculation system.

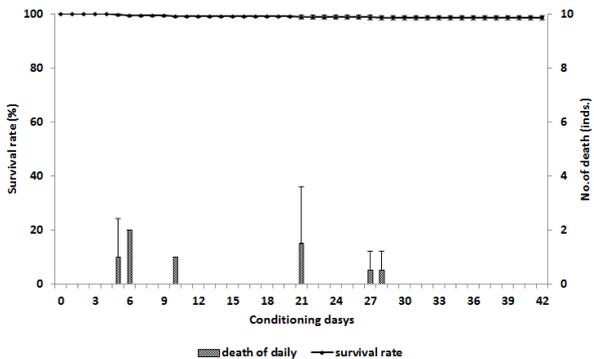


Fig. 6. Change of Mortality and daily death individual of *Crassostrea gigas* during conditioning periods managed in the closed recirculation system.

실험 14일째 평균 122.9 mm 까지 유의적인 성장이 관찰되었고 ($P < 0.05$), 이후는 성장변화가 없었다. 한편 각쪽은 실험개시 시 평균 32.8 mm 에서 실험종료 시 32.7 mm 로 크기변화가 나타나지 않았다.

무게요소인 전중, 육중 및 각중의 변화는 사육기간이 경과함에 따라 전체 유의적인 변화가 관찰되었다 ($P < 0.05$). 전체 실험 14일째 까지는 유의적인 증가를 보였는데, 각각 평균 전중은 19.2 g, 육중은 5.0 g 그리고 각중은 13.6 g 이 증가하였다. 그러나 이 후 실험종료 시까지 유의적인 변화는 나타나지 않았다 (Fig 7).

고 찰

양식산업에서 순환여과시스템 (RAS) 은 단위 사육공간 대비 높은 경제성을 창출하는 것을 목적으로 조절 가능한 환경 내에서 수서생물을 키우는데 많이 이용되어지고 있다 (Timmons and Ebeling, 2007). RAS 내에 폐류를 수용하는 것은 일시적으로 출하 전에 장내 미생물과 이물질 제거를 위하

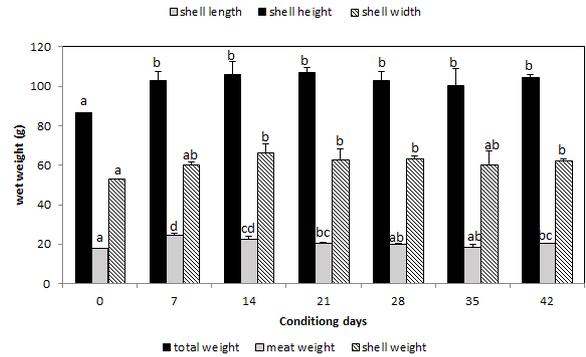
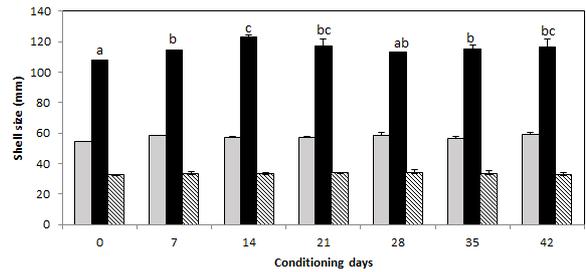


Fig. 7. Variation of shell size and weight components of *Crassostrea gigas* during conditioning periods managed in the closed recirculation system.

생물정화 또는 판매 전에 좋지 않은 환경을 일시적으로 극복하기 위한 수단으로 지금까지 많이 활용되었다 (De Alreu Correa *et al.*, 2007). 이 중 RAS를 이용한 패류 어미의 인위성 성숙시키기 위해 굴 (Buchanan *et al.*, 1998; Frias and Segovia, 2010), 바지락 (Lee *et al.*, 2014) 을 대상으로 시도하여 성공하였다. 본 연구에서 설계된 시스템에서도 42일 만에 암컷은 90.9%, 수컷은 94.4% 방란·방정이 가능한 완전히 성숙된 생식소로 발달하였다. 그런데 Buchanan *et al.*, (1998) 은 버지니아굴, *Crassostrea virginica*를 대상으로 자체 설계한 폐쇄형 순환여과시스템에서 56일 만에 수온 25°C (15 → 25°C, 2°C상승/2일) 73%가 완숙기 단계로 발달하였고, 전체 300마리를 관리하여 실험 종료 시 폐사된 개체는 총 18마리로 6%의 폐사율을 보여 본 연구에서 이용한 시스템과 비교하면 성숙기까지의 기간과 완숙율은 차이가 있는데, 이는 종 특이성과 개체 크기의 차이에서 발생된 것으로 사료되고, 동일한 *C. gigas*을 이용해 실험한 Frias and Segovia (2010) 은 60일 후 16 → 24°C (2°C상승/2일) 로 관리한 집단에서는 48.4%의 완숙한 개체가 관찰되었으며, 24°C 집단은 약 40%, 20°C 집단에서는 20% 미만으로 관찰되었고, 폐사율도 50%를 보이고 있는데, 본 실험에서는 평균 98.7% 의 높은 생존율을 보이고, 생식소의 성숙율도 40% 이상 높게 나타나고 있어 본 시스템의 완성도가 보다 높은 것으로 평가된다.

일반적으로 이매패류는 암모니아성 질소인 요산과 아미노산

형태로 50% 이상 배설하는 것으로 알려져 있는데 (Hammen *et al.*, 1966), 다양한 형태의 질소태 중 암모니아 ($N-NH_3^+$ + $N-NH_4$) 와 아질산은 높은 농도에서 생물독성이 매우 큰 것으로 알려져 있어 (Colt and Armstrong, 1981), 순환여과시스템에서 치명적인 역할을 하고, 온도가 높아짐에 따라 암모니아 배설량도 증가 한다 (Emerson, 1969; Bayne and Scullard, 1977; Boulter and Wilson, 1998; Shpigel *et al.*, 1992). 비록 연체동물 중 굴류는 암모니아 농도에 대한 저항성이 높지만, 높은 농도의 암모니아에 노출되면 세포의 스트레스 (Keppler, 2007), 여과활동의 혼란 (Epifanio and Srna 1975) 그리고 두렷한 성장저하 (Colt and Armstrong, 1981) 현상이 나타난다. 따라서 순환여과시스템의 운영과정에서 이와 같은 대사산물의 축적 변화를 모니터링하는 것은 시스템 내의 생물의 서식환경적 안정성과 위험사항을 평가하는 중요한 요소이자 지표로 매우 중요하다. 이러한 요인을 감안하여 *C. virginica*의 경우 순환여과시스템에서 안정적인 사육관리를 위해서 권장되는 암모니아와 아질산의 유지 범위는 각각 0.0-5.5 mg/L 과 0.0-460.0 mg/L, pH 는 8.0-8.5 그리고 용존산소는 3.6 mg/L 이상을 요구하고 있다 (Galstoff 1964; Epifanio and Srna 1975; Epifanio *et al.*, 1975). 본 실험의 결과 분석된 암모니아와 질산의 축적농도 범위는 각각 1.958-0.353 mg/L 과 1.34-0.47 mg/L 였고, 아질산 농도는 0.03-0.16 mg/L 였고, 용존성무기인의 농도는 0.42-0.03 mg/L, 규산염은 0.00-3.83 mg/L, 용존산소의 농도범위는 5.1-7.9 mg/L 그리고 pH 는 7.7-8.2로 사육기간의 경과에 따른 암모니아와 아질산의 축적농도 변화는 Buchanan *et al.*, (1998) 과 Frias and Segovia (2010) 의 연구 결과와 비슷하게 감소되는 경향을 보였지만, 전체적인 축적 농도는 본 시스템이 현저히 낮은 값을 보였고, 용존산소와 pH 는 권고 범위 이상을 유지하였다. 한편 본 실험에서 전체 영양염의 농도가 3 일째부터 감소하여 실험 15일째 급격히 감소하였고, 특히 규산염의 평균 농도는 3.83 mg/L 에서 0.04 mg 으로 이때까지 99% 이상 급격히 감소하였다. 이와 같은 결과는 시스템 전체 내부에 부착성 구조류가 착생하여 번무하면서 성장에 필요한 영양원으로 이용되면서 제거된 것으로 보인다. 본 실험에 이용한 폐쇄 순환여과시스템은 RAS + PAS를 병용한 시스템이다. PAS (Partitioned aquaculture system) 은 순환여과시스템 내의 사육수의 일부분을 미세조류 배양수조를 통과하게 하여 DIN과 DIP등 축적된 영양염을 생물학적으로 제거하는 생물여과조 기능뿐만 아니라, 필요한 용존산소를 높여 전체 BOD를 개선시키는 기능 있다 (Brune *et al.*, 2003). 특히 이매패류의 경우 생산된 미세조류는 동시에 먹이 역할을 하기 때문에 외부에서 공급되는 먹이생물의 량을 줄일 수 있다. 본 연구결과 전통적인 방법인 가온해수유수 방법 대비 먹이생물의 공급

량을 10분의 1 수준으로 줄일 수 있었고, 1일 1회 소량 보충하였지만, 비만도는 실험 개시 시 25.2에서 종료 시 24.5로 유의적인 차이는 없었고, 크기요소인 평균 각장과 각폭은 실험 개시 시에 약간 성장하였지만 유의적인 차이는 없었다. 그러나 평균 각고는 개시 시 대비 종료 시 8.3 mm 성장하였고, 무게요소인 평균 전중, 육중 및 각중은 전체적으로 유의적인 증가가 나타났다. 그리고 용존산소 농도도 전 사육기간 동안 5.15-7.89 mg/L로 매우 안정적인 수준을 보였다. 그리고 지금까지 어미의 성 성숙 유도를 위해 순환여과시스템에서 관리 할 때 먹이공급 방법은 1일 1회 전체 공급량 (건중량의 2%) 을 사육수조에 투입하는 방법을 이용 (Buchanan *et al.*, 1998; Frias and Segovia, 2010) 하였는데, 이 경우는 순간적으로 시스템 내에 먹이생물의 밀도가 높아짐에 따라 패류 자체의 위분 (Pseudo feces) 의 생성을 높이고, 순간적인 부유입자의 상승으로 부착된 스키머 기능이 증대되어 제거되면서 시스템 내에 먹이생물의 농도가 급격히 줄어들어 먹이의 기능을 충분히 할 수 없는 문제가 생길 수 있다. 이러한 문제점을 단적으로 보여주는 결과는 Buchanan *et al.* (1998) 과 Frias and Segovia (2010) 에서 알 수 있는데, 실험결과 비만도가 감소하는 문제점이 있었고, 순환여과시스템을 이용한 패류의 보관 또는 성성숙 유도를 위해서는 충분한 영양공급의 필요성을 제기하고 있다. 이러한 측면에서 본 실험에 이용된 폐쇄 순환여과시스템은 기존의 패류를 위한 순환여과시스템에 비해 진보적인 면이 있는 것으로 평가된다.

본 실험에 사용된 시스템은 한 번에 굴 어미를 기준으로 최대 500 마리가 수용되도록 설계하였다. 이는 자체 조사결과 우리나라 남해안의 상업적 패류 인공종묘 배양장에서 굴을 기준으로 1회 어미관리를 시작할 때 필요한 마리수이다. 실험결과 충분히 본 시스템의 시설용량으로 기존 가온해수유수 사육 방법 대비 에너지비용과 먹이공급량 대비 10분 1수준에서 채란 가능한 어미로 성숙시킬 수 있을 것으로 추정되어 향후 상업적 인공종묘배양장에서 충분히 활용 가능 할 것으로 판단된다.

한편, 여과섭식동물인 이매패류는 폐각과 조직에 상존하는 다양한 박테리아들이 존재하는데 이들 미생물총이 질화작용을 하여 자연생물학적 여과역할 (Welsh and Castadelli, 2004; Buzin *et al.*, 2015) 을 하면서 일부 암모니아가 질화된 것으로 보인다. 수온 22.0°C에서 평균 전중 53.2 g 의 굴 한 마리의 폐각표면적은 175.7 cm² 이고 1일 폐각표면의 미생물총의 질화작용으로 제거하는 TAN는 3.1 μ mol 를 질산화시킬 수 있음을 보고하였다 (Buzin *et al.*, 2015). 이 결과를 산술적으로 단순 계산으로 본 실험에 적용해 보면 평균 전중 101.4 g 의 굴 500마리는 전체 약 14.9 m² 의 생물학적 여과면적을 제공하는 것으로 계산되고 1일 TAN의 질산화량은 1,550 μ mol 로 동일한 비율의 질산화량을 비교하면 어류의 순환여과시스템

에서 생물학적 여과면적으로 약 115 m²/m³ 면적을 제공하고 있다. 이러한 수용된 굴 폐각의 생물학적여과효과에 대한 부수적인 요인은 당초 실험을 계획하는 과정에서는 검토하지 않았는데, 본 실험의 결과 전체적으로 조사된 수질결과를 보면 동일 시스템 면적에서 수용 가능한 굴 어미는 현재보다는 1배 이상 가능할 것으로 추정되는데, 보다 효과적이고 경제적인 면을 감안하면 이에 대한 향후 추가적인 연구가 추진되어야 할 것으로 보인다.

요 약

폐쇄순환여과시스템을 활용 굴 어미를 전체 42일 간의 평균 일간 사육수의 교환율은 0.5%였고, 총 사육수 교환은 21.3% 이었다. 실험기간 동안 수온은 실험개시 시 16.3°C에서 서서히 증가시켜 실험 21일째 22.7°C로 상승되었고, 이 후 실험종료 시까지 22.1 ± 0.4°C였고, 염분변화는 24.9 ± 0.4 이었고, 용존산소는 7.9-5.1 mg/L 이었고, pH 는 7.93 ± 0.15였다. 암모니아와 질산의 측정농도 범위는 각각 1.958-0.353 mg/L 과 1.34-0.47 mg/L 였고, 아질산 농도는 0.03-0.16 mg/L 였고, 용존성무기인의 농도는 0.42-0.03 mg/L, 규산염은 0.00-3.83 mg/L, 아질산을 제외하고 실험기간이 경과함에 따라 유의적 (P < 0.05) 으로 감소하는 경향을 보였다. 생식소 발달은 실험 42일 만에 암컷은 90.9%, 수컷은 94.4% 방란·방정이 가능한 완전히 성숙된 생식으로 발달하였다. 비만도는 실험 개시 시 25.2에서 종료 시 24.5로 유의적인 차이는 없었고, 크기요소인 평균 각장과 각폭은 실험 개시 시에 약간 성장하였지만 유의적인 차이는 없었다 (P < 0.05). 그러나 평균 각고는 개시 시 대비 종료 시 8.3 mm 성장하였고, 무게요소인 평균 전중, 육중 및 각중은 전체적으로 유의적인 증가가 나타났다. 실험기간 동안 전체 평균 생존율은 98.7%였고, 각장은 실험개시 시 평균 54.5 mm 에서 실험종료 시 59.2 mm 로 유의적인 성장변화는 없었지만, 평균 4.6 mm 성장하였고, 각고는 실험 14일째 평균 122.9 mm 까지 유의적인 성장이 관찰되었다. 실험결과 충분히 본 시스템의 시설용량으로 기존 가온해수유수 사육 방법 대비 에너지비용과 먹이공급량 대비 10분 1수준에서 채란 가능한 어미로 성숙시킬 수 있을 것으로 추정되어 향후 상업적 인공종묘배양장에서 충분히 활용 가능 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 2016년도 국립수산물과학원 수산과학연구사업 굴 건강종묘생산 기술 개발 연구 (R2016002)의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Bayne, B.L. and Scullard, C. (1977) Rates of nitrogen excretion by species of *Mytilus* (Bivalvia: Mollusca). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **57**: 355-369.
- Boulter, M. and Wilson, P. (1998) The use of physiological assessment techniques for determining the relative activity rates of bivalve shellfish during simulated depuration. *Journal of Shellfish Research*, **17**: 1627-1631.
- Brune, D.E., Schwartz, G., Eversole, A.G., Collier, J.A., Schwedler, T.E. (2003) Intensification of pond aquaculture and high rate photosynthetic system. *Aquacultural Engineering*, **28**: 65-86.
- Buchanan, J.T., Roppolo, G.S., Supan, J.E., Tiersch, T.R. (1998) Conditioning of Eastern oyster in a closed, recirculating system. *Journal of shellfish research*, **17**(4): 1183-1189.
- Buzin, F., Dupuya B, Lefebvre S, Barillé L, Haure J. (2015) Storage of Pacific oysters *Crassostrea gigas* in recirculating tank: Ammonia excretion and potential nitrification rates, *Aquacultural Engineering*, **64**: 8-14.
- Chung, E.Y., Hur, S.B., Hur, Y.B., Lee, J.S. (2001) Gonadal Maturation and Artificial Spawning of the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae), in Komso Bay. *Korea Journal of Fisheries Science and Technology*, **4**(4): 208-218.
- Colt, J.E. and Armstrong, D.A. (1981) Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, and molluscs. *In*: Allen, L.K.E.C. (Ed.), Bio-Engineering Symposium for Fish Culture. Bethesda, MD (USA) of the Fish Culture Section American Fisheries Society. Traverse City, MI (USA), pp. 34-47.
- De Abreu Corrêa, A., Dutra Albarnaz, J., Moresco, v., Rogério Poli, C., Luiz Teixeira, A., Maria Oliveira Simoes, C., Regina Monte Barardi, C. (2007) Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica serovar* Typhimurium. *Marine Environmental Research*, **63**: 479-489.
- Emerson, D.N. (1969) Influence of salinity of ammonia excretion rates and tissue constituents of euryhaline invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **29**: 1115-1133.
- Epifanio, C.E., Logan, C.M., Turk, C. (1975) Culture of six species of bivalves in a recirculating seawater system. Proceedings of the tenth European symposium on marine biology, Universa press, Wetteren. pp. 97-108.
- Epifanio, C.E. and Srna, R.F. (1975) Toxicity of ammonia, nitrite ion, nitrate ion and orthophosphate to *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, **33**: 241-246.
- Florence, B., Beatrice, D., Sebastien, L., Laurent, B., Joel H. (2015) Storage of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in recirculating tank: ammonia excretion and

- potential nitrification rates. *Aquacultural Engineering*, **64**: 8-14.
- Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, <http://www.fao.org/fishery/species/2669/en> (Retrieved online on January 28, 2011).
- Frias, R and Segovia, M. (2010) Gonad development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in a recirculating system: First step toward the development of conditioning and maturation protocols. *Journal of shellfish research*, **29**(2): 303-308.
- Galtsoff, P. S. (1964). The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin*, **64**: 1480.
- Hammen, C.S., Miller, H.F., Geer, W.H. (1966) Nitrogen excretion of *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **17**: 1199-1200.
- Keppler, C.J. (2007) Effects of ammonia on cellular biomarker responses in oysters (*Crassostrea virginica*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **78**: 63-66.
- Kuhn, D.D., Angier, M.W., Barbour, S.L., Smith, S.A., Flick Jr., G.J. (2013) Culture feasibility of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in zero-water exchange recirculating aquaculture systems using synthetically derived seawater and live feeds. *Aquacultural Engineering*, **54**: 45-48.
- Lee, H.J., Park, K.L., Choi, K.S. (2014) Conditioning of Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) using recirculation system: I. Induction of the gametogenesis using water temperature elevation. *The Korean Journal of Malacology*, **30**(2): 127-134.
- Mac Millian, R.J., Cawthorn, R.J., Whyte, S.K., Lyon, P.R. (1994) Design and system maintenance of a closed artificial seawater system for long term holding of bivalve shellfish. *Aquacultural Engineering*, **13**: 241-250.
- Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verdegem, M.C.J., Heinsbroek, L.T.N., Schneider O., Blancheton, J.P., Roque d'Orbcastel, E., Verretham, J.A.J. (2010) New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, **43**(3): 83-93.
- Metaxa, E., Deviller, G., Pagand, P., Alliaume, C., Casellas, C., Blancheton, J.P. (2006) High rate algal pond treatment for water reuse in a marine fish recirculation system: Water purification and fish health. *Aquaculture*, **252**: 92-101.
- Morales-Alamo, R. and Mann, R. (1989) Anatomical features in histological sections of *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) as an aid in measurements of gonad area for reproductive assessment. *Journal of shellfish research*, **8**: 71-82.
- Muñoz, R. and Guieysse, B. (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Resource*, **40**: 2799-2815.
- Oswald, W. J. (1988) Large-scale algal culture systems (engineering aspects). *In*: Micro-algal biotechnology (Borowitzka M. A. and Borowitzka L. J.), Cambridge University Press, pp. 357-394.
- Roger, F. and Segovia, M. (2010) Gonad development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in a recirculating system: first step toward the development of conditioning and maturation protocols. *Journal of shellfish research*, **29**(2) : 303-308.
- Shpigel, M., Barber, B.J., Mann, R. (1992) Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **161**: 15-25.
- Timmons, M.B. and Ebeling, J.M. (2007) Recirculating Aquaculture. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY.
- Wang, J. K. (2003) Conceptual design of a microalgae-based recirculating oyster and shrimp system. *Aquacultural Engineering*, **28**: 37-46.
- Welsh, D.T. and Castadelli, G. (2004) Bacterial nitrification activity directly associated with isolated benthic marine animals. *Marine Biology*, **144**: 1029-1037.
- 경상남도. (2015) 해양수산현황, pp. 1-598.
- 국토해양부. (2010) 해양환경공정시험기준, pp. 1-452.