

사육 밀도가 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 치어의 성장, 체조성, 스트레스, 항산화 및 면역반응에 미치는 영향

김재훈 · 황인준¹ · 박진우 · 조정현*

국립수산과학원 제주수산연구소, ¹국립수산과학원 서해수산연구소

Effects of Stocking Density on the Growth, Body Composition, Stress, Antioxidant Status and Immune Responses of Juvenile Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*

Jae-Hoon Kim, In Joon Hwang¹, Jin Woo Park and Jeong-Hyeon Cho*

Jeju Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Jeju 63610, Republic of Korea

¹West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Incheon 22383, Republic of Korea

A 12-week feeding trial was conducted to evaluate the effect of different stocking densities on the growth, body composition, stress, antioxidant status, and immune responses of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Juvenile rainbow trout (32.2±0.5 g) were randomly placed in eight experimental tanks, each containing 2,000 L of water, at stocking densities of 150, 300, 600, and 1,200 individual/m³. The trout were assigned to four treatments (2.4, 4.8, 9.7, and 19.4 kg/m³) in duplicates. Following after the feeding trial, the fish cultured in the less dense group showed significantly higher growth and survival (P<0.05). In terms of proximate composition, the whole body crude protein and lipid contents were lower in the denser group (19.4 kg/m³). Regarding the antioxidant and immune responses, the fish reared in the relatively denser group exhibited lower lysozyme, immunoglobulin M, and superoxide dismutase levels. The stress indicators, glucose and cortisol, were significantly lower in the less dense group (2.4 kg/m³), while the denser group (19.4 kg/m³) exhibited higher AST and ALP levels(P<0.05). The results showed that denser stocking has a crowding stress effect and negatively impacts growth and immune responses.

Keywords: Rainbow trout, Stocking density, Stress, Antioxidant, Immune response

서론

무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 전 세계적으로 널리 양식되는 담수 어종으로, 전 세계 양식 생산량은 2020년 기준 739.5천톤이 생산되었다(FAO, 2022). 국내에서는 현재 약 150 개 어가에서 연평균 약 3,000톤이 생산되고 있으며 국내 담수 어류 양식 생산량의 8%를 차지하고 있다. 생산량의 경우 담수 어류 중 뱀장어, 메기 및 붕어류 다음으로 네 번째로 많으며(2.4천톤), 생산 금액은 뱀장어 다음으로 두 번째에 달하고 있으나(22,151만원), 최근 생산량은 정체되고 있는 실정이다(KOSIS, 2022). 무지개송어는 주로 육상 수조에서 사육되기 때문에, 단위 면적당 생산성 증대를 위해서는 사육밀도와 관련한 연구 수

행이 요구된다. 사육밀도는 집약적인 양식업에서 대상 종의 성장, welfare 및 생산성에 직접적인 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나이며(Herrera et al., 2012; Menezes et al., 2015), 생존율 및 면역반응에도 영향을 미친다(Jia et al., 2016; Yarahmadi et al., 2016). Sea bass *Dicentrarchus labrax* (Sammouth et al., 2009), barramundi *Lates calcarifer* (Ardiansyah and Fotedar, 2016), Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* (Long et al., 2019) 및 Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Manduca et al., 2021) 등과 같은 어류에서는 높은 밀도에서 어체 성장 및 생산성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고되며, Atlantic salmon *Salmo salar* (Adams et al., 2007) 및 meager *Argyrosomus regius* (Millán-Cubillo et al., 2016)와 같은 어류에서는 낮은 사

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 780. 5460 Fax: +82. 64. 780. 5409

E-mail address: cjh.jan23@gmail.com



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0079>

Korean J Fish Aquat Sci 56(1), 79-88, February 2023

Received 29 September 2022; Revised 24 October 2022; Accepted 27 December 2022

저자 직위: 김재훈(연구원), 황인준(연구사), 박진우(연구사), 조정현(연구사)

육밀도가 부정적인 영향을 주는 것으로 보고된다. 이처럼 어종별로 사육 밀도에 따른 영향이 다르게 나타나기 때문에, 양식 생산성을 극대화하기 위해서는 최적 사육밀도의 구명이 요구된다 (Rowland et al., 2006).

이전 연구에서는 사육밀도에 기인하는 어류의 다양한 생리학적 반응에 대한 스트레스의 영향을 밝혔는데, 사육밀도에 의한 스트레스 노출 시 혈중 cortisol 농도의 증가와 함께 pro-inflammatory cytokine인 tumor necrosis factor- α (TNF α)의 발현을 저해한다고 보고하였다(Montero et al., 1999; MacKenzie et al., 2006). 또한 성장 관련 유전자(IGF-I 및 IGF-II) 및 선천적 면역 관련 유전자(g-type lysozyme 및 hepcidin)의 발현에도 영향을 줄 수 있다고 보고되었다(Salas-Leiton et al., 2010). 무지개송어의 경우, 고밀도 환경에서 metabolic-antioxidant 관련 유전자의 발현이 하향 조절되는 것으로 나타났으며(Aksakal et al., 2011), 장기간의 고밀도 환경 조건에서 triglycerides 및 cholesterol 감소와 같은 혈액 성상에 부정적 영향을 미치는 것으로 나타났다(Yarahmadi et al., 2014). 또한 North et al. (2006)에 의하면 사육 밀도의 증가에 따라 지느러미 부식 발생률이 높아진다고 보고하였다. Naderi et al. (2017)는 42.6 g의 무지개송어 치어를 60일간 20 kg/m³ 및 80 kg/m³ 사육밀도에서 양성 시 80 kg/m³ 사육밀도 실험구에서 간 단백질(liver proteome)의 부정적인 영향을 보고하였으며, Trenzado et al. (2006)은 33.75 g의 무지개송어 치어를 4주간 20 kg/m³ 및 100 kg/m³ 사육밀도에서 양성 시 100 kg/m³ 사육밀도 실험구의 성장 감소 및 스트레스 인자의 증가를 보고하였다. 결과적으로 사육밀도에 의한 스트레스의 증가는 이를 대처하기 위한 지질 및 단백질과 같은 에너지원의 소비가 체조성에 영향을 주며(Montero et al., 2001; Vargas-Chacoff et al., 2014), 스트레스로 인한 백혈구 및 혈중 단백질 감소는 lysozyme과 같은 면역 관련 인자의 감소로 이어질 수 있다(Sadhu et al., 2014).

이처럼 고밀도 환경에서 무지개송어의 welfare에 미치는 영향에 대한 수많은 조사에도 불구하고(North et al., 2006; Trenzado et al., 2006; Aksakal et al., 2011; Yarahmadi et al., 2014; Naderi et al., 2017), 국내 무지개송어의 사육밀도에 관한 보고는 반 순환여과장치를 이용한 Yoon et al. (1995)의 보고 및 유수식 양식에서 4 g 치어를 사육밀도 2.4–3.6 kg/m³ 수준으로 조절한다는 보고 외 전무한 실정이다(NIFS, 2017). 무지개송어와 같이 육상에서 양식이 이루어지는 어종의 경우 최적 사육 밀도의 구명은 효율적인 양식 생산 및 경영면에서 필수적이다. 따라서 본 연구는 무지개송어 치어의 양성과정 중 다양한 사육밀도(2.4–19.4 kg/m³)가 어체의 스트레스, 항산화 및 면역반응에 미치는 영향을 조사하고, 이러한 반응의 차이가 어체 성장, 생존율 및 체조성에 미치는 영향을 평가하였다. 또한 어체 성장 및 생존율 결과를 바탕으로 총 생물량과 사육밀도의 상관관계를 분석하고, 최적 입식 밀도 및 사육 가능 밀도의 구명을 통한 무지개송어 양식 생산성 향상을 위해 수행되었다.

Table 1. Rearing conditions for feeding trial of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

Item	Rearing conditions
Initial mean fish size (g) ^a	32.2±0.5
Tank volume (L)	2,000
Experimental period (week)	12
Feeding rate (% body weight of per day)	2.0
Water temperature (°C) ^b	18.9±0.7
Photoperiod (h:h)	9L:15D (light, 09:00-18:00)

^aMean±standard error mean (SEM) (N=30). ^bMean±standard deviation (SD) (N=8).

재료 및 방법

실험어 및 사육 관리

실험어는 무지개송어 양어장에서 구입한 치어(2.0±0.1 g)를 사육 실험실로 옮겨 10주간 배합사료로 순치하여 사용하였다. 사육 밀도(kg/m³)는 4,500마리의 무지개송어 치어(평균 체중=32.2±0.5 g)를 PVC (polyvinyl chloride) 재질의 2,000 L 사각 수조에 2.4 kg/m³, 4.8 kg/m³, 9.7 kg/m³ 및 19.4 kg/m³가 되도록 150, 300, 600 및 1,200마리씩 2반복으로 수용하여 설정하였다(Table 1). 실험기간 중 실험 사료 공급은 무지개송어용 상업 사료(조단백질 54.4% 및 조지질 9.1%, dry-matter)를 사용하여 총 생물량(kg)의 2%를 공급하였고, 2주 간격으로 각 실험구별 전체 무게를 측정하여 증가한 총 생물량의 2%를 재설정하여 공급량을 조절하였다(Table 1). 사육수는 사육 실험 수조에 2,400% tank/day의 비율로 교환하였다. 사육 실험 기간 동안 사육수온은 평균 18.9±0.7°C이었으며, 실험구별 평균 용존 산소는 각각 6.6±0.5 mg/L (2.4 kg/m³), 5.6±0.5 mg/L (4.8 kg/m³), 4.6±0.5 mg/L (9.7 kg/m³) 및 4.1±0.5 mg/L (19.4 kg/m³)이었다. 사료 공급은 1일 2회(09:00, 17:00) 공급하여 12주간 수행하였다(Table 1).

어체 측정 및 성분분석

사육 실험 종료 시에는 24시간 절식 후 각 실험구별 전체 무게를 측정하여 증체율(weight gain, WG), 일간 성장률(specific growth rate, SGR), 사료 계수(feed conversion ratio, FCR) 및 생존율(survival)을 계산하였다. 생물학적 지표를 조사하기 위해 각 수조별 30마리를 무작위로 취하여 비만도(condition factor, CF), 간 중량 지수(hepatosomatic index, HSI), 내장 중량 지수(viscerosomatic index, VSI) 및 내장지방 지수(intraperitoneal fat index, IFI)를 계산하였다. 각각의 지표는 아래와 같이 계산하였다.

$$WG (\%) = \frac{\text{final wet weight (g)} - \text{initial wet weight (g)}}{\text{initial wet weight (g)}} \times 100$$

$SGR (\% / \text{day}) = [\ln (\text{final mean body weight (g)}) - \ln (\text{initial mean body weight (g)})] \times 100 / \text{rearing period (days)}$

$FCR = \text{dry feed intake (g)} / \text{wet weight gain (g)}$

$\text{Survival (\%)} = \text{numbers of fish at harvest} / \text{number of fish stocked} \times 100$

$CF = \text{wet weight (g)} / \text{total length}^3 \times 100$

$HSI (\%) = \text{wet weight of liver (g)} / \text{wet weight (g)} \times 100$

$VSI (\%) = \text{wet weight of viscera (g)} / \text{wet weight (g)} \times 100$

$IFI (\%) = \text{wet weight of intraperitoneal fat (g)} / \text{wet weight (g)} \times 100$

전어체(whole-body) 일반성분분석은 각 수조에서 30마리씩을 무작위로 취하였고, 등 근육(dorsal muscle) 일반성분분석은 각 수조별 생물학적 지표 조사에 사용된 30마리를 이용하여 AOAC (2000) 방법에 따라 분석하였다.

혈액 성상 분석

혈액 시료는 사육밀도별 각 수조에서 무작위 채집된 30마리를 대상으로 헤파린 주사액이 처리된 1 mL 주사기로 미부 혈관(caudal vein)에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 얼음에서 5분간 식힌 후, 8,000 rpm에서 원심분리(12,225 g, CF-10; Daihan Scientific Co., Ltd., Daegu, Korea)하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 혈액분석기(Indiko™; Thermo Fisher Scientific Korea, Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), tryglycerides, cholesterol, glucose 및 total protein을 각각 분석하였다.

스트레스, 항산화 및 면역 분석

스트레스, 항산화 및 면역 분석은 혈액 성상 분석 조사에 사용된 30마리의 혈액을 이용하여 수행하였다. 혈중 lysozyme (Lyz), immunoglobulin M (IgM), superoxide dismutase (SOD) 활성 및 cortisol 측정은 상업용 측정 키트를 사용하여 (Cat. #E17296Fh, Lyz; E12045Fh, IgM; E15929Fh, SOD; E08487Fh, cortisol; CUSABIO, Wuhan, PRC), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay)을 통해 microplate reader (SYNERGY H1; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였다. 모든 분석 절차는 해당 제조업체의 프로토콜을 따라 수행하였다.

통계처리

분석 결과는 모두 평균±표준오차로 표시하였으며, 결과값의 통계분석은 Windows 용 IBM SPSS 19 software package (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석하였다. 데이

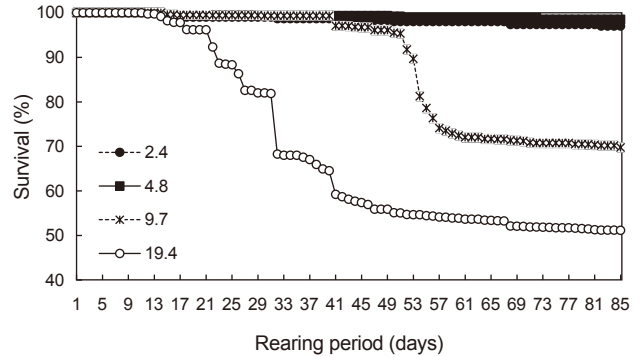


Fig. 1. Survival of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at different initial stocking densities for 12 weeks.

터는 Shapiro-Wilk 및 Levene의 테스트를 각각 사용하여 분산의 정규성 및 동질성을 포함한 가정에 대해 평가되었으며 위반(violation)이 감지되지 않았다($P > 0.05$). 데이터의 통계적 분석은 95%의 유의 수준($P < 0.05$)으로 ANOVA를 사용하여 수행하였다. 통계적 유의차가 확인되면 Tukey's honestly significant difference 검정을 사용하여 평균 간의 유의적인 차이를 평가하였다. 사육밀도와 최종 생물량 사이의 broken-line regression model은 Cho et al. (2021)의 방법에 따라 나타내었고, 사육밀도와 어체 성장 사이의 상관관계는 Pearson correlation 분석을 사용하여 나타내었다.

결과 및 고찰

본 연구는 무지개송어 양식 생산성 향상을 위해 다양한 사육 밀도(2.4–19.4 kg/m³)가 어체에 미치는 영향을 조사하여 최적 사육밀도를 제시하고자 하였다.

12주간의 사육 실험에 따른 사육밀도별 생존율은 2.4 kg/m³ (97.0%) 및 4.8 kg/m³ (98.5%) 실험구간 유의적인 차이가 없었으나, 9.7 kg/m³ (71.5%) 및 19.4 kg/m³ (51.1%) 실험구와 비교하여 유의적인 차이가 나타났다($P < 0.001$; Table 2, Fig. 1). 어류의 경우 저 산소증(hypoxia)은 대사 활동에 필요한 수중 용존 산소량이 부족한 상황을 나타내며, 무지개송어의 경우 일반적으로 용존 산소량이 5.0 mg/L 미만일 때, 저산소증의 상황으로 간주할 수 있다(Magnori et al., 2018, 2019). Aksakal and Ekinci (2021)은 8.79 g의 무지개송어 치어를 대상으로 용존 산소량 4.0±0.5 mg/L 및 7.5±0.5 mg/L의 사육 환경에서 28일간 사육하였을 때, 용존 산소량 4.0±0.5 mg/L 실험구에서 유의적으로 낮은 생존율(49.6±2.7%)과 어체 성장을 나타내었고, 면역 관련 유전자 발현의 억제를 보고하였다. 본 연구에서 사육 기간 동안 9.7 kg/m³ 및 19.4 kg/m³ 실험구의 평균 용존 산소량은 각각 4.6±0.5 mg/L 및 4.1±0.5 mg/L이었고, 두 실험구의 수중 낮은 용존 산소량이 생존율 및 어체 성장에 부정적인 영향을 미친 것으로 판단된다.

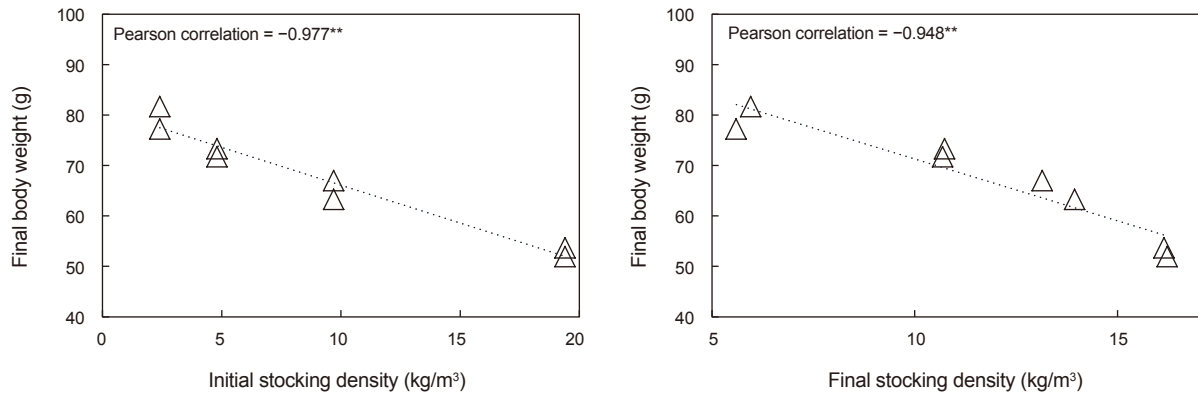


Fig. 2. Pearson correlation coefficients between initial stocking density and final body weight (left) and correlation coefficients between final stocking density and final body weight (right). ** $P < 0.01$.

어체 성장 및 생물학적 지표 결과를 Table 2에 나타내었다. WG 및 SGR은 사육밀도가 낮을수록 유의적으로 높은 성장을 나타냈다($P < 0.001$). FCR의 경우 실험구간 유의적인 차이가 없었으나($P > 0.05$), 사육밀도가 낮을수록 낮아지는 경향이 보였다. 사육밀도는 집약적인 양식업에서 대상 생물의 성장, 대사 및 welfare에 영향을 미치는 요소로서 중요하게 고려되어야 한다 (Hwang et al., 2014; Heras et al., 2015). Silver perch *Bidyanus bidyanus* (Rowland et al., 2006), African catfish *Clarias gariepinus* 및 vundu catfish *Heterobranchus longifilis* (Toko et al., 2007)에서는 저밀도 사육 시 성장률이 낮아지는 반면, Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* (Long et al., 2019) 및 Senegalese

sole *Solea senegalensis* (Salas-Leiton et al., 2010)에서는 고밀도 사육 시 성장률이 낮아졌다. 이와 같이 어종에 따라 사육밀도가 어체 성장에 미치는 영향이 다르기 때문에 해당 종의 최적 사육 밀도의 구명은 매우 중요하다. 무지개송어는 다른 어종과 비교하여 저밀도 사육 및 고밀도 사육에 의한 영향이 낮은 어종으로 보고되지만(Håstein, 2004), 지나치게 낮은 사육밀도 환경에서는 공격적 지배 행동(aggressive dominant behavior)을 유발하여 먹이 섭취 반응 저하에 따른 성장 부진이 보고된다(Ellis et al., 2002). 또한 밀도가 높아질수록 성장 및 사료 효율의 감소(Ellis et al., 2002; Cho et al., 2022)는 고밀도 사육이 무지개송어의 생리 상태에 부정적인 영향을 미치는 요인임을 시사한다.

Table 2. Growth performance and biological indices of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at different initial stocking densities for 12 weeks¹

Parameter	Stocking density (kg/m ³)				P-value
	2.4	4.8	9.7	19.4	
Growth performance					
Initial weight (g)	32.33±1.53	31.92±0.22	32.20±0.17	32.25±0.25	0.982
Final weight (g)	79.18±2.47 ^a	72.40±0.66 ^a	63.02±0.02 ^b	44.85±0.17 ^c	0.000
Weight gain (WG, %)	145.07±4.00 ^a	126.87±3.60 ^b	95.72±0.94 ^c	39.07±0.54 ^d	0.000
Specific growth rate (SGR, %/day)	0.65±0.01 ^a	0.59±0.01 ^b	0.49±0.00 ^c	0.24±0.00 ^d	0.000
Feed conversion ratio (FCR)	0.92±0.01	0.94±0.02	1.00±0.01	1.03±0.07	0.215
Survival (%)	97.00±0.33 ^a	98.50±0.83 ^a	71.50±2.50 ^b	51.13±0.96 ^c	0.000
Initial biomass (kg/m ³)	2.43±0.12 ^a	4.79±0.03 ^b	9.66±0.05 ^c	19.35±0.15 ^d	0.000
Final biomass (kg/m ³)	5.78±0.18 ^a	10.72±0.03 ^b	13.55±0.40 ^c	16.19±0.04 ^d	0.000
Biological indices					
Condition factor (CF)	1.05±0.01	1.00±0.00	1.00±0.02	0.96±0.04	0.120
Hepatosomatic index (HSI, %)	1.07±0.06	1.01±0.04	0.97±0.07	0.98±0.04	0.653
Viscerosomatic index (VSI, %)	4.30±0.18	4.19±0.01	4.01±0.10	3.93±0.16	0.313
Intraperitoneal fat index (IFI, %)	0.25±0.01	0.22±0.05	0.18±0.04	0.13±0.01	0.133

¹Mean±SEM (N=2 tanks) with different superscripts within each row are significantly different ($P < 0.05$) by Tukey's test.

선행연구 및 본 실험의 pearson correlation coefficient 분석 결과로부터 무지개송어의 사육밀도와 어체 성장은 부적 상관관계 (negative correlation)를 나타내는 것으로 확인되었고(Fig. 2), 저밀도 사육환경 실험구(2.4 kg/m³ 및 4.8 kg/m³)의 높은 어체 성장과 생존율의 결과를 미루어 볼 때, 본 연구에서 설정된 저밀도 실험구는 무지개송어의 성장에 부정적인 영향을 주는 밀도가 아닌 것으로 판단된다.

12주간의 사육 실험에 따른 최종 생물량(biomass, 평균 어체 중×마릿수)은 초기 입식 밀도가 높은 실험구 순으로 최종 생물량의 유의적인 차이를 보였다(P<0.001; Table 2). 19.4 kg/m³ 실험구의 경우, 실험구간 유의적으로 가장 낮은 생존율(51.1%)을 보였음에도 불구하고 가장 높은 최종 생물량을 나타냈다(16.2 kg/m³). 반면, 2.4 kg/m³ 및 4.8 kg/m³ 실험구의 경우, 실험구간 유의적으로 높은 생존율(97.0–98.5%)을 보였음에도 불구하고 낮은 최종 생물량을 나타냈다(5.8–10.7 kg/m³). 무지개송어 양식업의 경제성을 고려하였을 때 저밀도 양식은 잉여 사육 공간이 발생하여 낮은 생산성으로 이어지며, 고밀도 양식은 상대적으로 높은 폐사율로 인해 낮은 생산 효율로 이어질 수 있다. 따라서 어체 성장 및 생존율을 고려한 최적 밀도의 수용은 양식 대상 종의 최대 생산을 위한 가장 합리적인 방법일 것이다. 본 실험의 12주간 생존율 추이를 나타낸 그래프에서(Fig. 1), 9.7 kg/m³ 및 19.4 kg/m³ 실험구의 생존율은 사육밀도가 15 kg/m³에 도달할 때 감소하는 경향이 나타났다. 따라서 약 32 g의 무지개송어 치어를 입식하여 양성할 시 15 kg/m³ 이상의 밀도에서는 폐사 방지를 위한 사육밀도의 조절이 권장되며, 무지개송어 치어는 생산적인 측면에서 15 kg/m³의 밀도까지 고밀도 사육이 가능한 것으로 확인되었다. 밀도별 생산 효율을 구하기 위해 입식 밀도 및 최종 생물량에 따른 최적 입식 밀도(optimum stocking density) 상관 그래프와 two-slope straight 및 quadratic broken-line regression model을 Fig. 3에 나타내었다. 약 30 g의 무

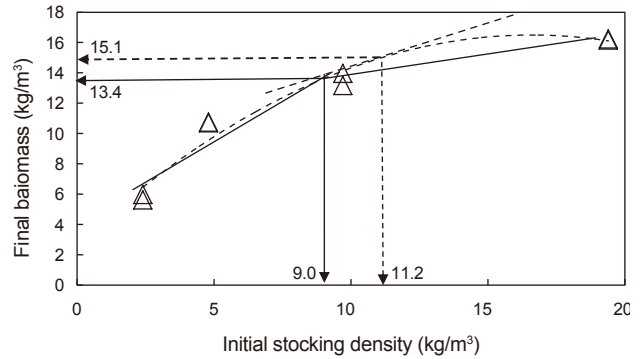


Fig. 3. A two-slope straight (solid line) and quadratic (dashed line) broken-line regression models were fitted to datasets of final biomass in response to the initial stocking density of the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. The equation of broken-line models for the final biomass dataset are [final biomass (kg/m³)=13.3608+0.9927(x-9.0040)+0.2722(x-9.0040) (R²=0.9557), where (x-9.0040) is defined as zero at the values of (x<9.0040) and [final biomass (kg/m³)=15.0520-0.0498x(x-11.2138)+0.5373(x-11.2138) (R²=0.9612), where (x-11.2138) is defined as zero at the values of (x<11.2138). The x represents initial stocking density (kg/m³).

지개송어를 12주간 사육 시의 생산성을 고려하였을 때, 초기 입식 밀도는 9.0–11.2 kg/m³ 수용 시 최대 생산 효율(13.4–15.1 kg/m³)을 나타내는 것으로 확인되었다.

사육밀도에 따른 12주간의 CF, HSI, VSI 및 IFI의 변화는 실험구간 유의적인 차이가 없었으나(P>0.05), 사육밀도가 높을수록 낮아지는 경향이 보였다. 12주간의 사육 실험에 따른 사육밀도별 전어체 및 등 근육의 일반성분을 Table 3에 나타내었다. 전어체 분석 결과, 사육밀도가 낮을수록 조지질 함량은 유의적으

Table 3. Proximate composition of whole-body and dorsal muscle of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at different initial stocking densities for 12 weeks¹

Measurement	Stocking density (kg/m ³)				P-value
	2.4	4.8	9.7	19.4	
Whole-body (%)					
Moisture	75.5±0.3	76.2±0.2	76.9±0.2	76.8±0.1	0.065
Crude protein	18.5±0.2	17.8±0.2	17.7±0.1	17.3±0.1	0.075
Crude lipid	3.9±0.1 ^a	3.8±0.1 ^{ab}	3.4±0.1 ^{ab}	3.1±0.1 ^b	0.037
Crude ash	2.9±0.0	2.7±0.1	2.9±0.0	2.9±0.0	0.118
Dorsal muscle (%)					
Moisture	78.2±0.1 ^c	78.3±0.0 ^{bc}	78.9±0.1 ^{ab}	79.5±0.0 ^a	0.005
Crude protein	20.3±0.1 ^a	20.1±0.1 ^{ab}	19.5±0.3 ^{ab}	18.8±0.1 ^b	0.033
Crude lipid	0.9±0.0	1.0±0.0	0.9±0.0	0.9±0.0	0.612
Crude ash	2.3±0.0 ^a	2.3±0.0 ^{ab}	2.1±0.0 ^b	2.1±0.0 ^b	0.010

¹Mean±SEM (N=2) with different superscripts within each row are significantly different (P<0.05) by Tukey's test.

로 증가하였으며($P<0.05$), 등 근육의 경우 사육밀도가 낮을수록 조단백질 함량은 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). 선행연구에 따르면 고밀도에서 사육되는 어류는 스트레스에 대처하기 위해 지질 및 단백질과 같은 비축된 에너지원의 높은 소비가 요구된다고 밝혔다(Montero et al., 2001; Vargas-Chacoff et al., 2014). 또한 Ren et al. (2017)는 고밀도에서 Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*의 간 및 근육 내 지질의 유의적인 감소와 HSI의 감소 현상을 고밀도 사육 시의 밀집 스트레스로 인한 대사 에너지의 재할당(reallocation)이 비축된 지질의 소모로 이어진다고 보고하였다. 상기 결과는 piabanha *Brycon insignis* (Tolussi et al., 2010) 및 Atlantic salmon (Basur et al., 2010)의 고밀도 환경에서 HSI가 감소하는 결과와도 일치하였다. 본 연구에서 고밀도 실험구의 간 중량과 내장 지방의 감소 및 전이체의 조지질 및 조단백질 함량의 유의적인 감소는 고밀도 환경에서 스트레스 요인에 대처하기 위한 에너지 소비에 기인한 결과로 판단되며, 지질 함량의 감소가 나타난 부위는 무지개송어의 지질 저장(depot)이 이루어지는 곳으로 추측된다.

사육 밀도에 따른 혈액 성분 변화 결과를 Table 4에 나타내었다. 사육밀도가 높을수록 혈장 AST, ALT 및 glucose 농도가 증가하였으며, triglycerides, cholesterol 및 total protein 농도는 감소하였다. AST 및 ALT는 어류의 미토콘드리아에 존재하는 aminotransferases로써, 간 췌장(hepatopancreas)의 기능 및 손상 진단에 중요한 인자이며(Zhou et al., 2014), 스트레스 지표로도 활용된다(Haridas et al., 2017). 본 실험에서 AST 및 ALT는 사육밀도가 높을수록 증가했으며, 이는 고밀도 환경에서 golden pompano *Trachinotus ovatus* (Zhou et al., 2014) 및 Nile tilapia (Liu et al., 2018)의 AST 및 ALT의 함량의 증가 결과와 유사하였다. 따라서, 무지개송어의 간 건강 상태는 높은 밀도에 따른 스트레스에 영향을 받는 것으로 나타났다. Glucose의 농도 또한 스트레스에 대한 반응을 나타내며, 스트레스로 인한 에너지 소비를 대처하기 위해 어류의 대사과정을 돕는 필수 에너지 저장고이다(Bonga, 1997; Teles et al., 2007). 무지개송어의 사육밀도가 높을수록 glucose 농도의 유의적인 증가

는 Sadhu et al. (2014)의 연구결과와 일치하였으며, Yin et al. (1995)의 보고에 따라 cortisol에 의해 유도된 gluconeogenesis가 glucose의 증가 원인으로 판단된다. 사육밀도가 어체 성장에 영향을 미치는 호르몬 및 대사 조절에 관련된 스트레스 경로에 영향을 미친다는 것은 널리 알려져 있다(Pickering, 1993; Laiz-Carrión et al., 2012). 혈중 cortisol과 glucose 농도는 어류의 스트레스 정도를 나타내는 지표이며(EL-Khaldi, 2010), 혈중 cortisol의 증가는 스트레스를 받고 있는 어류에게 매우 민감한 신호로 간주된다(Mommsen et al., 1999). Cortisol은 경골어류에서 합성되는 주요 corticosteroid이며, 혈장 내 cortisol 농도는 스트레스 자극 시 1차 반응으로 증가된다(Barton, 2002). 더욱이 혈장 glucose 농도는 스트레스에 대한 2차 반응으로 나타나며, 이것은 추가 에너지 공급을 위한 대사 작용으로 나타난다(Bonga, 1997). 본 연구 결과, 가장 높은 사육밀도의 무지개송어에서 혈중 cortisol과 glucose의 유의적인 증가를 나타냈다. triglycerides 및 cholesterol과 같은 혈장 지질은 척추동물의 세포 대사에 필수적인 성분으로, triglycerides는 주로 에너지의 대사과정에 관여하며, cholesterol은 세포막의 기본 성분으로 steroid 호르몬 합성에 관여하는 최상위 전구물질이다(Ni et al., 2016). 선행연구의 보고에 따르면, 스트레스를 받는 환경에서 더 많은 에너지 소비를 대처하기 위해 triglycerides의 이용이 증가한다고 밝혔다(Ni et al., 2016; Ren et al., 2017). 본 연구에서도 고밀도 사육환경에서 triglycerides의 농도가 유의적으로 감소하는 유사한 결과가 나타났는데, 이는 어류가 스트레스를 받는 동안 triglycerides의 이용이 높아지는 것을 시사한다. 어류에서 high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)는 간에서 cholesterol의 대사를 위해 말초 조직(peripheral tissue)에서 간으로 운반하는 역할을 한다(Zhu et al., 2014). 비록 본 연구에서 HDL-C의 분석은 수행하지 못하였지만, 높은 사육밀도의 어류에서 cholesterol의 낮은 값은 Ni et al. (2016) 및 Ren et al. (2017)의 연구결과와 유사하였으며, 이는 고밀도 환경에서 HDL-C의 감소에 따른 무지개송어의 cholesterol 대사와 cholesterol 이용의 감소로 추정된다. 어류의 혈중 total protein의 농

Table 4. Plasma metabolites of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at different initial stocking densities for 12 weeks¹

Measurement	Stocking density (kg/m ³)				P-value
	2.4	4.8	9.7	19.4	
Plasma metabolites (24 h postprandial)					
AST ² (U/l)	24.6±1.2 ^b	37.7±4.0 ^{ab}	42.8±2.0 ^a	44.7±5.2 ^a	0.006
ALT ³ (U/l)	69.3±4.8	77.3±0.6	82.4±9.1	90.7±3.2	0.089
Triglycerides (mg/dL)	160.7±1.8 ^a	142.6±5.2 ^b	136.5±1.6 ^{bc}	128.6±1.8 ^c	0.000
Cholesterol (mg/dL)	272.5±11.6 ^a	249.7±6.0 ^{ab}	227.9±2.9 ^{bc}	211.7±1.2 ^c	0.000
Glucose (mg/dL)	122.5±7.4 ^b	138.6±9.4 ^{ab}	137.6±0.6 ^{ab}	161.2±2.8 ^a	0.006
Total proteins (mg/dL)	3.61±0.07	3.65±0.07	3.57±0.18	3.40±0.07	0.425

¹Mean±SEM (N=2 tanks; thirty pooled fish per tank) with different superscripts within each row are significantly different (P<0.05) by Tukey's test. ²Aspartate aminotransferase. ³Alanine aminotransferase.

도 변화는 면역과 관련된 생리적인 반응을 나타냄과 동시에 건강 상태의 지표로서 사용된다(Binuramesh and Michael, 2011; Tahmasebi-Kohyani et al., 2012). Sadhu et al. (2014) 및 Yin et al. (1995)는 높은 사육밀도에서 어류의 total protein이 감소된다고 보고하였으며, 스트레스로 인한 total protein의 뚜렷한 변화는 질병 감염 위험을 증가시킬 수 있다고 보고하였다. 본 연구의 사육밀도별 total protein은 밀도가 높아짐에 따라 감소하는 경향이 나타났으며, 고밀도 실험구에서 저밀도 실험구에 비해 생존율이 낮은 결과는 total protein의 낮은 농도가 어체의 면역 저하와 관련된 생리적인 반응에 부정적인 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

사육밀도에 따른 스트레스, 항산화 및 면역 관련 인자의 혈중 농도를 Fig. 4에 나타내었다. Lyz, IgM 및 SOD는 사육밀도가 높을수록 감소하는 경향이 관찰되었으며, cortisol은 사육밀도가 높을수록 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). 본 실험의 결과로부터 사육밀도는 무지개송어 치어의 항산화 및 면역력과 스트레스 반응에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 일반적으로 Lyz 활성은 어류의 비특이적 면역의 중요한 매개변수 중 하나로 활용되어왔다(Saurabh and Sahoo, 2008). 또한 사육밀도를 포함하여 어체 선별에 따른 핸들링, 운송, 수질 오염 및 영양 등과 같은 스트레스 요인이 Lyz 활성에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Saurabh and Sahoo, 2008). 마찬가지로 Möck and Peters (1990)는 핸들링, 운송 및 수질 오염과 같은 스트레스 요인이 무지개송어의 혈청 및 신장에서 Lyz 활성을 감소시킨다고 보고하였다. 본 연구결과에서도 사육밀도가 증가함에 따라 Lyz 활성 감소 및 cortisol 농도 증가가 관찰되었으며, 이러한 결과들은 사육밀도가 Lyz 활성에 영향을 미치는 요인임을 나타낸다. IgM은 경골어류에서 발견되는 중요한 immunoglobulin이며, 특히 경골어류는 다른 어류보다 IgM에 더 의존적이다(Hikima et al., 2011). SOD는 면역계의 기능에 중요한 역할을 하는 항산화 효소 중 하나이며 조직에서 superoxide anions을 제거하는 기능을 가진다(Zhou et al., 2010). 본 연구 결과, 고밀도 사육환경에서 IgM 및 SOD의 활성이 감소하였는데, Liu et al. (2015) 및 Cho et al. (2022)는 높은 사육 밀도가 어류의 cortisol 농도를 증가시킨 후, IgM 활성을 감소시킨다고 보고하였다. 또한 SOD 활성 변화의 결과는 사육밀도가 무지개송어의 산화적 스트레스 변화에 영향을 미치는 요인으로 판단된다.

상기의 연구결과로부터, 높은 사육밀도로 인한 스트레스는 무지개송어 치어에 부정적인 영향을 주는 것으로 판단된다. 그 결과로서, 스트레스 요인에 노출 시(cortisol 및 glucose 증가) 어체 성장 및 사료 효율(WG 및 생존율 감소, FCR 증가), 건강 상태 (AST 및 ALT 증가), 비특이적 면역반응(Lyz, IgM 및 SOD 감소) 등이 높은 사육밀도의 부정적인 영향을 나타내었다. 또한, 30 g의 무지개송어 치어를 18.9±0.7°C 사육수온에서 12주간 사육 시, 총 생물량이 약 15 kg/m³을 초과 할 때, 지속적인 폐사가 발생했으며 입식 밀도와 총 생물량의 상관 그래프

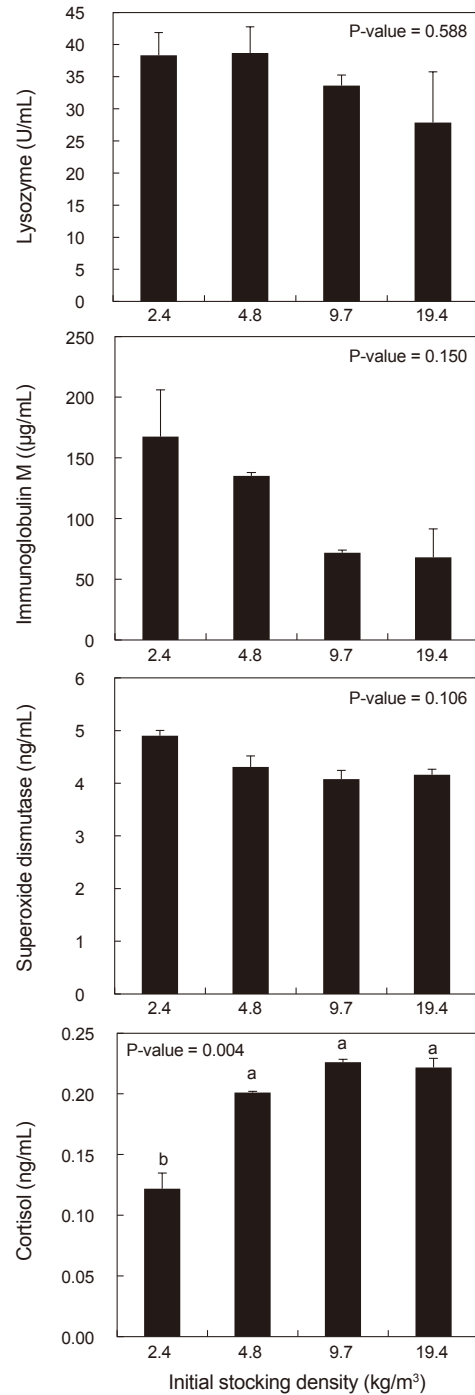


Fig. 4. Interaction effect means of plasma lysozyme, immunoglobulin M, superoxide dismutase and cortisol of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at different initial stocking densities for 12 weeks. Statistical difference in the concentration (mean±SEM) within the interaction effect (N=2 tanks; thirty pooled fish per tank) in response to the different feeding rates was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). When significance ($P < 0.05$) was detected, multiple range test using the Tukey's honestly significant difference was performed.

부터 적정 초기 입식 밀도는 9.0–11.2 kg/m³에서 총 생물량이 13.4–15.1 kg/m³에 달할 시 밀도 조절이 필요할 것으로 판단된다. 본 연구는 무지개송어의 양식 생산성 향상을 위한 기초자료로서 양식 현장에 직접적인 도움이 될 것으로 판단된다.

사 사

사육 관리에 도움을 주신 조아현, 성소연, 한영심 선생님께 감사드립니다. 이 연구는 2023년도 국립수산물과학원 수산시험 연구사업 (R2023025)의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

- Adams CE, Turnbull JF, Bell A, Bron JE and Huntingford FA. 2007. Multiple determinants of welfare in farmed fish: Stocking density, disturbance, and aggression in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can J Fish Aquat Sci* 64, 336-344. <https://doi.org/10.1139/f07-018>.
- Aksakal E and Ekinci D. 2021. Effects of hypoxia and hyperoxia on growth parameters and transcription levels of growth, immune system and stress related genes in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 262, 111060. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111060>.
- Aksakal E, Ekinci D, Erdoğan O, Beydemir Ş, Alim Z and Ceyhan SB. 2011. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic-antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Livest Sci* 141, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.07.006>.
- Ardiansyah and Fotedar R. 2016. Water quality, growth and stress responses of juvenile barramundi (*Lates calarifer* Bloch), reared at four different densities in integrated recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 458, 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.001>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.). AOAC, Gaithersburg, MD, U.S.A.
- Barton BA. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Intergr Comp Biol* 42, 517-525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>.
- Basur TV, Longland R and Wilkinson RJ. 2010. Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol Biochem* 36, 445-450. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9314-x>.
- Binuramesh C and Michael RD. 2011. Diel variations in selected serum immune parameters in *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol* 30, 824-829. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.004>.
- Bonga SEW. 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev* 77, 591-625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>.
- Cho JH, Bae J and Hwang IJ. 2022. Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal on the growth, stress, and immune responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at different stocking densities. *Aquac Rep* 25, 101202. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101202>.
- Cho JH, Lee S, Lee BJ, Hur SW, Kim KW, Son MH and Yoo DJ. 2021. A preliminary study of dietary protein requirement of juvenile marbled flounder (*Pseudopleuronectes yokohamae*). *Anim Nutr* 7, 548-555. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.009>.
- EL-Khaldi ATF. 2010. Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Saudi J Biol Sci* 17, 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.04.009>.
- Ellis T, North B, Scott A, Bromage N, Porter M and Gadd D. 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J Fish Biol* 61, 493-531. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb00893.x>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2022. The state of world fisheries and aquaculture 2022, Rome. Retrieved from <https://fao.org/3/cc0461en/cc0461en.pdf> on Jun 24, 2022.
- Håsteint T. 2004. Animal welfare issues relating to aquaculture. In: OIE Global Conference on Animal Welfare. Portsmouth, NH, U.S.A., 219-227.
- Haridas H, Verma AK, Rathore G, Prakash C, Sawnat PB and Rani AMB. 2017. Enhanced growth and immune-physiological response of genetically improved farmed tilapia in indoor biofloc units at different stocking densities. *Aquacult Res* 48, 4346-4355. <https://doi.org/10.1111/are.13256>.
- Heras VDL, Martos-Sitcha JA, Yúfera M, Mancera JM and Martínez-Rodríguez G. 2015. Influence of stocking density on growth, metabolism and stress of thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) juveniles. *Aquaculture* 448, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.033>.
- Herrera M, Ruiz-Jarado I, Hachero I, Vargas-Chacoff L, Amo A and Mancera JM. 2012. Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill (*Scophthalmus rhombus*). *Aquacult Int* 20, 1041-1052. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9513-9>.
- Hikima J, Jung T and Aoki T. 2011. Immunoglobulin genes and their transcriptional control in teleosts. *Dev Comp Immunol* 35, 924-936. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.10.011>.
- Hwang HK, Son MH, Myeong JI, Kim CW and Min BH. 2014. Effects of stocking density on the cage culture of Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture* 434, 303-306. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.016>.
- Jia R, Liu BL, Feng WR, Han C, Huang B and Lei JL. 2016. Stress and immune responses in skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) under different stocking densities. *Fish Shellfish Immunol* 55, 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.032>.

- KOSIS (Korea Statistical Information Service). 2022. Fishery Production Survey. KOSIS, Daejeon, Korea. Retrieved from <http://kostat.go.kr> on Mar 24, 2022.
- Laiz-Carrión R, Vaiana IR, Cejas JR, Ruiz-Jarado I, Jerez S, Martos JA, Eduardo AB and Mancera JM. 2012. Influence of food deprivation and high stocking density on energetic metabolism and stress response in red porgy, *Pagrus pagrus*. L. Aquac Res 20, 585-599. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9488-y>.
- Liu B, Liu Y and Wang X. 2015. The effect of stocking density on growth and seven physiological parameters with assessment of their potential as stress response indicators for the atlantic salmon (*Salmo salar*). Mar Freshw Behav Physiol 48, 177-192. <https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1034956>.
- Liu G, Ye Z, Liu D, Zhao J, Sivaramasamy E, Deng Y and Zhu S. 2018. Influence of stocking density on growth, digestive enzyme activities, immune responses, antioxidant of *Oreochromis niloticus* fingerlings in biofloc systems. Fish Shellfish Immun 81, 416-422. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.047>.
- Long L, Zhang H, Ni Q, Liu H, Wu F and Wang X. 2019. Effects of stocking density on growth, stress, and immune responses of juvenile chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in a recirculating aquaculture system. Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol 219, 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.02.002>.
- MacKenzie S, Iliiev D, Liarte C, Koskinen H, Planas JV, Goetz FW, Mölsä H, Krasnov A and Tort L. 2006. Transcriptional analysis of LPS-stimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol. Mol Immunol 43, 1340-1348. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.09.005>.
- Magnori LJ, Eding E, Leguen I, Prunet P, Geurden I, Ozório ROA and Schrama JW. 2018. Hypoxia, but not an electrolyte-imbalanced diet, reduces feed intake, growth and oxygen consumption in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Sci Rep 8, 4965. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23352-z>.
- Magnori LJ, Novais SC, Eding E, Leguen I, Lemos MFL, Ozório ROA, Geurden I, Prunet P and Schrama JW. 2019. Acute stress and an electrolyte-imbalanced diet, but not chronic hypoxia, increase oxidative stress and hamper innate immune status in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) isogenic line. Front Physiol 10, 453. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00453>.
- Manduca LG, da Silva MA, de Alvarenga ÉR, de Oliveira Alves GF, Ferreira NH, de Alencar Teixeira E, Fernandes AFA, de Almeida e Silva M and Turra EM. 2021. Effects of different stocking densities on nile tilapia performance and profitability of a biofloc system with a minimum water exchange. Aquaculture 530, 735814. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735814>.
- Menezes C, Ruiz-Jarado I, Martos-Sitcha JA, Toni C, Salbego I and Becker A. 2015. The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): A metabolic and endocrine approach. Aquaculture 435, 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.044>.
- Millán-Cubillo AF, Martos-Sitcha JA, Ruiz-Jarado I, Cárdenas S and Mancera JM. 2016. Low stocking density negatively affects growth, metabolism and stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). Aquaculture 451, 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.034>.
- Möck A and Peters G. 1990. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. J Fish Biol 37, 873-885. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb03591.x>.
- Mommsen TP, Vijayan MM and Moon TW. 1999. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev Fish Biol Fish 9, 211-268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>.
- Montero D, Izquierdo MS, Tort L, Robaina L and Vergara JM. 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilt-head seabream, *Sparus aurata*, juveniles. Fish Physiol Biochem 20, 53-60. <https://doi.org/10.1023/A:1007719928905>.
- Montero D, Robaina LE, Socorro J, Vergara JM, Tort L and Izquierdo MS. 2001. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acids deficient diet. Fish Physiol Biochem 24, 63-72. <https://doi.org/10.1023/A:1011145426543>.
- Naderi M, Keyvanshokoh S, Salati AP and Ghaedi A. 2017. Effects of chronic high stocking density on liver proteome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiol Biochem 43, 1373-1385. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0378-8>.
- NIFS (National Institute of Fisheries Science). 2017. Manual for Rainbow Trout Farming. NIFS, Busan, Korea.
- Ni M, Wen I, Li J, Chi M, Bu Y, Ren Y, Zhang M, Song Z and Ding H. 2016. Effects of stocking density on mortality, growth and physiology of juvenile amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). Aquac Res 47, 1596-1604. <https://doi.org/10.1111/are.12620>.
- North BP, Turnbull JF, Ellis T, Porter MJ, Migaud H, Bron J and Bromage NR. 2006. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 255, 466-479. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.004>.
- Pickering AD. 1993. Growth and stress in fish production. In: Proceedings of the Fourth International Symposium on Genetics in Aquaculture. Windermere Laboratory, Far Sawrey, Ambleside, U.K., 51-63. <https://doi.org/10.1016/B978-0->

- 444-81527-9.50010-5.
- Ren Y, Wen H, Li Y, Li J, He F and Ni M. 2017. Effects of stocking density on lipid deposition and expression of lipid-related genes in amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Fish Physiol Biochem* 43, 1707-1720. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0403-y>.
- Rowland SJ, Mifsud C, Nixon M and Boyd P. 2006. Effects of stocking density on the performance of the Australian freshwater silver perch (*Bidyanus bidyanus*) in cages. *Aquaculture* 253, 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.049>.
- Salas-Leiton E, Anguis V, Martín-Antonio B, Crespo D, Planas JV, Infante C, Cañavate JP and Manchado M. 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish Shell Immuno* 28, 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.006>.
- Sadhu N, Sharma SRK, Joseph S, Dube P and Philipose KK. 2014. Chronic stress due to high stocking density in open sea cage farming induces variation in biochemical and immunological functions in Asia sea bass (*Lates calcarifer*, Bloch). *Fish Physiol Biochem* 40, 1105-1113. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9909-8>.
- Sammouth S, D'Orbcastel ER, Gasset G, Lemarié G, Breuil G, Marino JL, Coeurdacier S, Fivelst AD and Blancheton JP. 2009. The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquac Eng* 40, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2008.11.004>.
- Saurabh S and Sahoo S. 2008. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac Res* 39, 223-239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>.
- Tahmasebi-Kohyani A, Keyvanshokoo S, Nematollahi A, Mahmoudi N and Pasha-Zanoosi H. 2012. Effects of dietary nucleotides supplementation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance and acute stress response. *Fish Physiol Biochem* 38, 431-440. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9524-x>.
- Teles M, Pacheco M and Santos MA. 2007. Endocrine and metabolic responses of *Anguilla Anguilla* L. caged in a freshwater-wetland (pateira de fermentelos-Portugal). *Sci Total Environ* 372, 562-570. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.10.033>.
- Toko T, Fiogbe ED, Koukpode B and Kestemont P. 2007. Rearing of African catfish (*Clarias gariepinus*) and vundu catfish (*Heterobranchus longifilis*) in traditional fish ponds (whedos): Effect of stocking density on growth, production and body composition. *Aquaculture* 262, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.054>.
- Tolussi CE, Hilsdorf AW, Caneppele D and Moreira RG. 2010. The effects of stocking density in physiological parameters and growth of the endangered teleost species piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1877). *Aquaculture* 310, 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.007>.
- Trenzado CE, Morales AE and Higuera M. 2006. Physiological effect of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture* 258, 583-593. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.045>.
- Vargas-Chacoff L, Martínez D, Oyarzún R, Nualart D, Olavarría V, Yáñez A, Bertrán C, Ruiz-Jarado I and Mancera JM. 2014. Combined effects of high stocking density and *Piscirickettsia salmonis* treatment on the immune system, metabolism and osmoregulatory responses of the sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus*. *Fish Shellfish Immunol* 40, 424-434. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.024>.
- Yarahmadi P, Miandare HK, Fayaz S and Caipang CMA. 2016. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress-and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 48, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.007>.
- Yarahmadi P, Miandare HK, Hoseinifar SH, Gheysvandi N and Akbarzadeh A. 2014. The effects of stocking density on hemato-immunological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Int* 23, 55-63. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9797-z>.
- Yin Z, Lam TJ and Sin YM. 1995. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol* 5, 519-529. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(95\)80052-2](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(95)80052-2).
- Yoon JM, Park HY, Chang KN and Jun TS. 1995. Optimal stocking density and environmental factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in semi-closed recirculation system. *Korean J Ecol Environ* 28, 183-189.
- Zhou C, Ge X, Lin H and Niu J. 2014. Effect of dietary carbohydrate on non-specific immune response, hepatic antioxidative abilities and disease resistance of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Fish Shellfish Immunol* 41, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.024>.
- Zhou X, Tian Z, Wang Y and Li W. 2010. Effects of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiol Biochem* 36, 501-509. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9320-z>.
- Zhu T, Ai Q, Mai K, Xu W, Zhou H and Liu FZ. 2014. Feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed defatted fish meal diets with graded levels of cholesterol. *Aquaculture* 428-429, 290-296. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.027>.