

# 순환여과양식 시스템 내 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*) 치어에 미치는 질산성 질소의 만성적 영향

서석 · 최태건 · 박정환\*

부경대학교 수산생물학과

## Chronic Effects of Nitrate Nitrogen on Juvenile Blackhead Seabream *Acanthopagrus schlegelii* in a Recirculating Aquaculture System

Seok Seo, Tae Gun Choi and Jeonghwan Park\*

Department of Fisheries Biology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

This study evaluated the chronic effects of NO<sub>3</sub>-N on juvenile blackhead seabream *Acanthopagrus schlegelii*. The experiment used six identically configured recirculating aquaculture systems (435 L), with three tanks (70 L) each. The NO<sub>3</sub>-N concentrations studied were 0 (control), 62.5, 125, 250, 500, and 1,000 mg/L NO<sub>3</sub>-N/L. Thirty juvenile blackhead seabream (18.8±2.2 g) were stocked in each tank. Growth and hematological changes were evaluated after 120 days. At the end of the experiment, the growth, survival, and cortisol levels indicated that blackhead seabream were healthy in 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L. However, insulin-like growth factor I (IGF-1) and the IGF-1 receptor were significantly lower at 250, 500, and 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N/L than in controls (62.5 and 125 mg NO<sub>3</sub>-N/L). Juveniles were likely affected at a much lower NO<sub>3</sub>-N concentration than 250 mg/L NO<sub>3</sub>-N/L in terms of IGF-1 and the IGF-1 receptor. Therefore, for the sake of long-term fish welfare, the NO<sub>3</sub>-N should be maintained at lower than 250 mg/L for blackhead seabream in recirculating aquaculture systems.

Key words: Recirculating aquaculture system (RAS), Blackhead seabream, Nitrate nitrogen, Chronic toxicity

### 서론

전 세계적으로 양식산업은 미래 산업으로서 인식되며 빠르게 성장하고 있으며, 지속가능한 양식 방법에 대한 필요성이 크게 대두되고 있다(Zhang et al., 2011; Liu et al., 2018). 외부환경으로부터 독립적이며 환경친화적 양식이 가능한 폐쇄형 시스템이 주목받고 있으며 산업화가 활발히 진행되고 있다(Zhang et al., 2011; Widiasa et al., 2018). 폐쇄형 시스템 중의 하나인 순환여과양식 시스템은 사용하는 물의 양이 적어 외부로부터 유입되는 병원체의 차단 및 사육수온 유지에 효과적이다. 순환여과양식 시스템은 생물학적 질산화과정을 통해 양식생물에 독성이 강한 암모니아와 아질산성 질소 축적을 방지할 수 있지만, 부산물로 질산성 질소가 시스템 내 고농도로 축적되어 어류의 생산성을 감소시킬 우려가 있다(Schram et al., 2014; Freitag

et al., 2015). 순환여과양식 시스템에서는 일정량을 환수하거나 탈질화 과정을 통해 질산성 질소를 제거할 수 있다(Hamlin, 2006). 환수는 질산성 질소를 제거하기 위한 가장 손쉬운 방법이다. 하지만 물 사용량이 제한된 지역에서는 이용하기 어렵고 주변 수역의 부영양화 원인이 될 수 있다. 탈질화 과정은 혐기적 과정을 통해 질산성 질소를 시스템으로부터 제거하기 때문에 물의 사용을 줄이고 주변 수역의 부영양화를 최소화할 수 있다. 이 방법은 기술적으로 어렵고 비용이 많이 들기 때문에 상업적인 수준의 양식장에 적용하기 위해서는 경제적인 탈질 여과조의 규모를 산정하는 것이 필수적이며(Hamlin, 2006), 따라서 탈질 여과조의 산정을 위해서는 생산 전 단계에 걸쳐 어류에 독성을 나타내지 않는 질산성 질소의 안전 농도를 파악하는 것이 선행되어야 한다. 일반적으로 만성독성 실험은 특정 물질이 대상생물에 장기적인 영향을 미치는지를 평가하기 위해 실시된

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5911 Fax: +82. 51. 629. 5908

E-mail address: parkj@pknu.ac.kr



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.2019.0474>

Korean J Fish Aquat Sci 52(5), 474-481, October 2019

Received 6 August 2019; Revised 20 August 2019; Accepted 29 August 2019

저자 직위: 서석(대학원생), 최태건(대학원생), 박정환(교수)

다. 이때 독성이 나타나지 않는 무영향농도(no observed effect concentration, NOEC) 또는 최소영향농도(lowest observed, effect concentration, LOEC)를 안전농도로 설정한다. 주로 독성 평가는 성장률과 생존율 등 가시적인 요인을 중심으로 이루어지고 있다.

감성돔은 광염성 어종으로 다양한 염분에서 생존과 성장이 가능하며 환경 내성이 강하고 부가가치가 높은 어종으로 순환여과양식 시스템 내 사육 어종으로 잠재성이 높다(Park et al., 2015; Kim et al., 2018). 국내에서는 주요 양식대상어종으로 알려져 있으며, 최근에는 인공종묘생산 및 생산성 향상을 위한 기술개발, 수요증가 등으로 인해 그 생산량이 해마다 증가하고 있다.

본 연구에서는 순환여과양식 시스템 내에서 감성돔 치어에 대한 생산성 저하를 방지하고 질산성 질소의 시스템 내 안정농도를 구명하기 위해 농도별 노출 실험을 실시하였다. 성장과 생존율 등의 가시적 지표와 더불어 질산성 질소의 스트레스 관련인자, 산소전달 혈액인자, 성장관련 인자 등에 대한 영향을 조사하고 잠재적 영향 정도를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어 및 실험조건

경남수산자원연구소(경상남도 통영)에서 분양 받은 감성돔 치어를 부경대학교 양식시스템 연구실로 이송하여 실험 시작 전 1주일 동안 별도의 순환여과양식 시스템에서 순치하였다. 실험전 3일동안 절식한 후 실험시스템으로 옮겨 수용하였다. 실험어의 크기는 평균 전장  $10.4 \pm 0.4$  cm, 체중  $18.8 \pm 2.2$  g이었다.

동일한 구조로 독립적으로 운전되는 6개의 순환여과양식 시스템을 설치하였으며, 각 실험 시스템은 3개의 유리 사각수조(0.34 m×0.6 m×0.4 m, 70 L), 유동상여과조(0.56 m×0.48 m×0.5 m, 160 L), 저수조(0.44 m×0.48 m×0.5 m, 130 L), 포말분리기, 순환펌프, UV살균기로 구성하였다. 각 수조당 감성돔은 30마리씩 수용하였으며, 사육 수온은 각각의 시스템에 200 W 히터(PERIHA, HengLan, China) 3개를 이용하여 25°C로 유지 하였다.

질산성 질소의 실험 농도는 질산나트륨( $\text{NaNO}_3$ )를 이용하여 각 시스템 별로 0 (대조구), 62.5, 125, 250, 500, 1,000 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ 가 되도록 조절하였다. 사료 공급과 생물학적 여과조 내 질산화 과정으로 자연적으로 발생하는 질산성 질소의 농도를 제어하기 위해 일간 2회 각 시스템 내 질산성 질소 농도를 측정하였다. 환수와 질산나트륨을 추가 투여하는 방식으로 시스템 내 질산성 질소 농도가 목표치에 근접하고 일정하게 유지되도록 하였다. 상업사료(Deluxe N4, Woosung feed, Daejeon, Korea; 조단백질 함량, 42%)를 일간 2회(10:00, 19:00) 반복 공급하면서 120일간 실험을 실시하였다. 광주기는 12(암):12(명)으로 하였으며, pH는 중탄산염( $\text{NaHCO}_3$ )을 투여하여 유지하였다.

### 수질 및 성장 측정

수온, pH, 용존산소는 multi parameter meter (HQ 40d, HACH CO, Loveland, Colorado, USA)를 이용하여 일간 2회 측정하였다. 염도는 YSI meter (Pro2030 electronic probe, YSI, Yellow Springs, Ohio, USA)를 이용하여 측정하였다. 총 암모니아성 질소와 아질산성 질소는 각각 indo-phenol 발색법과 diazotization 발색법을 이용하여(APHA, 2005) 분광광도계(UV-3300, Humas, Dajeon, Korea)로 주 2회 측정하였다. 질산성 질소는 분광광도계(DR 2800, HACH CO, Loveland Colorado, USA)을 이용하여 cadmium 환원 발색법(Method 8039)으로 측정하였다.

실험 60일과 120일에 총 어체중, 일간 사료섭취율, 사료계수, 일간 성장률, 생존율을 계산하였다. 실험 종료 후 모든 실험어를 대상으로 중량 및 전장을 측정하여 비만도를 계산하였다. 측정된 개체별 중량과 전장을 대상으로 분산계수(coefficient of variation, CV)와 중심값 균질도(uniformity index,  $UI_{10}$ )을 계산하였다. 중심값 균질도는 Bell (2002)에 기술된 수식을 이용하여 계산하였다.

### 혈액 분석

질산성 질소에 만성적으로 노출된 실험어의 혈액학적 변화를 조사하기 위해 각 실험구 당 30마리(수조당 10마리)의 어류를 무작위로 선택하여 0.4 mL/L 2-phenoxyethanol (Tsantilas et al., 2006)로 마취한 후 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액의 일부는 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) tube에 보관하여 hemoglobin과 met-hemoglobin 측정을 위해 사용되었다. 원심 분리(4°C, 3,000 rpm, 15 min)를 통해 분리된 혈장은 cortisol, Insulin like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 receptor 측정에 이용되었다. Total hemoglobin과 met-hemoglobin은 cyanmet-hemoglobin방법으로 측정하였다(Cruz-Landeira et al., 2002). Cortisol과 IGF-1는 각각 CSB-E0848E 및 E12122Fh ELISA kit (Cusabio LLC, Houston, USA)를 이용하여 측정하였다. IGF-1 receptor는 E160043 ELISA kit (Qayee Bio-Technology, Shanghai, China)로 측정하였다.

### 통계처리

통계처리는 SPSS 25.0 통계프로그램(IBM SPSS Statistics, USA)을 이용하였다. One way ANOVA test를 이용하여 유의성 분석을 실시하였으며, 등분산성이 확보되었을 경우 Tukey's HSD test를 이용하였고, 등분산성이 확보되지 않았을 경우 games-howell test를 실시하여 유의성 검정( $P < 0.05$ )을 하였다.

## 결 과

만성독성 실험기간에 대한 수질분석 결과를 Table 1에 나타내었다. 모든 실험구에서 용존산소, pH, 수온은 각각 7.32-7.36

mg/L, 7.61-7.66, 25.1-25.2°C의 범위로 나타났으며 실험구간에 유의한 차이를 나타내지 않았다( $P>0.05$ ). 암모니아성 질소와 아질산성 질소 농도는 각각 평균 0.18 mg TAN/L와 1.55 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  이하로 유지되었다. 질산성 질소는 실험 목표 농도와 유사한 수준으로 유지되었다.

### 어류성장

실험 60일(중간측정)째 어류 성장 결과를 Table 2에 나타내었다. 최종 어체중과 일간 성장률은 0, 62.5, 125, 250 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  실험구에서 유의한 차이가 없었으나, 500 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  이

상의 실험구에서 유의하게 낮았다( $P<0.05$ ). 일간 사료섭취율은 62.5, 125, 250, 500 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  실험구에서 대조구와 유의하게 차이가 없었으나, 1,000 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ 의 실험구에서는 유의하게 낮았다( $P<0.05$ ). 사료계수는 250 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  농도 이하의 실험구에서는 대조구와 유의한 차이가 없었으나 500 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  농도 이상의 실험구에서 유의하게 높았다( $P<0.05$ ).

실험 120일(최종측정)째 어류성장 결과를 Table 3에 나타내었다. 일간 사료섭취율은 대조구와 전 실험구 사이에 유의한 차이가 없었다( $P<0.05$ ). 그러나 최종 어체중은 500 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  농도 이상부터 대조구에 비해 작았으며 사료효율과 일간

Table 1. Water quality changes in the experimental recirculating aquaculture systems with different nitrate nitrogen concentrations to evaluate the chronic effect on blackhead seabream *Acanthopagrus schlegelii* juveniles

Target $\text{NO}_3\text{-N}$ (mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ )	Actual $\text{NO}_3\text{-N}$ (mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ )	TAN (mg TAN-N/L)	$\text{NO}_2\text{-N}$ (mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ )	DO (mg/L)	pH	Salinity (psu)	Temperature (°C)
0	29.3±4.6 <sup>a</sup>	0.18±0.04 <sup>a</sup>	1.29±0.57	7.34±0.10	7.66±0.11	31.1±0.4 <sup>a</sup>	25.1±0.2
62.5	63.0±1.0 <sup>b</sup>	0.16±0.07 <sup>a</sup>	1.38±0.67	7.32±0.09	7.61±0.10	31.5±0.5 <sup>b</sup>	25.2±0.2
125	125.3±2.2 <sup>c</sup>	0.15±0.06 <sup>a</sup>	1.35±0.43	7.33±0.08	7.62±0.11	32.1±0.5 <sup>c</sup>	25.2±0.2
250	252.7±4.5 <sup>d</sup>	0.15±0.04 <sup>a</sup>	1.36±0.61	7.35±0.10	7.61±0.08	32.4±0.7 <sup>d</sup>	25.2±0.2
500	503.4±10.0 <sup>e</sup>	0.16±0.07 <sup>a</sup>	1.52±0.58	7.34±0.08	7.62±0.10	32.9±0.7 <sup>e</sup>	25.2±0.2
1,000	1,010.0±16.8 <sup>f</sup>	0.09±0.04 <sup>b</sup>	1.55±0.57	7.36±0.09	7.64±0.10	33.9±0.9 <sup>f</sup>	25.1±0.2
P	0.000	0.000	0.469	0.598	0.087	0.000	0.308

Values (mean±SD) with different superscripts in same columns are significantly different ( $P<0.05$ , n=240 for  $\text{NO}_3\text{-N}$ , 25 for TAN and  $\text{NO}_2\text{-N}$ , and 120 for DO, pH, salinity, and temperature).

Table 2. Growth performance of blackhead seabream *Acanthopagrus schlegelii* juveniles with different nitrate nitrogen concentrations after 60 days in recirculating aquaculture systems

Parameters	Target $\text{NO}_3\text{-N}$ concentrations (mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ )					
	0	62.5	125	250	500	1,000
Initial biomass (g)	573±5 <sup>a</sup>	564±16 <sup>a</sup>	553±8 <sup>a</sup>	569±16 <sup>a</sup>	566±11 <sup>a</sup>	570±14 <sup>a</sup>
Final total biomass (g)	1,891±56 <sup>a</sup>	2,000±105 <sup>a</sup>	2,020±164 <sup>a</sup>	2,045±106 <sup>a</sup>	1,359±42 <sup>b</sup>	900±20 <sup>c</sup>
Feed intake (%/d)	2.55±0.02 <sup>ab</sup>	2.55±0.17 <sup>ab</sup>	2.44±0.04 <sup>b</sup>	2.49±0.15 <sup>ab</sup>	2.96±0.09 <sup>a</sup>	1.56±0.38 <sup>c</sup>
Feed conversion	1.25±0.04 <sup>c</sup>	1.19±0.12 <sup>c</sup>	1.12±0.06 <sup>c</sup>	1.15±0.09 <sup>c</sup>	2.00±0.12 <sup>b</sup>	3.37±0.05 <sup>a</sup>
Specific growth rate (%/d)	2.04±0.07 <sup>a</sup>	2.14±0.07 <sup>a</sup>	2.19±0.12 <sup>a</sup>	2.16±0.04 <sup>a</sup>	1.48±0.07 <sup>b</sup>	0.46±0.11 <sup>c</sup>

Values (mean±SD) with different superscripts in same columns are significantly different ( $P<0.05$ , n=3).

Table 3. Growth performance of blackhead seabream *Acanthopagrus schlegelii* juveniles with different nitrate nitrogen concentrations after 120 days in recirculating aquaculture systems

Parameters	Target $\text{NO}_3\text{-N}$ concentrations (mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ )					
	0	62.5	125	250	500	1,000
Initial biomass (g)	573±5	564±16	553±8	569±16	566±11	570±14
Final total biomass (g)	3,642±57 <sup>a</sup>	3,461±65 <sup>ab</sup>	3,509±154 <sup>ab</sup>	3,647±39 <sup>a</sup>	3,384±32 <sup>b</sup>	2,171±192 <sup>c</sup>
Feed intake (%/d)	2.07±0.01	2.14±0.10	2.10±0.04	2.11±0.02	2.09±0.08	2.17±0.11
Feed conversion	1.32±0.02 <sup>a</sup>	1.38±0.04 <sup>a</sup>	1.35±0.03 <sup>a</sup>	1.34±0.02 <sup>a</sup>	1.38±0.03 <sup>a</sup>	1.58±0.13 <sup>b</sup>
Specific growth rate (%/d)	1.57±0.02 <sup>a</sup>	1.55±0.02 <sup>a</sup>	1.56±0.03 <sup>a</sup>	1.57±0.04 <sup>a</sup>	1.51±0.02 <sup>a</sup>	1.37±0.05 <sup>b</sup>

Values (mean±SD) with different superscripts in same columns are significantly different ( $P<0.05$ , n=3).

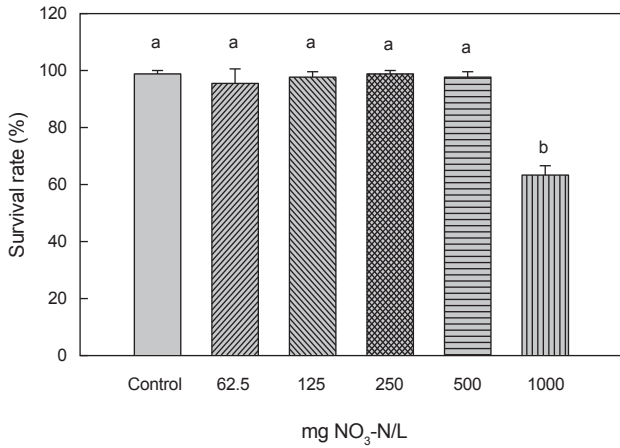


Fig. 1. Survival rate (mean±SD) of blackhead seabream *Acanthopagrus schlegelii* juveniles with different nitrate nitrogen concentrations after 120 days in recirculating aquaculture system (P<0.05, n=3).

성장률은 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N/L에서 대조구에 비해 낮았다(P<0.05). 실험 종료 시 생존율은 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N/L 실험구에서 63.3±3.3%로 가장 낮았고, 이를 제외한 모든 실험구에서는 95.6-98.9%의 범위였다(P<0.05, Fig. 1).

사료계수=사료섭취량/증중량

일간 성장률(%/day)=[(ln최종어체중-ln최초어체중)/사육일수]×100

일간 사료섭취율(%/day)=일간성장률×사료계수

비만도=(100×개체 어체중)/전장<sup>3</sup>

분산계수(CV, %)=(표준편차/평균)×100

중심값 균질도(U<sub>10</sub>, %)=(평균 체중 또는 전장의 90%와 10%에 포함되는 개체수/총 개체수)×100

실험 120일(최종측정)째 어류의 비만도, 최종 개체 어체중과 전장에 대한 분산계수 및 중심값 균질도를 Table 4에 나타내었다. 최종 개체 어체중과 전장의 분산계수는 62.5, 125, 250, 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L 실험구는 대조구와 유의하게 차이가 없었으나, 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N/L 실험구는 대조구보다 낮았다(P<0.05). 최종 개체 어체중의 중심값 균질도는 질산성 질소의 농도가 높아지면서 대체적으로 감소하는 추세였으나, 전 실험구가 대조구와 유의하게 차이가 없었다(P>0.05). 그러나 전장의 경우, 분산계수와 유사하게 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N/L에서 중심값 균질도가 대조구보다 낮았다(P<0.05). 비만도의 경우 62.5, 125, 250 mg NO<sub>3</sub>-N/L 실험구는 대조구와 비교하여 유의하게 차이가 없었으나, 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L 이상 실험구에서 유의하게 높았다(P<0.05). 120일째 최종 측정 결과를 토대로 볼 때, 감성돔 치어의 성장, 생존, 개체 어류의 체중 및 전장 균질도에 영향을 미치지 않는 무영향농도는 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L이었다.

실험 60일 측정과 120일 측정 후 대조구 대비 최종 어체중, 사료계수, 일간 성장률의 변화율을 Table 5에 나타내었다. 실험 60일째에는 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L 농도 이상 실험구의 최종 어체중, 사료계수, 일간 성장률이 대조구에 비해 큰 폭으로 감소하거나 나빠지는 경향이였다. 그러나 시간이 경과하면서 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L 이상 농도구에서는 영향을 정도가 다소 감소하고 250 mg NO<sub>3</sub>-N/L 이하 농도구에서는 증가하는 경향이였다. 시간경과에 따른 사육밀도의 변화를 Table 6에 나타내었다. 최초 사육수 용적당 어체 수용밀도가 약 8 kg이었다. 60일이 경과한 시점에 62.5-250 mg NO<sub>3</sub>-N/L 농도 실험구의 사육밀도는 27.0-29.2 kg까지 대조구와 유사하게 증가하였으나, 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L 농도 실험구 이상에서는 현저하게 감소하였다. 실험 종료 시점에서는 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L 이하 실험구에서는 48.3-52.1 kg으로 대

Table 4. Size variability of blackhead seabream *Acanthopagrus schlegelii* juveniles with different nitrate nitrogen concentrations after 120 days in recirculating aquaculture systems

Parameters	Target NO <sub>3</sub> -N concentrations (mg NO <sub>3</sub> -N/L)						P value
	0	62.5	125	250	500	1,000	
Final individual weight (g)	122±21 <sup>a</sup>	118±20 <sup>a</sup>	118±23 <sup>a</sup>	122±22 <sup>a</sup>	114±22 <sup>a</sup>	98±25 <sup>b</sup>	0.000
Final individual length (cm)	19.1±1.0 <sup>a</sup>	18.8±1.0 <sup>a</sup>	18.9±1.1 <sup>a</sup>	18.8±1.2 <sup>a</sup>	18.1±1.1 <sup>b</sup>	16.7±1.4 <sup>c</sup>	0.000
Condition factor	1.73±0.14 <sup>c</sup>	1.76±0.18 <sup>bc</sup>	1.73±0.13 <sup>c</sup>	1.82±0.17 <sup>bc</sup>	1.89±0.17 <sup>b</sup>	2.03±0.27 <sup>a</sup>	0.000
CV-body weight (%)	17.0±1.8 <sup>b</sup>	16.8±0.7 <sup>b</sup>	19.8±0.8 <sup>ab</sup>	18.3±2.4 <sup>b</sup>	19.6±0.4 <sup>ab</sup>	25.2±5.0 <sup>a</sup>	0.013
CV-total length (%)	5.32±0.14 <sup>b</sup>	5.68±0.40 <sup>b</sup>	5.87±0.57 <sup>b</sup>	6.43±0.33 <sup>b</sup>	6.44±1.00 <sup>b</sup>	8.58±0.48 <sup>a</sup>	0.000
CV-condition factor (%)	8.19±0.68	10.36±1.73	8.03±1.73	9.74±1.21	9.40±1.67	13.29±4.51	0.133
U10-body weight (%)	47.2±6.8	46.3±6.4	45.4±6.5	41.6±7.2	51.1±9.4	31.8±11.8	0.159
U10-total length (%)	92.1±1.8 <sup>a</sup>	94.2±3.7 <sup>a</sup>	90.9±6.8 <sup>ab</sup>	86.5±3.3 <sup>ab</sup>	88.7±8.3 <sup>ab</sup>	77.3±5.2 <sup>b</sup>	0.027
U10-condition factor (%)	79.8±5.6	81.0±9.2	86.4±8.8	76.3±3.8	72.7±10.3	68.6±7.9	0.169

Values (mean±SD) with different superscripts in same columns are significantly different (P<0.05, n=total survived individuals).



조구와 유사한 밀도까지 증가한 반면, 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N/L 실험구는 대조구에 비해 40% 이상 생산성이 감소하였다.

### 혈액학적 성상

실험 종료시 hemoglobin, met-hemoglobin, cortisol, IGF-1, IGF-1 receptor의 결과를 Table 7에 나타내었다. Hemoglobin와 met-hemoglobin 농도는 질산성 질소의 농도의 증가와 상관없이 전 실험구가 대조구 비교하여 유의하게 차이가 없었다(P>0.05). Cortisol 농도는 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N/L 실험구에서 8.60±5.64 ng/mL로 대조구 및 다른 실험구보다 유의하게 높았다(P<0.05). IGF-1과 IGF-1 receptor 농도는 250 mg NO<sub>3</sub>-N/L 이상 실험구에서 대조구와 다른 실험구에 비해 유의하게 낮았다(P<0.05). 질산성 질소에 노출된 감성돔 치어의 혈액학적 성상 변화를 볼 때, cortisol에 영향을 미치지 않는 무영향농도는 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L이었으며, IGF-1과 IGF-1 receptor에 영향을 미치지 않는 무영향농도는 이보다 낮은 125 mg NO<sub>3</sub>-N/L이었다.

### 고 찰

실험기간 동안 암모니아성 질소와 아질산성 질소는 대조구와 모든 실험구에서 평균 0.18 mg TAN/L와 1.55 mg NO<sub>2</sub>-N/L 이하로 유지되었다. 암모니아성 질소는 gilthead seabream (*Spa-*

*rus aurata*)에서 보고된 무영향농도의 2.76% 수준이며(Ruyet et al., 1995) 아질산성 질소는 black seabass *Centropristis striata*와 southern flounder *Paralichthys lethostigma*에서 보고된 무영향 농도의 9.1-15.5% 수준(Weirich and Riche, 2006; Park et al., 2013)이었다. 이러한 농도 수준에서는 암모니아성 질소와 아질산성 질소가 실험결과에 영향을 주지 않았을 것으로 판단된다. 질산성 질소의 실험 농도를 조절하기 위해 투여한 질소원으로 인해 질산성 질소의 농도가 증가하면서 염분이 증가하였다. 그러나 본 실험에 나타난 염분의 범위는 일반적인 해수 염분 범위였으며 상대적으로 생물독성이 낮아 독성 실험에 주로 이용되는 질소원인 NaNO<sub>3</sub>를 이용하였다(Hamlin, 2006; Kuhn et al., 2010; van Bussel et al., 2012). 이외에 수질 요인들은 안정적으로 유지되었으며 대조구와 실험구간에 차이가 없었다.

질산성 질소는 암모니아성 및 아질산성 질소에 비해 양식생물에 비교적 독성이 낮은 것으로 알려져 있으나 일정 농도 이상에서 성장과 생존에 부정적인 영향을 나타내며 어종과 노출기간에 따라 영향의 정도가 다르다. Channel catfish *Ictalurus punctatus*와 largemouth bass *Micropterus salmoides*는 96 mg NO<sub>3</sub>-N/L의 질산성 질소에 164일간 노출되는 동안 성장과 먹이 활동에 부정적인 영향이 없었다(Knepp and Arkin, 1973). Turbot *Psetta maxima*은 42일 동안 125-250 mg NO<sub>3</sub>-N/L의 농도에서 성장, 생존, 사료효율에 부정적인 영향이 없었다(van Bussel et al., 2012). Kuhn et al. (2010)과 Schram et al. (2014)은 각각 african catfish *Clarias gariepinus*와 pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*를 대상으로 42일 동안 독성실험을 수행하였다. 이 실험에서 african catfish *Clarias gariepinus*는 601 mg NO<sub>3</sub>-N/L보다 낮은 농도에서 사료공급량과 성장에 부정적인 영향이 없었으며, pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*는 220 mg NO<sub>3</sub>-N/L보다 낮은 농도에서 생존과 성장에 부정적인 영향이 없었다. 실시한 본 실험에서는 성장, 생존률, 사료섭취 측면에서 실험 종료시 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L보다 낮은 농도에서 부정적인 영향이 없었다.

본 실험에서 500과 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N/L 실험구의 성장관련 요인에 따른 변화율은 중간측정까지 대조구에 비해 상대적으로 낮았다. 하지만 실험 종료시 500 mg NO<sub>3</sub>-N/L 실험구는 대조구 수준까지 회복되었으며, 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N/L 실험구는 여전히

Table 5. Stocking density changes of blackhead seabream *Acanthopagrus schlegelii* juveniles with different nitrate nitrogen concentrations after 60 and 120 days in recirculating aquaculture systems

Target NO <sub>3</sub> -N (mg NO <sub>3</sub> -N/L)	Stocking density (kg/m <sup>3</sup> )		
	Initial	60 days	120 days
0	8.2	27.0	52.0
62.5	8.1	28.6	49.4
125	7.9	28.8	50.1
250	8.1	29.2	52.1
500	8.1	19.4	48.3
100	8.1	12.8	31.0

Table 6. Hematological changes of blackhead seabream *Acanthopagrus schlegelii* juveniles with different nitrate nitrogen concentrations after 120 days in recirculating aquaculture systems

Parameters	0	62.5	125	250	500	1,000	P value
Hemoglobin (g/dL)	12.28±1.65	12.12±1.77	12.70±2.00	12.30±1.97	12.58±1.84	11.42±1.98	0.126
Met-hemoglobin (%)	0.37±0.16	0.39±0.13	0.45±0.13	0.42±0.15	0.40±0.13	0.37±0.14	0.281
Cortisol (ng/mL)	2.27±1.58 <sup>a</sup>	4.29±2.15 <sup>b</sup>	3.74±2.70 <sup>ab</sup>	2.98±2.49 <sup>ab</sup>	3.89±5.16 <sup>ab</sup>	8.60±5.64 <sup>c</sup>	0.000
IGF-1 (pg/mL)	212.04±52.97 <sup>a</sup>	207.65±43.10 <sup>a</sup>	180.98±53.26 <sup>ab</sup>	163.41±44.24 <sup>b</sup>	137.63±40.05 <sup>bc</sup>	120.22±31.23 <sup>c</sup>	0.000
IGF-1 receptor (ng/mL)	40.94±3.06 <sup>a</sup>	40.51±6.44 <sup>a</sup>	38.52±6.22 <sup>ab</sup>	35.66±3.77 <sup>b</sup>	35.19±5.72 <sup>b</sup>	35.02±2.92 <sup>b</sup>	0.000

Values (mean±SD) with the same superscript within the same row are significantly different at P<0.05, n=30.

낮았지만 중간측정에 비해 감소폭이 크게 줄었다. 일정 시간이 지나면서 감성돔이 높은 질산성 질소에 적응하는 것으로 보인다. 그러나 250 mg NO<sub>3</sub>-N/L 농도 이하에서는 초기에는 영향을 받지 않았으나 시간이 경과하면서 성장 요인들의 저하가 관찰되었다. 따라서 120일간의 실험에서는 가시적인 지표 측면에서는 영향이 나타나지 않았지만 장기적인 측면에서는 시간이 경과하면서 낮은 농도에서도 질산성 질소가 생산성에 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단된다.

수질환경 및 사육 밀도 등 관리 요인들은 어체의 성장 및 생존 뿐만 아니라 어체의 개체간의 차이를 유발할 수 있다(Park et al., 2015; Park et al., 2017). 본 실험에서는 대체적으로 질산성 질소의 농도가 증가하면서 어류 개체간에 개체 중량과 전장의 차이가 더 커지는 경향이였다. 특히 체중 증가에 비해 길이 성장이 스트레스 요인인 질산성 질소의 영향을 더 많이 받는 것으로 보인다. Largemouth bass를 대상으로 사육 밀도의 영향을 조사한 연구의 경우 사육밀도 등 환경 요인이 개체 체중 및 전장의 분산에 영향을 준다고 보고한 바 있다(Park et al., 2015; Park et al., 2017). 이 연구에서는 개체간의 체중과 전장의 분산 뿐만 아니라, 평균값을 중심으로 체중과 전장이 수렴하는 중심값 균질도 역시 밀도가 증가하면서 낮아지고 개체간의 차이가 커진다고 하였다. 이와 동시에 적정 사육밀도 미만에서도 분산계수가 증가하고 중심값 균질도가 감소한다고 하였다. 사육밀도는 사료섭취량, 성장, 생존에 부정적인 영향을 미친다고 알려져 있다(Marco et al., 2008; Sammouth et al., 2009). 본 실험에서 질산성 질소의 농도가 가장 높았던 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N/L 실험구의 경우, 성장 저하와 폐사개체의 증가로 사육밀도가 가장 낮게 유지되었다. 이러한 낮은 사육밀도가 개체간 체중과 전장의 차이가 발생하는데 영향을 주거나 수질환경과 교호작용을 나타내었을 수도 있다. 감성돔의 적정 사육밀도에 대한 활용 가능한 자료가 부족하기 때문에 이 실험에서 사육밀도가 어류의 체중과 전장의 분산에 미친 영향의 정도를 명확히 확인하기 어렵다. 양식 산업에서 한정된 사육공간에서 단위면적당 생산량을 높이는 것은 경영적인 측면에서 매우 중요하므로 감성돔 고밀도 사육을 위한 적정 사육밀도에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

질산성 질소의 독성은 산소운반 단백질인 hemoglobin을 met-hemoglobin으로 전환시킴으로써 산소운반 능력을 저하시킨다고 알려진다(Camargo et al., 2005). 이러한 결과는 crayfish *Astacus astacus* (Stormer et al., 1996), fathead minnows *Pimephales promelas* (Scott and Crunkilton, 2000), kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicas* (Cheng and Chen, 2002) 등에서도 보고되었다. 이와 반대로 rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Stormer et al., 1996)과 african catfish *Clarias gariepinus* (Schram et al., 2014)를 대상으로 한 실험에서는 hemoglobin과 met-hemoglobin 농도에서 차이가 없었다. 본 실험에서는 모든 실험구에서 hemoglobin과 met-hemoglobin의 차이가 없어 rainbow trout와 african catfish의 결과와 유사하였다.

본 실험에서 가장 고농도인 1,000 mg NO<sub>3</sub>-N에서 다른 실험구에 비해 cortisol 수치가 가장 높았다. 반면, african catfish *Clarias gariepinus*를 24, 90, 261, 600, 1,676 mg NO<sub>3</sub>-N 농도에 노출시킨 실험에서는 42일 동안 cortisol 수치가 변하지 않았다(Schram et al., 2014). 30일 동안 siberian sturgeon *Acipenser baeri*를 11.5, 57 mg NO<sub>3</sub>-N에 노출시킨 실험에서도 cortisol 수치가 변화하지 않았다(Hamlin et al., 2008). Cortisol 농도는 어종, 크기, 수온, 영양상태, 시간 등 많은 환경적 요인과 발달 단계 그리고 측정 방법에 따라 달라질 수 있다(Barton and Iwama, 1991).

IGF-1은 단백질 합성, 골격의 형성, 세포 증식 및 분화를 조절하는데 중요한 역할을 한다(Jones and Clemmons, 1995). IGF-1은 IGF-1 receptor와 매개하여 표적세포에 작용하기 때문에, 성장에 있어 IGF-1 receptor의 역할도 매우 중요하다(Duan et al., 2010). 본 실험에서 IGF-1과 IGF-1 receptor가 250 mg NO<sub>3</sub>-N/L이상의 실험구에서 감소하였다. 수생동물의 질산성 질소 노출에 따른 IGF-1, IGF-1 receptor의 변화를 나타낸 연구가 부족하다. 쥐를 대상으로 6주 동안 KNO<sub>3</sub> 3%가 포함된 먹이를 섭취한 쥐의 성장실험의 경우 질산성 질소의 증가로 인해 IGF-1의 농도가 감소한 결과를 보고한 바 있다(Jahreis et al., 1991). 일반적으로 cortisol은 스트레스 호르몬으로 알려져 있으며, 또한 에너지 및 물-이온 대사에 관여하며(Vijayan et al., 1993; Reid et al., 1998), IGF-1, IGF-BPs 등이 급성 및 만성독성 스트레스가 성장에 미치는 직접적인 지표로 이용될 수 있다고 하였다(Picha et al., 2008). Channel catfish의 경우, 스트레스 호르몬인 cortisol을 사료에 첨가하여 4주간 공급한 결과 대조구에 비해 성장과 사료 섭취율이 각각 50%와 30% 감소하고 혈액 내 IGF-1의 농도를 감소시켰다고 하였다(Peterson and Small, 2005; Small et al., 2006). 또한 선별 및 높은 사육 밀도 등 스트레스 요인이 southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*, silver perch *Bidyanus bidyanus*, black bream *Acanthopagrus butcherii*의 혈액 내 IGF-1의 농도를 감소시킨다고 하였다(Dyer et al., 2004) 본 연구에서도 높은 질산성 질소에 의해 증가한 스트레스가 IGF-1 농도 감소와 최종적으로 성장 저해 요인으로 작용한 것으로 판단된다.

본 실험 결과에서 가시적인 성장관련 지표(최종 어체중, 사료 계수, 일간 성장률, 개체중 및 전장에 있어서 개체 차이) 측면에서 250-500 mg NO<sub>3</sub>-N/L의 농도 수준까지 감성돔 치어가 영향을 받지 않는 것으로 나타났으나 시간이 경과하면서 낮은 농도에서도 생산성 저하의 징후가 관찰되었다. 실험기간(120일) 동안 낮은 농도에서 가시적인 성장 지표의 직접적인 저하가 발생하지는 않았지만 성장과 연관된 IGF-1과 IGF-1 receptor 농도가 감소하였다. 따라서, 장기적인 관점에서 감성돔을 순환여과양식 시스템에서 사육하기 위해서 250 mg NO<sub>3</sub>-N/L 미만의 질산성 질소 농도를 유지하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

## 사 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2017년)에 의해 연구되었음.

## References

- APHA (American Public Health Association), 2005. Standard methods for examinations of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington DC, U.S.A.
- Bell DD. 2002. Cage management for layers. In: Commercial chicken meat and egg production. Bell, DD and William Jr WD. eds. Springer, New York, NY, U.S.A., 979-1007.
- Barton BA and Iwama GK. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu Rev Fish Dis* 1, 3-26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G).
- Camargo JA, Alonso A and Salamanca A 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58, 1255-1267. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.044>.
- Cheng SY and Chen JC. 2002. Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicol* 61, 181-193. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00053-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00053-X).
- Cruz-Landeira A, Bal MJ, Quintela O and Lopez-Rivadulla M. 2002. Determination of methemoglobin and total hemoglobin in toxicological studies by derivative spectrophotometry. *J Anal Toxicol* 26, 67-72.
- Dyer AR, Upton Z, Stone D, Thomas PM, Soole KL, Higgs N, Quinn K and Carragher JF. 2004. Development and validation of a radioimmunoassay for fish insulin-like growth factor I (IGF-I) and the effect of aquaculture related stressors on circulating IGF-I levels. *Gen Comp Endocrinol* 135, 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2003.10.002>.
- Duan C, Ren H and Gao S. 2010. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 167, 344-351. <https://doi.org/10.1016/j.ygcn.2010.04.009>.
- Freitag AR, Thayer LR, Leonetti C, Stapleton HM and Hamlin HJ. 2015. Effects of elevated nitrate on endocrine function in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 436, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.041>.
- Hamlin HJ. 2006. Nitrate toxicity in Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Aquaculture* 253, 688-693. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.08.025>.
- Hamlin, HJ, Moore BC, Edwards TM, Larkin ILV, Boggs A, High WJ, Main KL and Guillette Jr LJ. 2008. Nitrate induced elevations in circulating sex steroid concentrations in female Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) in commercial aquaculture. *Aquaculture* 281, 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.030>.
- Jahreis G, Hesse V, Rohde W, Prange H and Zwacka G. 1991. Nitrate induced hypothyroidism is associated with a reduced concentrations of growth hormone releasing factor in hypothalamic tissue of rats. *Exp Clin Endocrinol* 97, 109-112. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211049>.
- Jones JI and Clemmons DR. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16, 3-34. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-1-3>.
- Kim PK, Kim JW and Park J. 2018. Hematological and histological changes of black porgy *Acanthopagrus schlegelii* in ozonated recirculating systems. *Fish Aquat Sci* 21:2, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41240-017-0079-3>.
- Knepp GL and Arkin GF. 1973. Ammonia toxicity levels and nitrate tolerance of channel catfish. *Progressive Fish Cult* 35, 221-224. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1973\)35\[221:ATLANT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1973)35[221:ATLANT]2.0.CO;2).
- Kuhn DD, Smith SA, Boardman GD, Angier MW, Marsh L and Flick Jr GJ. 2010. Chronic toxicity of nitrate to Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Impacts on survival, growth, antennae length, and pathology. *Aquaculture* 309, 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.014>.
- Liu D, Straus DL, Pedersen LF and Meinelt T. 2018. Periodic bacterial control with peracetic acid in a recirculating aquaculture system and its long-term beneficial effect on fish health. *Aquaculture* 485, 154-159. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.050>.
- Marco PD, Priori A, Finoia MG, Massari A, Mandich A and Marino G. 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture* 275, 319-328. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.012>.
- Park J, Daniels HV and Cho SH. 2013. Nitrite toxicity and methemoglobin changes in southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, in brackish water. *J World Aquacult Soc* 44, 726-734. <https://doi.org/10.1111/jwas.12064>.
- Park J, Kim PK, Park S and Daniels HV. 2015. Effects of two different ozone doses on total residual oxidants, nitrogen compounds and nitrification rate in seawater recirculating systems for black seabream *Acanthopagrus schlegelii* (Bleeker). *Aquatult Eng* 67, 1-7.
- Park J, Renukdas N, Luna T and Roy L. 2015. The effects of biomass density on size variability and growth performance of Juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*, in a semi-closed recirculating system. *J World Aquacult Soc* 46, 283-291.
- Park J, Renukdas N, Luna T and Roy L. 2017. Maximum yield approximation and size distribution patterns of stocker size largemouth bass, *Micropterus salmoides* reared in a semi-closed indoor system. *Aquacult Res* 45, 780-791.



- Peterson BC and Small BC. 2005. Effects of exogenous cortisol on the GH/IGF-I/IGFBP network in channel catfish. *Domest Anim Endocrinol* 28, 391-404. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.01.003>.
- Picha ME, Turano MJ, Beckman BR and Borski RJ. 2008. Endocrine biomarkers of growth and applications to aquaculture: A minireview of growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-1, and IGF-binding proteins as potential growth indicators in fish. *N Am J Aquacult* 70, 196-211.
- Reid SG, Berneir NJ and Perry SF. 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp Biochem Physiol* 120, 1-27. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)00037-1).
- Ruyet JPL, Chartois H and Quemener L. 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture* 136, 181-194. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01026-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01026-2).
- Sammouth S, Orbcastel ER, Gasset E, Lemarie G, Breuil G, Marino G, Coeurdacier JL, Fivelstad S and Blancheton JP. 2009. The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacult Eng* 40, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2008.11.004>.
- Schram E, Roques J AC, Abbink W, Yokohama Y, Spanings T, Vries PD, Bierman S, Vis HVD and Flik G. 2014. The impact of elevated water nitrate concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquacult Res* 45, 1499-1511. <https://doi.org/10.1111/are.12098>.
- Scott G and Crunkilton RL. 2000. Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *ceriodaphnia dubia*, and *daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 19, 2918-2922. <https://doi.org/10.1002/etc.5620191211>.
- Small BC, Murdock CA, Waldbieser GC and Peterson BC. 2006. Reduction in channel catfish hepatic growth hormone receptor expression in response to food deprivation and exogenous cortisol. *Domest Anim Endocrinol* 31, 340-356. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.12.003>.
- Stormer J, Jensen FB and Rankin JC. 1996. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): effects on ionic balance. *Can J Fish Aquat Sci* 53, 1943-1950.
- Tsantilas H, Galatos AD, Athanassopoulou F, Prassinou NN and Kousoulaki K. 2006. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus L.*, and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo C.* *Aquaculture* 253, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.034>.
- van Bussel CGJ, Schroeder JP, Wuertz S and Schulz C. 2012. The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 326-329, 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.019>.
- Vijayan MM, Foster GD and Moon TW. 1993. Effects of cortisol on hepatic carbohydrate metabolism and responsiveness to hormones in the sea raven, *Hemirhamphys americanus*. *Fish Physiol Biochem* 12, 327-335. <https://doi.org/10.1007/BF00004417>.
- Weirich CR and Riche MA. 2006. Tolerance of juvenile black sea bass *Centropristis striata* to acute ammonia and nitrite exposure at various salinities. *Fish Sci* 72, 915-921. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01238.x>.
- Widiasa IN, Harviant GRO, Susanto H, Istirokhatun T and Agustini TW. 2018. Searching for ultrafiltration membrane molecular weight cut-off for water treatment in recirculating aquaculture system. *J Wat Pro Eng* 21, 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.12.006>.
- Zhang SY, Li G, Wu HB, Liu XG, Yao YH, Tao L and Liu H. 2011. An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquacult Eng* 45, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.08.001>.