

한국형 바이오플락 새우양식 및 산업화 연구

구자근

I. 서론

우리나라의 서해안 특성에 적합한 새우 양식은 부가가치가 높으나, 질병에 의한 대량폐사, 환경오염 및 수입새우 증가 등의 요인이 문제점으로 대두되고 있는 실정이다. Bio-floc Technology(BFT, 미생물총기술, 타가영양 양식법)는 타가영양 미생물을 활성화해 수중의 암모니아를 제거하여 사육수의 교환 없이도 수질을 정화하는 장점이 있다(그림 1). 또한 BFT는 슬러지(침전물) 제거 없이 잔류 유기물(사료 찌꺼기, 배설물)의 암모니아를 제거하는 신개념 녹색 기술양식이다. 타가영양 미생물(유기탄소와 암모니아를 에너지원으로 세균단백질을 합성하는 미생물)을 활성화해 수조 내에서 암모니아성 질소를 제거한다는 점에서 기존의 순환여과 방식과 큰 차이가 있다. 또한 사육수의 출입이 없기 때문에 환경오염이 발생되지 않고 외부 병원성 미생물의 유입도 없기에 항생제·약품 사용이 저감되며, 질병예방의 차원에서도 많은 장점이 있다.

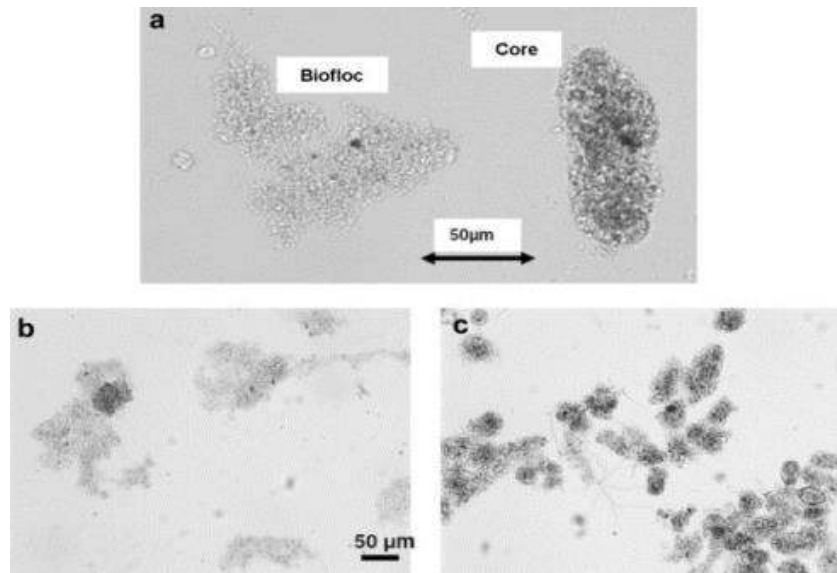


그림 1. Bio-floc (타가영양 미생물)

바이오플락은 해로운 질소화합물을 분해하며, 아울러 수질을 안정시킴과 동시에 floc 자체가 새우의 먹이가 되면서 새우의 성장을 빠르게 한다(그림 2).

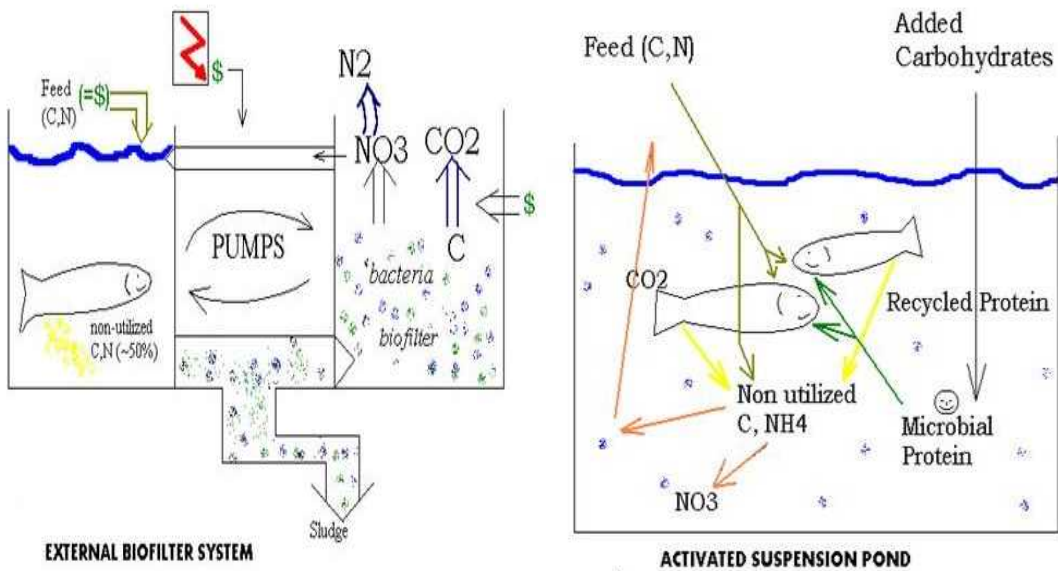
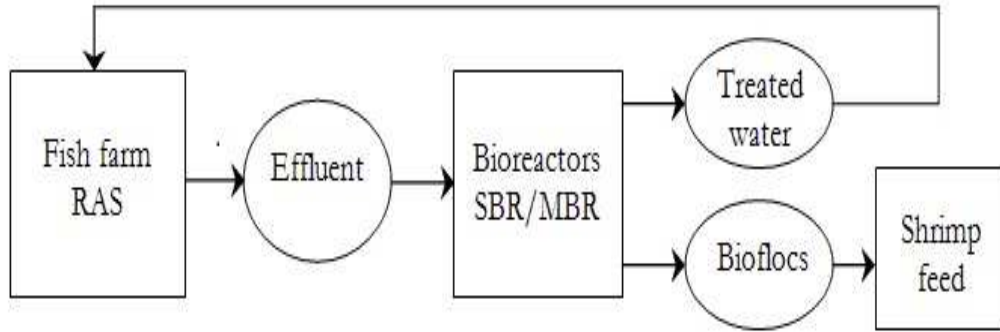


그림 2. Bio-floc technology 과정 모식도

본 연구는 기존의 Green house식의 BFT 양식장에서 유용 새우류에 속하는 대하, 보리새우, 흰다리새우 등의 어미를 사육하기 위하여 한국형 바이오플락 순환여과시스템의 개발에 대한 연구를 진행하였고, 한국형 바이오플락의 미생물 별 농도를 실험구로 생산성을 측정하여 한국형 바이오플락의 정량화 실험에 대한 논문은 2015년 학술지에 게재하였다(부록 참고). 또한 어미 사육을 통한 유용 새우류의 종자생산기술 및 육종을 통한 성장률과 생존율을 높이는 기술을 확보하기 위한 목적으로 바이오플락 시스템에서 유용 새우류의 어미를 사육하였다.

II. 재료 및 방법

1. 어미의 확보 및 사육

실험에 사용된 새우류는 대하(*Fenneropenaeus chinensis*), 보리새우(*Marsupenaeus japonicus*) 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 어미를 100~2,000 마리씩 수집하여 사용하였다. 대하는 2017년 11월 21일 인천광역시 강화군 주문도에서 사육된 것으로 전장 9.5 ± 1.45 cm, 체중 10 ± 2.26 g의 총 2,000마리를 확보하였다. 보리새우는 2017년 9월 12일 경남 수산자원연구소에서 분양 받은 post larva 전장 1.2 ± 0.54 cm, 체중 0.01 ± 0.004 g의 총 4만 마리와 2017년 10월 18일 경남 남해에서 포획된 자연산 개체 전장 13.5 ± 0.67 cm, 체중 25 ± 1.10 g의 총 2,000마리를 확보하였다. 흰다리새우는 2017년 10월 28일 인천광역시 강화군 화도면 소재의 양식장에서 중간 육성된 것으로 전장 8.25 ± 1.06 cm, 체중 6.6 ± 0.64 g의 총 2,000마리를 확보하였다. 확보된 새우류는 유수식으로 수온을 10°C까지 내려 안정적인 상태를 위해 순치 하였다. 안정적인 온도와 사육환경이 된 중부터 가온을 시작해 지수식의 바이오플락 시스템을 제작하여 사육하였다.

표 1. 흰다리새우, 보리새우, 대하의 바이오플락 실험구 개시 시 수조면적, 입식량, 무게, 시작 데이터

	흰다리새우	보리새우(치하)	보리새우(어미)	대하
수조면적 (ton)	60	60	60	60
입식량	2,000	30,000	100	2,000
개체 평균무게 (g)	6.6	0.01	25	10
시작일	10.26	9.12	10.18	11.21

2. 미생물 대량배양

미생물 대량 배양기는 1톤이며 밀폐할 수 있는 원통에 온도를 조절 할 수 있는 가온부분과 온도조절기 그리고 배수고와 청소할 수 있는 밸브로 구성되게 제작하였다(그림 1). 실험적으로 유용미생물 EM을 배양하여 활성액을 만들 때 여과해수 600 L, 담수 400 L EM원액 20 L, 당밀 20 kg을 30 °C에서 1주일간 배양하면 활성액이 되는 것을 확인 할 수 있었다. 미생물 대량배양을 위한 수조의 각 부분의 구성품들은 다음과 같다(그림 3).



□ 배양수조



□ 온도조절기



□ 배수 및 청소밸브

-
- ① 배 양 수 조: 1톤의 원형수조를 이용하여 밀폐하여 사용할 수 있음
 - ② 온 도 조 절 기: 배양수조의 온도를 조절할 수 있으며 온도를 시간에 맞추어 조절할 수 있도록 설계
 - ③ 배수 및 청소 밸브: 미생물을 배출할 때 사용하는 밸브와 청소하고 찌꺼기를 배출할 때 사용하는 밸브로 구성
-

그림 3. 미생물 대량 배양기

3. 한국형 바이오플락 사육시스템 개발

새우류 치하 및 어미를 사육하기 위하여 본소의 갑각류 생산동에 미생물 배양기 등을 설치하여 사육시스템을 만들었다. 구성요소로는 유입·유출 할 수 있는 저수조와 사육수조를 기본으로 미생물 배양기, 정량펌프, 인젝션 펌프 등으로 구성되어 있으며, 수조마다 다른 종의 새우를 사육하였다.

Ⅲ. 결과

1. 어미확보 및 사육

2017월 12월 31일까지 사육된 새우 중 흰다리새우는 체중이 6.6 g에서 14.2 g, 보리새우 치하는 0.01 g에서 0.1 g으로 대하는 10 g에서 16.6 g으로 1.6~10배로 체중이 증가하였다. 보리새우 어미는 무게의 변화가 없었다. 생존율에 대해서는 각 어종별로 6~90%까지의 생존율을 보였는데 보리새우 어미가 90%로 가장 높았다 (표 2).

수온은 각 어종별로 실온에서 순치를 시켰다가 보리새우 어미는 10℃, 흰다리 새우와 대하는 15℃를 유지시켰다.

표 2. 한국형 바이오플락 시스템에서 흰다리새우, 보리새우, 대하에 대한 바이오플락 실험구의 12월31일 현재까지 수조면적, 입식량, 개체 무게

	흰다리새우	보리새우(치하)	보리새우(어미)	대 하
수조면적 (ton)	60	60	60	60
입식량	120	9,600	90	600
개체 평균무게 (g)	14.2	0.1	25	16.6

2. 미생물 대량 배양 및 이용

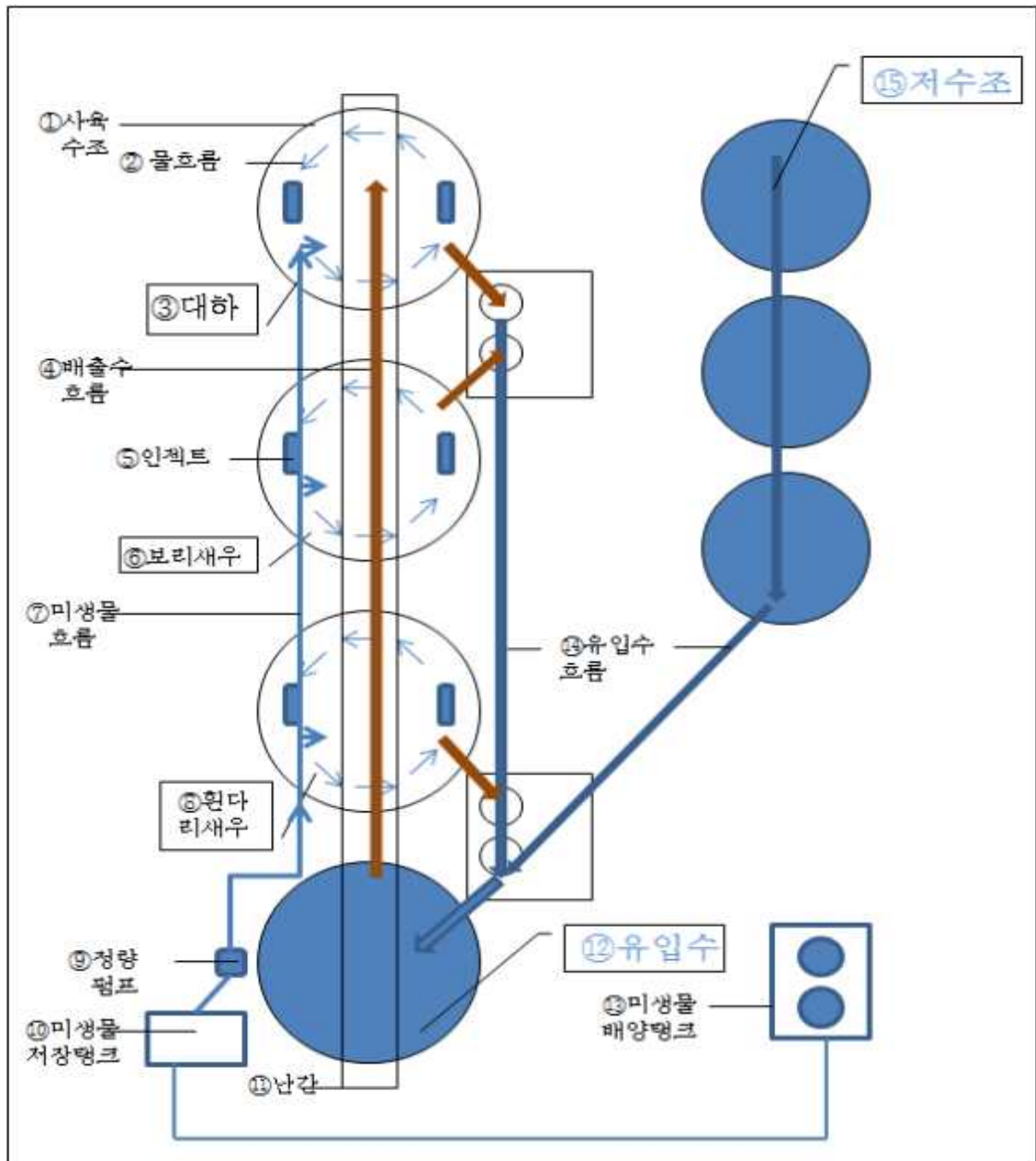
미생물의 대량배양은 9월부터 12월까지 매월 3~5톤 씩 생산하였으며 전체 16톤을 생산하여 사용하였다. 사육한 어종은 보리새우, 대하, 흰다리새우 3종이다.

표 3. 한국형 바이오플락 양식 시스템을 위한 미생물의 월 생산량 및 사육어종

	9월	10월	11월	12월	총 합계
생산량 (ton)	3	4	4	5	16
사육어종	보리새우	보리새우 흰다리새우	보리새우 흰다리새우 대하	보리새우 흰다리새우 대하	3종

3. 한국형 바이오플락 사육 시스템 개발 및 이용

한국형 바이오플락 사육 시스템은 일반 어류 사육수조를 이용하여 특정 미생물을 배양하여 농도에 맞게 사육수조에 정량 투입하는 시스템으로(그림 4), 새우별 사육수조마다 온도를 다르게 설정하였으며, 수온은 10~17℃를 개별적으로 유지하였다. 사육한 결과는 표 2에 나타나 있다.



-
- | | |
|---------------------------------------|------------------------------|
| ① 사육수조 : \varnothing 8m, 높이 1.2m 수조 | ⑨ 정량펌프 : 미생물을 정량으로 공급하는 장치 |
| ② 물흐름 : 사육수조내로 사육수 흐름 | ⑩ 미생물 저장탱크 : 미생물을 잠시 저장하는 탱크 |
| ③ 대하 : 사육어종 대하 | ⑪ 난간 : 사람이 다니는 길 |
| ④ 배출수 흐름 : 저수조에서 사육수 흐름 | ⑫ 유입수 : 사육수조에 유입하는 사육수 |
| ⑤ 인젝트 : 공기 포말 장치 | ⑬ 미생물 배양탱크 : 미생물을 배양하는 탱크 |
| ⑥ 보리새우 : 사육어종 보리새우 | ⑭ 유입수 흐름 : 사육수조로 유입하는 흐름 |
| ⑦ 미생물 흐름 : 배양된 미생물의 흐름 | ⑮ 저수조 : 사육수조에서 나와 저장하는 수조 |
| ⑧ 흰다리새우 : 사육어종 흰다리새우 | |
-

그림 4. 유용 새우류 사육을 위한 한국형 바이오플락 사육시스템

IV. 사진첩



흰다리새우 이동



흰다리새우 사육



바이오플락 전 유수식



바이오플락 후 지수식



보리새우 치하 수집



보리 새우 치하(12월 탱크 같이)



인젝션 펌프에 의한 산소공급



바닥 사이폰 실시

《부록》 한국형바이오플락 정량화 실험

바이오플락(Bio-floc) 시스템이 사육 환경개선 및 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)의 성장에 미치는 영향

김민수¹ · 민은영² · 구자근¹ · 강주찬^{1*}

부경대학교 수산생명의학과, ¹인천수산자원연구소, ²국립수산물품질관리원

Effects of Bio-floc System on Growth and Environmental Improvement in the Chinese White Shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

Min-Su Kim, EunYoung Min¹, Ja-Keun Koo² and Ju-Chan Kang^{1*}

Department of Aquatic life medicine, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

¹Institute of Fisheries science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Incheon Fisheries Research Institute, Incheon 48513, Korea

The objective of this study was to investigate the effects of bio-floc system that is composed of effective microorganisms (EM) on the microbial composition and water qualities in rearing water and the growth of Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. To investigate the microbial composition according to the bio-floc levels, the study was conducted at 100 and 150% of bio-floc after 5 and 10 days in bio-floc system. The results showed that total bacteria count (TBC) and the counts of *Latobacillus* sp., *Bacillus* sp. and *Rhodobactor* sp., were significantly decreased after 5 days in bio-floc system. To assess the growth of *F. chinensis* according to the concentrations of bio-floc, the study was conducted at the bio-floc concentrations; 0 (control), 60, 80, 100, 120 and 140% of the prepared bio-floc for 90 days. The growth factors such as daily length and weight gain were considerably increased at the concentrations of bio-floc 100, 120, and 140% after 90 days. As water quality indicators, the values of total-N, NH₄⁺-N and PO₄³⁻-P were analyzed, and they were significantly decreased at 120 and 140% of bio-floc, compared to the control. The results demonstrated that combination of EM showed the synergic effect on removing N and P.

Key words: Chinese white shrimp, EM, Bio-floc system, Growth rate

서 론

우리나라 새우양식은 축적식 양식장에서 반집약적인 방법으로 이루어지고 있으며, 지난 20년간 서해안을 중심으로 빠르게 증가하였으나, 2002년 이후부터는 생산량이 해마다 크게 감소하였다(Jang et al., 2007; Kim, 2010). 그 이유는 여러 요인이 있지만 바이러스성 질병, 특히 흰반점바이러스(white spot syndrome virus)에 의한 대량폐사로 때문인 것으로 알려져 있다(Chou et al., 1995; Jang, 2009). 또한, 새우 양식장에서 배출되는 사료 찌꺼기, 대사산물 및 배설물 등에서 유래된 많은 양의 질산, 아질산 및 암모니아와 같은 질소 성분은 사육수의 부영양화와 이에 따른 수질악화를 초래하기 때문에 질병과 함께 가장 문제시되고 있는 점이다(Liu et al., 2004). 이러한 문제에 대

한 대안으로 최근에는 물리 또는 화학적 방법보다는 친환경적이며 안정성이 확보된 Bio-floc technology (BFT) 또는 바이오플락 시스템(bio-floc system) 양식이 주목을 받고 있다(Bashan and Bashan, 2010).

바이오플락 시스템(bio-floc system)은 생산성 향상을 위하여 물을 순환시키지 않기 때문에 바이러스 및 세균이 침입하지 못하며, 다른 한편으로 양식 생물에 해롭지 않은 유용 미생물 또는 타가 영양 미생물을 이용하기 때문에 수중의 유기질소와 암모니아 등이 효과적으로 제거되어 사육수의 교환 없이도 수질을 정화할 수 있는 장점이 있다(Emerenciano et al., 2013). 또한 사육수 내 질소 성분에서 전환된 미생물이 양식 생물의 추가 단백질원 즉 양식 생물의 먹이가 되기 때문에 전체 양식 비용의 50% 이상을 차지하는 사료 비용의 절감을 가져오는 장점도 있

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0688>



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.

Korean J Fish Aquat Sci 48(5) 688-695, October 2015

Received 24 March 2015; Revised 26 May 2015; Accepted 6 October 2015

*Corresponding author: Tel. +82 51 629 5944 Fax: +82 51 629 5938

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

다(Peterson et al., 2012). Bio-floc 기술의 원리는 간단하지만, 이 기술의 일반적인 기준이 모호하고, 양식기술과 그 시스템에 대한 이해가 부족하기 때문에 실제 양식에 적용하는 것은 쉬운 일은 아니다(Hargreaves, 2013). Cho et al. (2010)는 새우 양식에 이용되는 bio-floc에 있어 타가영양세균의 종조성과 기능에 관한 연구는 전무하다고 하였으며, 이는 타가영양세균의 대부분은 배양이 불가능한 세균으로 접근방법이 매우 어렵기 때문이라고 하였다. 특히 특정 미생물이 플락(floc) 내에서 유용 미생물로서의 효과가 있음을 입증하기 위해서는 많은 선행 연구가 수행되어야 하며(Fuller, 1992; Crab et al., 2012), 양식 호지 또는 사육수조 내에 자연적인 bio-floc을 형성하기 위해서는 미생물뿐만 아니라 균류, 원생동물, 조류 및 선형동물 등의 대량 발생도 유도해야 한다. 이와 같이 bio-floc을 형성시키는 일은 쉬운 일이 아니며, 이미 형성된 bio-floc을 관리함에 있어서도 상당한 주의가 요구된다(Pérez-Rostro et al., 2014). 따라서, 본 연구에서는 이미 그 효과가 알려진 유용 미생물들을 재 조합하여 bio-floc을 인위적으로 형성시킴으로써 새우 양식에 최적화된 bio-floc 시스템을 만들기 위하여 실험을 실시하였다.

유용 미생물은 동물 사육에서 사료에 혼합하여 부여하였을 경우, 동물의 성장을 증가시키고 면역 시스템을 자극하여 질병에 대한 저항성을 높이는 장점 때문에 여러 동물 사육에 사용되어 왔고, 최근에는 어류 및 갑각류에 대해서도 연구가 진행되고 있다(Ali, 2000). 수산 양식에서 주로 사용되는 유용 미생물에는 유산균 박테리아(*Lactobacillus*, *Carnobacterium* sp. 등), *Bacillus* sp., *Vibrio* sp. 및 *Pseudomonas* sp. 등이 있다(Verschuere et al., 2000). *Lactobacillus*는 젖산균 중의 하나로 발효식품에서 오랫동안 사용되었으며, Black tiger shrimp, *Penaeus monodon*에 *Lactobacillus*를 첨가한 사료 부여 시, 새우의 성장률과 생존율이 크게 향상되었으며, *Vibrio harvey*에 대한 저항성도 상당히 증가되었다고 한다(Gilliland et al., 1980; Uddin et al., 2013). *Bacillus*는 소화관에서 다양한 세포외효소(exoenzyme)를 분비하여 유해균을 차단하므로 새우의 생존율을 높였다는 보고가 있으며, Black tiger shrimp, *P. monodon*과 Indian white shrimp, *P. indicus*에서 성장률과 생존율의 향상을 보였다는 보고가 있다(Rengpipat et al., 2000; 2003; Saeed et al., 2005). *Rhodobacter*는 광합성 균으로 혐기성 환경에서 광합성을 하며, 산소와 질산염 등을 이용하여 성장하고, 수산양식에서 질소 고정과 유기물 분해에 중요한 역할을 한다(Ryan et al., 2004). 새우 양식에서 광합성 균에 대한 연구는 *Rhodospseudomonas palustris*를 흰다리 새우 양식에 접종시켰을 때, 균의 농도가 증가함에 따라 P.N 및 COD (Chemical Oxygen Demand) 제거 비율이 증가하였다는 보고가 있다(Luo et al., 2012).

본 연구에서는 대하, *Fenneropenaeus chinensis*를 대상으로 이미 알려진 유용 미생물들 즉, *Latobacillus*, *Bacillus*와 광합성 박테리아인 *Rhodobacter* 미생물을 재 조합하여 bio-floc 양식 시스템에 적용하기 위하여, 이들 미생물의 활성과 수질변화

를 조사하였고, 새우의 성장률을 조사하여 유용 미생물을 이용한 bio-floc 양식 시스템의 적용 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

공시생물

대하(*F. chinensis*)는 인천수산자원연구소에서 분양 받아 실험실 조건에서 2주 이상 순차 시킨 후, 외관상 질병증세가 없는 건강한 치하(전장: 1.5 ± 0.3 cm; 체중: 137 ± 12.5 mg)를 선별하여 실험구별 10마리씩 수용하였다. 실험기간 동안 퓨리나 사료(Cargill Agri Purina, Inc. Korea)를 매일 2회(오전 9시, 오후 6시), 체중의 3%를 공급하였고, 공식현상을 피하기 위하여 PET병을 이용하여 개별 수용하였으며, 실험은 3반복으로 실시하였다.

실험조건

모든 실험은 항온실($20 \pm 1^\circ\text{C}$)에서 실시하였고, 3 cm 가량의 모래가 바닥에 깔린 원형수조($40 \times 40 \times 60$ cm)에 해수 180 L를 채워 치하를 입식 하였고, 실험에 사용된 수질조건은 Table 1과 같다. 실험에 사용된 bio-floc은 유용미생물인 *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. (EM, Korea)와 *Rhodobacter* sp. [(주) 두산 에코비즈넷, Korea] 및 당밀, 비타민 등을 혼합하여 Table 2와 같이 bio-floc 활성액을 제조하였다. 이와 같이 제조된 bio-floc 활성액 1 L를 50 ton 해수에 희석시킨 농도를 100%로 정하고, 이를 다시 해수로 희석 또는 조제하여 0, 60, 80, 100, 120 및 140% 농도로 만들어 대하 사육실험 농도로 사용하였다. 또한, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. 및 *Rhodobacter* sp. 균들의 농도를 1×10^6 CFU/mL 이상으로 유지할 수 있도록 5일을 주기로 bio-floc 활성액을 제조하여 90일 동안 사육실험을 실시하였다.

미생물 조사

사육실험을 시작하기 전, bio-floc 활성액을 제조한지 5일과 10일 후에 bio-floc 농도 100과 150% 구간에 대하여 미생물 조

Table 1. The chemical components in seawater used in this experiment at initial experimental condition

Test parameters	Value
Temperature ($^\circ\text{C}$)	24.50 \pm 0.50
pH	8.00 \pm 0.50
Salinity (psu)	30.50 \pm 1.00
Dissolved oxygen (mg/L)	7.10 \pm 0.30
Chemical oxygen demand (mg/L)	1.13 \pm 0.10
Ammonia (mg/L)	0.03 \pm 0.01
Total nitrogen (mg/L)	0.37 \pm 0.13
Phosphorus (mg/L)	0.04 \pm 0.01
Suspended solid (mg/L)	1.22 \pm 0.50

Table 2. Microbial composition used in the bio-floc culture systems in this experiment

Component	Composition	Culture condition	Culture period
EM (Effective microorganisms)	<i>Bacillus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.	Seawater (580 L) + Freshwater (380 L) + Molasses (20 L) + EM (20 L)	14 days
PB (Photosynthetic bacteria)	<i>Rhodobacter</i> sp.	Seawater (99.4 L) + Vitamin (0.1 L) + PB (0.5 L)	3 days

성을 조사하였다. 각각의 수조에서 채수하여 멸균 생리식염수로 10배씩 단계 희석하고 미생물 종류에 따라 각기 다른 배지에 적하하여 35°C, 48h 배양한 후 세균 집락 수를 조사하였다.

Total bacteria count (TBC)는 1% NaCl을 첨가한 Nutrient Agar (NA, Difco, USA) 배지에 단계 희석한 시료를 적하하여 배양한 후 세균 집락 수를 조사하였다.

Lactobacillus sp., *Bacillus* sp. 및 *Rhodobacter* sp. 분리균은 그람 염색 및 세포 형태 등의 형태학적 특성에 따라 순수 배양되었는지 확인한 후, API-test kit (20E & 50CHB & CHL, BioMérieux, Los Angeles, CA, USA)를 통한 확인시험을 실시하여 아래와 같이 각각의 선택배지에 단계 희석한 시료를 적하하여 배양한 후 세균 집락 수를 조사하였다.

Lactobacillus sp. 균은 1% NaCl을 첨가한 MRS (MRS broth, Difco, Detroit, MI, USA) 배지에, *Bacillus* sp. 균은 1% NaCl을 첨가한 MYP (Mannitol-Egg Yolk Polymyxin; Difco, Detroit, MI, USA) 배지에, *Rhodobacter* sp. 균은 MB (Malate basal broth; Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 배양한 후 각각 세균의 집락 수를 조사하였다.

수질환경 조사

수온, pH, 용존산소량(DO), 염분은 YSI-85 DO meter (Yellow Springs Instrument, U.S.A.)와 pH meter (Istek, Inc., Korea)를 이용하여 매일 측정하였으며, 사육수를 매주 채수하여 해양환경공정시험방법(국토해양부, 2010)에 따라 화학적 산소요구량(COD), 부유물질(SS), 총질소(TN), 암모니아 질소(NH₄⁺-N) 및 인산염 인(PO₄⁻-P)를 분석하였다.

성장률 조사

실험에 사용한 대하는 실험에 들어가기 전 전장과 체중을 측정하였으며, 0, 60, 80, 100 및 120, 140% 농도의 bio-floc 사육수에 입식 한 후, 45일과 90일 경과 후, 전장과 체중을 측정하여 다음과 같이 일일 성장량을 구하였다.

$$\text{일일 성장량(Daily growth gain)} = (W_f - W_i) / \text{day}$$

$$W_f = \text{Final length or weight}$$

$$W_i = \text{Initial length or weight}$$

유의성 검정

실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시하고, 사후검정으로 Duncan's multiple range test를 통해 $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

Bio-floc 시스템에 이용되는 유용 미생물 중 광합성균은 혐기성 미생물로 빈산소 또는 혐기성 조건에서 유기물을 분해하여 양식장 환경수의 수질을 개선하는 기능이 있다(White, 2000). 이전 연구에 따르면, *Bacillus* sp., *Rhodospseudomonas* sp. 및 *Lactobacillus* sp. 균의 농도가 $1-4 \times 10^6$ CFU/mL일 때, 새우 양식장 수질 개선에 가장 좋은 효과를 나타내었고, 잉어는 성장률의 증가를 보였다고 한다(Luo et al., 2012; Wang, 2011). 따라서, 본 연구에서는, 물론 미생물 군 종마다 적용되는 균의 농도가 다를 수 있지만, 1×10^6 CFU/mL 농도가 효과적인 것으로 판단하고, 균들이 사육 시스템 내에서 이 농도를 유지할 수 있는 기간이 얼마인지를 알아보기 위하여 시간 경과에 따른 균 수를 측정하였다. Bio-floc 활성액 제조 5일과 10일 후, Bio-floc 농도 100과 150% 구간에 대하여 미생물 균 수를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. Bio-floc 농도 100% 구간은 0일째 총 균수가 $4.7 \pm 0.1 \times 10^8$ CFU/mL이었으나, 5일 후에는 $0.03 \pm 0.1 \times 10^8$ CFU/mL로 감소하였고, 10일 후에는 $0.001 \pm 0.1 \times 10^8$ CFU/mL로 감소하였다($P < 0.05$). Bio-floc 농도 150% 구간은 0일째 총 균수가 $4.8 \pm 0.1 \times 10^8$ CFU/mL이었으나, 5일과 10일 후에 각각 $0.05 \pm 0.1 \times 10^8$ CFU/mL, $0.005 \pm 0.1 \times 10^8$ CFU/mL로 감소하였다($P < 0.05$). *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. 및 *Rhodobacter* sp. 균 수도 총 균수와 마찬가지로 5일째 상당한 감소를 보였고($P < 0.05$), 10일째에는 균이 거의 검출되지 않았다(Fig. 1). 이상의 결과로부터 bio-floc 활성액 제조 후 5일 이후 미생물의 농도가 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며($P < 0.05$), 그 감소폭은 bio-floc 농도 100%보다는 150%구간이 작았다. 따라서, 본 연구에서는 *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. 및 *Rhodobacter* sp. 균들의 농도를 1×10^6 CFU/mL 이상으로 유지할 수 있는 기간인 5일을 주기로 bio-floc을 조합 및 농도를 조정하여 bio-floc system을 이용한 대하 사육실험을 실시하였다.

Bio-floc 사육수와 일반 사육수에 대하여 입식하고 45일과 90일 경과 후 사육수 내 수질 변화를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 용존 산소(DO)와 화학적 산소요구량(COD)은 bio-floc 농도 및 사육일수와 관계없이 유의한 변화를 보이지 않았다. 고밀도 새우 양식에서 사육수 내 암모니아 질소의 축적은 가장 큰 제한요인 중 하나이며(Cho et al., 2010), 일류새우, *P. monodon*의 경우, 치하에 영향을 미치지 않는 총 암모니아(TAN)와 아질산($\text{NO}_2\text{-N}$)의 안전 농도는 각각 3.7과 3.8 mg/L이다(Chen and Lei, 1990). 본 연구에서, 총 질소(TN)는 모든 구간에서 0.6-0.7 mg/L 수준으로 bio-floc 농도 120%까지는 유의한 변화가 관찰되지 않았으나, 140% 일 때는 90일 경과 후에 0.5 mg/L 이하로 떨어져 다른 구간보다 유의하게 감소하였다($P<0.05$). 암모니아 질소($\text{NH}_4\text{-N}$)는 대조구에 비하여 bio-floc을 첨가한 모든 구간에서 0.1-0.3 mg/L 수준으로 유의하게 낮은 값을 보였

다($P<0.05$). 인산인($\text{PO}_4\text{-P}$)은 사육 45일째, 140% 농도 구간에서 대조구에 비하여 유의하게 감소하였으나($P<0.05$), 90일째는 대조구보다 낮은 값이었으나 유의성은 인정되지 않았다($P>0.05$). 부유물질(SS)은 대조구간에서는 45일째에 비하여 90일째 값이 유의하게 높았으나($P<0.05$), bio-floc을 첨가한 구간에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다($P>0.05$) (Fig. 2).

Luo et al. (2012)의 연구에서 광합성균(*Rhodospseudomonas* sp.)의 농도를 4×10^6 CFU/mL로 유지할 때, 새우 양식수의 아질산($\text{NO}_2\text{-N}$), 질산($\text{NO}_3\text{-N}$), 암모니아 질소($\text{NH}_4\text{-N}$) 및 인(TP)의 수치가 감소하였다고 보고하였다. 이는 본 연구와도 유사한 결과이나, 본 연구에서 총 질소(TN)는 140% 구간을 제외하고는 유의한 차이가 없었다. 이는 Kim (2014)의 연구에서, bio-floc 첨가 사육수의 암모니아(NH_3)와 아질산(NO_2)은 감소를 보였으나, 질산(NO_3)이 bio-floc을 첨가 사육수에서 높은 수

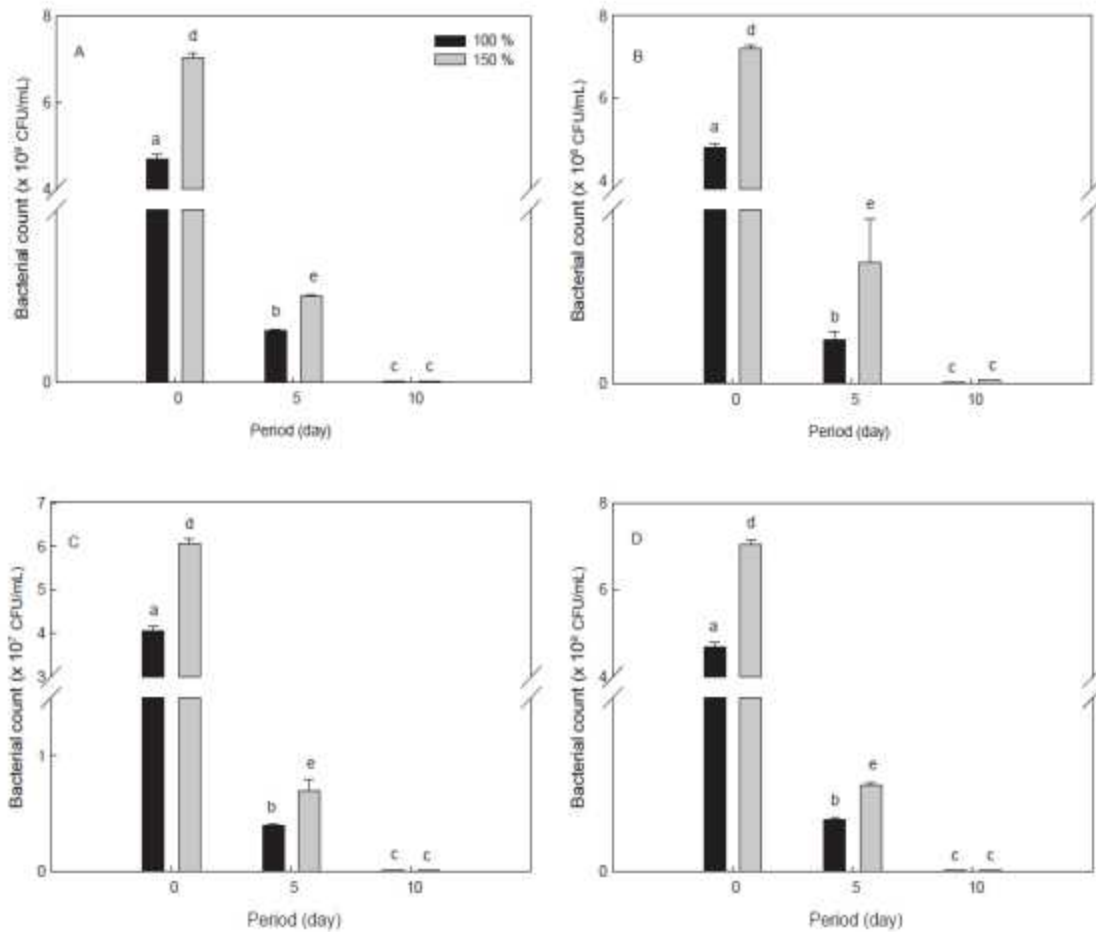


Fig. 1. Changes of total bacteria count (A), *Bacillus* sp. (B), *Latobacillus* sp. (C) and *Rhodobactor* sp. (D) microorganisms in bio-floc experimental solution (100 and 150%) for 5 and 10 days. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different as determined by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

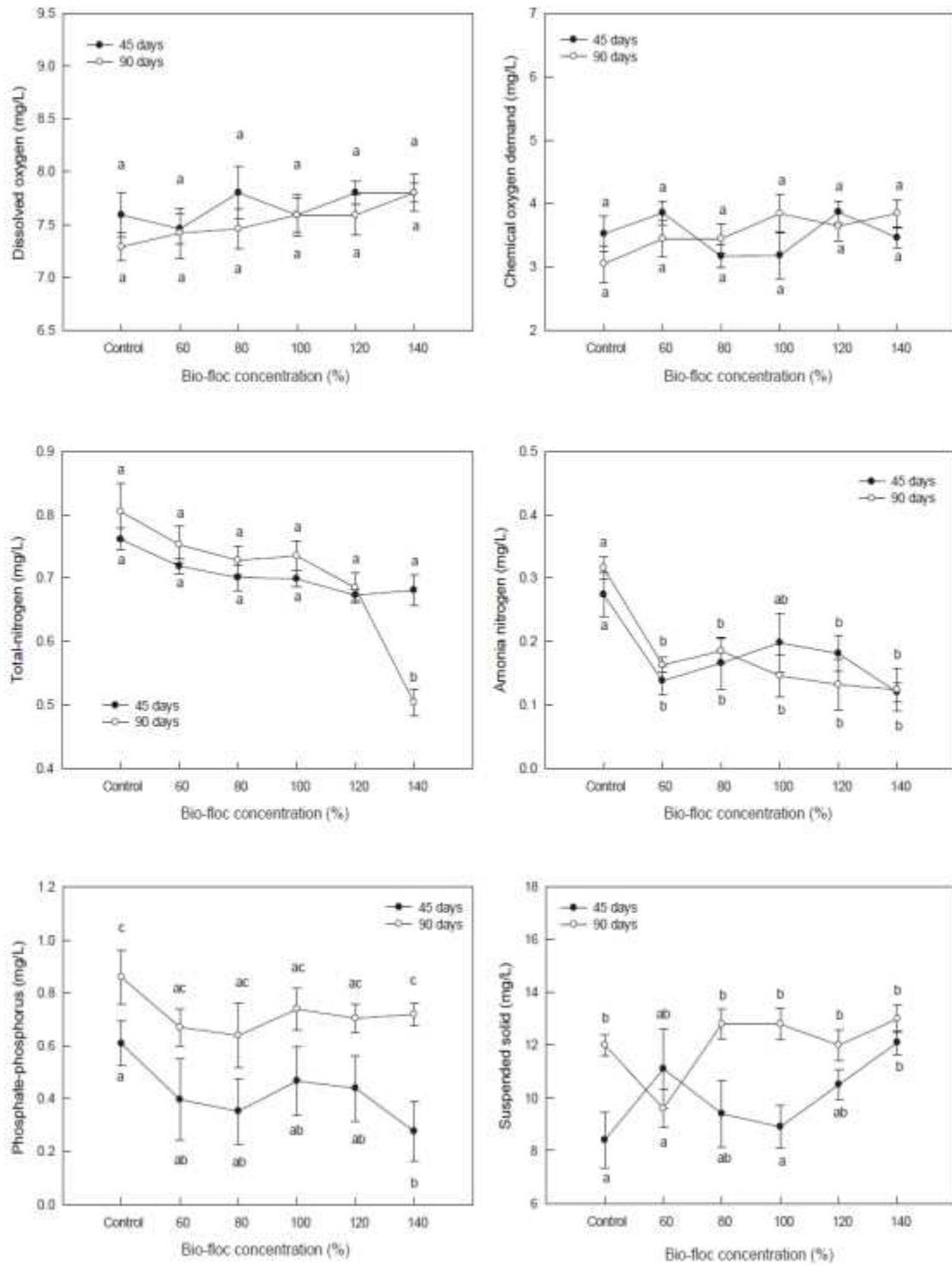


Fig. 2. Changes in water quality of the breeding water exposed to bio-floc concentrations (%) for 45 and 90 days. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different as determined by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

치로 유지된 것에서 원인을 찾을 수 있다. 물론 본 연구에서 아질산($\text{NO}_2\text{-N}$)과 질산성 질소($\text{NO}_3\text{-N}$)를 구분하여 측정하지 않았지만, 암모니아($\text{NH}_3\text{-N}$) 농도는 감소하였으나 총 질소(TN)의 농도 변화가 없었다는 것은 아질산($\text{NO}_2\text{-N}$) 혹은 질산($\text{NO}_3\text{-N}$)의 농도 증가를 유추할 수 있다. Avnimelech et al. (2007)의 연구에 따르면 bio-floc 사육수의 질산($\text{NO}_3\text{-N}$)의 농도가 높게 유지되는 것은 bio-floc 사육수의 공통적인 특징이며, Kim (2014)은 bio-floc 사육수의 낮은 pH 값과 연관성이 있을 것이라고 고찰하였다. 그러나 본 연구에서는 실험 기간 중 pH의 범위는 평균 7.9-8.1로 비교적 안정적이었고, 이는 본 연구에서 사용한 bio-floc 방법이, 유용미생물의 인위적인 추가 없이 자연적으로 발달한 bio-floc을 이용한 기존의 방법과는 다르기 때문인 것으로 생각된다.

Cho et al. (2010)은 bio-floc을 조성하기 위하여 유용 미생물을 이용하지 않고, 사육수 비교환 방식에서 자가영양(photo-autotrophic, autotrophic) 상태의 사육수를 타가영양(heterotrophic) 우점 상태로 전환시키고, 타가영양세균들이 유기물과 결합하여 미생물총(microbial floc, bio-floc)을 형성시킨다(Hopkins et al., 1999)는 점을 착안하여 흰다리 새우, *Litopenaeus vannamei*를 대상으로 실험을 실시하였다. 또한, Cho et al. (2010)은 이렇게 형성된 미생물총은 유기탄소를 에너지원으로 사용하기 때문에 탄소와 질소 비율(C/N ratio)을 조절하여 암모니아를 효율적으로 제거할 수 있다고 알려져 있는데, 실험 결과, 평균 비이온화 암모니아 농도가 0.1 mg/L 이하로 새우 생존 및 성장에는 영향을 미치지 않았고, 아질산염 농도 평균이 13.6 mg/L로 생존과 성장에 심각한 영향을 미치지 않은 것으로 판단하였다. 하지만, Cho et al. (2010)의 수질 분석 값은 본 연구 결과보다 높은 값으로 이는 본 연구에서 주기적인 bio-floc 활성액을 공급한 것과는 달리 사육수 비교환 방식으로 사육했을 때 문일 것일 것이다.

Bio-floc system 사육에 따른 치하의 생존율은 대조구와 비교하여 유의한 차이가 관찰되지 않았으며, 성장률을 조사한 결과 Fig. 3과 같이 나타났다. 체중의 경우, 대조구간은 입식 초기, 5.57 ± 1.5 mg/day에 비하여 입식 후 45일간은 사육환경 적응 등으로 인하여 더딘 성장상태를 보였으나 90일 이후에는 34 ± 2.6 mg/day으로 양호한 성장상태를 보였다. Bio-floc 사육수 농도에 따른 대하의 체중 성장률을 살펴보면, 45일 사육의 경우, bio-floc 농도 100% 이상에서 대조구보다 유의하게 높은 성장을 보였고, 120%에서 22.5 ± 0.9 mg/day로 최대로 성장하였다($P < 0.05$). 90일 이후에도 100% 이상의 농도에서 유의하게 높은 성장을 보였고, 120%에서 60.7 ± 6.5 mg/day로 최대로 성장하였다. 체장 성장도 체중의 경우와 유사하게 100% 이상의 농도에서 대조구에 비해 유의하게 높은 성장을 보였으며, 120% 구간에서 최고로 높은 성장을 보였다(Fig. 3).

Bio-floc 시스템 사육의 장점은 사료 비용 절감도 있지만, 두드러질 만큼 생산된 새우의 크기가 크다는 것도 있다. 즉, bio-

floc에 의한 성장률의 증가는 이전의 연구에서도 보고된 바 있다(Moriarty, 1999; Rengpipat et al., 2000, 2003; Wang and Gu, 2010). Wang and Gu (2010)는 *Bacillus coagulans*로 사육한 white shrimp, *Penaeus vannamei*의 생존율은 유의한 변화가 없었으나, 일일 체중이 유의하게 증가하였다고 보고하였다. 이러한 성장률 증가의 원인을 연구자들은 bio-floc이 추가적인 먹이 공급원이 되었으며(Burford and Lorenzen, 2004; Burford et al., 2004), 소화관내의 세균총(bacterial flora)의 변화로 인한 소화 흡수율의 증가에 의한 것으로도 보고 있다(Venkat et al., 2004; Yousefian and Amiri, 2009). Moriarty (1996, 1998)는 *Bacillus* sp. 균이 외부비 효소를 분비한다고 보고하였고, Saeed et

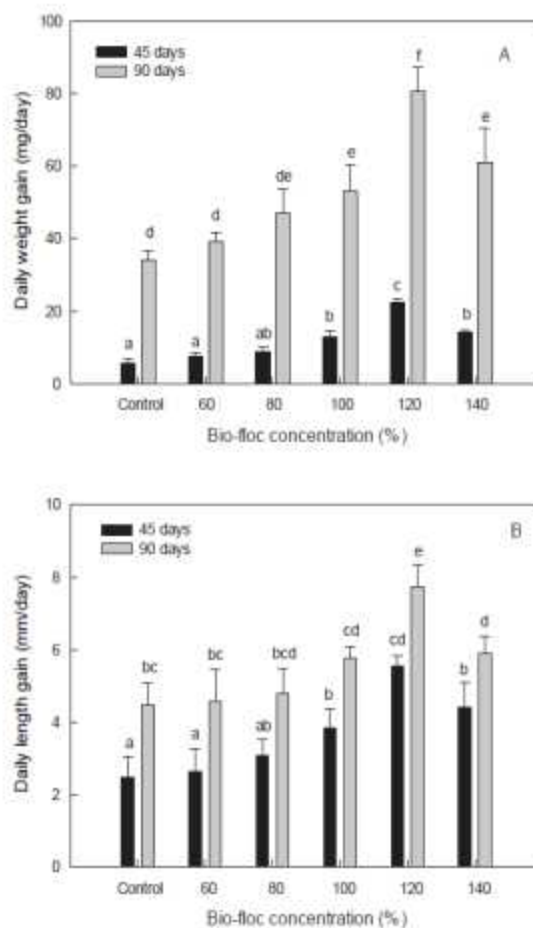


Fig. 3. Daily weight gain (A) and daily length gain (B) of the Chinese shrimp, *Penaeus chinensis* exposed to the different concentration of bio-floc after 45 and 90 days. Concentration ration 100 is 1 L bio-floc per seawater 50 ton. Vertical bar denotes a standard error. Values with different superscript are significantly different as determined by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

al., (2006)는 이러한 외부비효소가 양식생물의 소화관 내의 소화효소를 활성화하여 사료효율이 증가하였을 것이고, 그 결과로 생존율 및 성장률이 증가하였을 것이라고 하였다. 또한, 본 연구에서 이용한 방법처럼, 2종 이상의 유용 미생물을 함께 배양하여 새우를 사육하였을 때, 성장이 좋아진다는 보고도 있다 (Gatesoupe, 2002). 이는 유용 미생물들이 유해 미생물을 견제하여 질병의 확산을 방지하며, 면역 기능을 자극함으로써 새우의 건강상태가 좋아졌기 때문일 것이라고 한다 (Abidi, 2003; Hai et al., 2009). 뿐만 아니라, 대하는 공식을 하는 특성이 있는데, 수색이 많을수록 공식률이 높아져 생존율이 낮아지는 결과를 초래한다. 수색은 미생물의 양 및 존재 여부, 유기물의 양과 부유물질(SS) 등에 의해서 달라진다. 본 연구에서는 1×10^6 CFU/mL 정도의 균이 첨가된 bio-floc 활성액 농도라면 수색유지 기능도 할 수 있어 공식 방지에 따른 생산량에 증대에 효과적일 것이라고 생각한다.

이상의 결과, 시험에 사용한 유용 미생물을 이용하여 인공적으로 만든 bio-floc 활성 수가 사육수 수질 개선효과가 있으며, 대하 치어의 성장에 좋은 효과를 보인 것으로 보아 이 시스템을 대하 사육기술로 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

사 사

이 논문은 2014년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (한국형 축제식 바이오플라 새우양식 시스템 표준공정개발).

References

- Abidi R. 2003. Use of probiotics in larval rearing of new candidate species. *Aquaculture Asia* 8, 5-6.
- Ali A. 2000. Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture. Ph D Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå, Sweden.
- Avnimelech Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>.
- Bashan LE and Bashan Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Biore-source Technol* 101, 1611-1627. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>.
- Burford MA and Lorenzen K. 2004. Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediments remineralization. *Aquaculture* 229, 129-145. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00358-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00358-2).
- Burford MA, Thompson PJ, McIntosh RP, Bauman RH and Pearson DC. 2004. The contribution of floc-cultured material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system. *Aquaculture* 232, 525-537. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00559>.
- Chen JC and Lei SC. 1990. Toxicity of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* juveniles. *J World Aquac Soc* 21, 300-306. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.1990.tb00543>.
- Cho YR, Kim BR and Jang IK. 2010. Super-intensive culture of Whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in HDPE-lined ponds with no water exchange. *Korean J Fish Aquat Sci* 43, 331-339. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2010.0331>.
- Chou HY, Huang CY, Wang CH, Chiang HC and Lo CF. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org* 23, 165-173.
- Cohen JM, Samocha TM, Fox JM, Gandy RL and Lawrence AL. 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacult Eng* 32, 425-442. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.09.005>.
- Crab R, Lambert A, Defoirdt T, Bossier P and Verstraete W. 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *J Appl Microbiol* 109, 1643-1649. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04791>.
- Emerenciano M, Gaxiola G and Cuzon G. 2013. Biofloc Technology (BFT): A review for aquaculture application and animal food industry. *InTech* 12, 302-328. <http://dx.doi.org/10.5772/53902>.
- Fuller R. 1992. Probiotics: History and Development of Probiotics. Chapman & Hall, New York.
- Gatesoupe FJ. 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* naupli as food for larval Pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 212, 347-360. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00138-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00138-2).
- Gilliland SE, Bruce BB, Bush LJ and Stanley TE. 1980. Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. *J Dairy Sci* 63, 964-972. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83033-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83033-5).
- Hai NV, Butler N and Fotedar R. 2009. Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *Pseudomonas aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1986). *Aqua Res* 40, 590-602. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02135>.
- Hargreaves JA. 2013. Biofloc production systems for aquaculture. *Southern Regional Aquaculture Center* 4053, 1-12.
- Hopkins JS, Sandifer PA, Browdy CL and Holloway JD. 1999. Comparison of exchange and no-exchange water management for the intensive culture of marine shrimp. *J Shellfish Res* 13, 441-445.
- Jang IK, Jun JC, Jo GJ, Cho YR, Seo HC, Kim BL and Kim JS. 2007. Polyculture of fleshy shrimp *Fenneropenaeus chi-*

- nenis* and white shrimp *Litopenaeus vannamei* with river puffer *Takifugu obscurus* in shrimp ponds. *J Aquacult* 20, 278-288. <http://www.dbpia.co.kr/Article/760539>.
- Jang IK, Meng XH, Seo HC, Cho YR, Kim BR, Gopalakannan A and Kim JS. 2009. A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild bloodstocks and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 287, 40-45.
- Kim AR. 2014. Influence of bio-floc breeding water on common carp (*Cyprinus carpio*) and fish pathogenic bacteria. Master's Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Kim BR. 2010. Intensive culture of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, with activated suspension pond method (ASM). PhD Thesis, Jeju National University, Jeju, Korea.
- Liu CH, Chen JC. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* 16, 321-334. [http://dx.doi.org/10.1016/S1050-4648\(03\)00113](http://dx.doi.org/10.1016/S1050-4648(03)00113).
- Luo W, Xiayu D, Wentao Z and Daheng Z. 2012. Treatment of wastewater from shrimp farms using a combination of fish, photosynthetic bacteria, and vegetation. *DWT* 47, 221-227. <http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2012.696394>.
- Moriarty DJW. 1996. Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. *Infish Int* 4, 29-33.
- Moriarty DJW. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. 237-243. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Peterson BG, Booth BC and Manning BB. 2012. Replacement of fish meal in juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, diets using a yeast-derived protein source: the effects on weight gain, food conversion ratio, body composition and survival of catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*. *Aqua Nut* 18, 132-137. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00878>.
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191, 271-288. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00440-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00440-3).
- Rengpipat S, Tunyammun A, Fast AW, Piyatiratitivorakul S and Menasveta P. 2003. Enhanced growth and resistance to vibrio challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Dis Aquat Org* 55, 169-173. <http://dx.doi.org/10.3354/dao055169>.
- Ryan TN, Rachel FG and Edward W. 2004. Phototrophic utilization of taurine by the purple nonsulfur bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* 150, 1881-1891. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27023-0>.
- Saeed ZN, Mehran HR, Ghobad AT, Donad LL, Ali RM and Mehdi S. 2005. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252, 516-524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>.
- Uddin SA, Kaderl MA, Sikderl MNA, Hakim MA, Alam MM, Azad AH and Hasan CK. 2013. Study of probiotics on the seed production of black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Croatian J Fish* 71, 124-130.
- Vaseehran B and Ramasamy P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol* 36, 83-87. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01255>.
- Venkat HK, Sahu NP and Jain KK. 2004. Effect of feeding lactobacillus based probiotics on the gut micro flora, growth and survival of post larvae of *Macrobranchium reosenbergii* (De man). *Aquaculture Res* 35, 501-507. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01045>.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloss P and Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Molecul Biol Rev* 64, 655-671. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000>.
- Wang Y and Gu Q. 2010. Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. *Mar Biol Res* 6, 327-332. <http://dx.doi.org/10.1080/17451000903300893>.
- Wang Y. 2011. Use of probiotics *Bacillus coagulans*, *Rhodospseudomonas palustris* and *Lactobacillus acidophilus* as growth promoters in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fingerlings. *AN* 17, 372-378. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00771>.
- Yousefian M and Amiri MS. 2009. A review of the use of probiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African J Biotechnol* 8, 7313-7318.



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fai

Short communication

Growth performance and immunological and antioxidant status of Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis* reared in bio-floc culture system using probioticsMin-Su Kim^b, EunYoung Min^a, Jun-Hwan Kim^a, Ja-Keun Koo^b, Ju-Chan Kang^{a,*}^a Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Republic of Korea^b Incheon Fisheries Research Institute, Incheon 409-871, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 June 2015

Received in revised form

22 August 2015

Accepted 26 August 2015

Available online 2 September 2015

Keywords:

Bio-floc culture system

Fennerpenaeus chinensis

Immune response

Antioxidant ability

ABSTRACT

Chinese shrimp *Fennerpenaeus chinensis* (mean length 1.86 ± 0.15 cm, and weight 137.4 ± 12.7 mg) were reared in the different concentrations of bio-floc (control, 60, 80, 100, 120, and 140%) for 90 days. The growth rate was significantly increased over 100% bio-floc concentrations. In the immunological parameters, the gene expression of proPO and lysozyme was considerably increased over 120% bio-floc concentrations. The gene expression of SP was notably elevated at 140% bio-floc concentration. In the antioxidant enzymes, the activity of SOD was considerably decreased over 80% bio-floc concentrations. A notable decline in the activity of CAT was observed over 120% bio-floc concentrations. The results indicate that rearing of Chinese shrimp in bio-floc system can induce the increase of growth performance, enhancement of immune responses, and reduction of oxidative stress.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Shrimp aquaculture has been growing rapidly with the growth of aquaculture for decades [16]. But, shrimp aquaculture production is depressed by critical concerns such as pathogenic (white spot syndrome virus, taura syndrome virus, luminous *Vibrio harveyi*) and environmental problems (water quality issues) [7,23]. Bio-floc technology (BFT) is one of the most effective methods as a preventive measure against the problems, because it is the more environment friendly alternative in the condition of densely stocked ponds with limited water exchange [52]. Bio-floc system is a technology for the maintenance of water quality depending on a phytoplankton bloom, bacteria, organic aggregates, and microbial grazers [16], it can improve water quality by heterotrophic and control pathogenic bacteria in microbial community [11,1]. Bio-floc has advantage of a food source all day available, because it is more effective in animal growth than artificial feed [5,2] as well as enhanced animal health through the stimulation of immune system [27,50]. In bio-floc system, it is critical to add carbohydrates to the pond periodically to sustain a density of heterotrophic microbial in the floc for functioning properly, because a number of sugars

(carbohydrates) are essential to the growth and production of the microbes [12].

According to previous studies, there are a number of beneficial effects on the utilization of effective microorganisms (EM) in shrimp farming with controlling disease and environmental concerns [51]. Recently, EM such as *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. and *Rhodobacter* sp. have a lot of attention in laboratory and aquaculture field [42,51]. Rengpipat et al. [38] demonstrated that *Bacillus* S11 could be used as EM for the growth and health of Black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Several *Lactobacillus* spp. strains are used as EM in aquaculture due to metabolic benefits in host and suppression of *Escherichia coli* [19,35,20].

The immune and antioxidant systems in physiological role are critical to shrimp to control their health and satisfactory growth performance under the environmental stresses [55]. The inflammatory responses against external pathogens induce the immune stimulations and reactive oxygen species (ROS) production [44]. Antioxidant systems such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) are major enzymes to protect organisms against oxidative stress [32].

Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis*, is an economically major species largely cultured in Asia. But, the study about the bio-floc culture system using EM in Chinese shrimp has been insufficiently conducted. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of bio-floc culture system (BFCS) using EM on

* Corresponding author. Tel.: +82 51 5944; fax: +82 51 5938.
E-mail address: jkang@pknu.ac.kr (J.-C. Kang).

growth performance, immune response (proPO, lysozyme, and SP), and antioxidant ability (SOD and CAT) of the Chinese shrimp, *F. chinensis*.

2. Materials and methods

2.1. Experimental shrimp and conditions

Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) were obtained from Incheon Fisheries Research Institute, Incheon, Korea. The shrimp were acclimatized for 2 weeks under laboratory conditions. During the acclimation period, the shrimp were fed a commercial diet twice daily (Cargill Agri Purina, Inc., Korea) and maintained on a 12-h:12-h light/dark cycle and constant condition at all times (temperature: 24.5 ± 0.5 °C, pH: 8.0 ± 0.5 , salinity: 30.5 ± 1.0 ‰). After acclimatization, 180 shrimps (body length, 1.86 ± 0.15 cm; body weight, 137.4 ± 12.7 mg) were selected for the study, and randomly divided into 6–500 L circular tanks (30 shrimps per each concentration). Daily feeding rate was 3% of total body weight. The test was carried out for 90 days.

2.2. Bio-floc preparation

The probiotics used in this experiment, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. (EM Korea Co. Ltd., Korea) for the shrimp growth and *Rhodobacter* sp. (Doosan EcoBizNet Co., Ltd., Korea) for the water quality improvement were purchased to make bio-floc stock solution. Bio-floc stock solution was prepared as a mixture of these probiotics. The purchased EM and PB were cultured respectively for 14 days and 3 days to make the proper density of microbes (Table 1). After the cultivation, the EM and PB were mixed at the rate of ten to one. The concentration of each probiotics in bio-floc stock solution was determined as the initial concentration at 1×10^7 cfu ml⁻¹ before use. The 100% of bio-floc solution was defined as the diluted solution by adding bio-floc stock solution 1 L to 50 ton seawater. The bio-floc concentrations were control, 60, 80, 100, 120, and 140%. The tank water was thoroughly exchanged once per five days, and made the same bio-floc concentrations in the respective tank.

2.3. Growth

The weight and length of *Fenneropenaeus chinensis* was measured just before exposure and after 90 days. Growth rate of length and weight were calculated by the following method.

$$\text{Growth rate (\%)} = (W_f - W_i) / W_i \times 100$$

W_f = Final length or weight

W_i = Initial length or weight

2.4. Immunological response analysis

Total RNA was extracted from hepatopancreas samples using

RNA purification kit (Real Biotech Corporation, Taipei, Taiwan), and the quantity and quality of the total RNA were assessed using the Ultraspec 3100 pro (Amersham Bioscience, Amersham, UK). The 260/280 nm absorbance ratios of all samples ranged from 1.80 to 2.00, indicating a satisfactory purify of the RNA samples. Purified RNA was subjected to reverse transcription to cDNA by cDNA synthesis kit (Enzo Life Sciences Inc., NY, USA) according to the reagent's instructions. For real-time quantitative PCR analysis of MT gene expression, the real-time qPCR primer of proPO, LYS, SP, and β -actin genes are shown in Table 2.

Real-time PCR assay were carried out in a quantitative thermal cycler (LightCycler® 480 II, Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland) in a final volume of 20 μ l containing 10 μ l 2 \times Master Mix (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland), 1 μ l of cDNA mix. Gene-specific primers were applied to evaluate the mRNA levels of specific genes in hepatopancreas. Reference β -actin gene was used as internal control. The real-time qPCR amplification began with 5 min at 95 °C, followed by 45 cycles of denaturation of 10 s at 95 °C, annealing of 10 s at 60 °C, and extension of 10 s 72 °C. To analyze the mRNA expression level, the comparative CT methods ($2^{-\Delta\Delta CT}$ method) was used.

2.5. Antioxidant enzyme analysis

Hepatopancreas tissues were excised and homogenized with 10 volumes of ice-cold homogenization buffer using Teflon-glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany). The homogenate was centrifuged at 10,000 g for 30 min under refrigeration and the obtained supernatants were stored at -80 °C for analysis.

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured with 50% inhibitor rate about the reduction reaction of WST-1 using SOD Assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc.). One unit of SOD is defined as the amount of the enzyme in 20 μ l of sample solution that inhibits the reduction reaction of WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) with superoxide anion by 50%. SOD activity was expressed as unit mg protein⁻¹.

The catalase (CAT) activity was measured using the OxiSelect™ Catalase Assay Kit (Cell Biolabs, Inc.). The quinoneimine dye coupling product is measured at 520 nm, which correlated to the amount of hydrogen peroxide remaining in the reaction mixture. The CAT activity was expressed as unit/mg protein and one unit of CAT is the amount of enzyme that will decompose 1 μ M of H₂O₂ per minute at 25 °C.

2.6. Statistical analysis

The experiment was conducted in breeding period for 90 days and performed triplicate. Statistical analyses were performed using the SPSS/PC + statistical package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Significant differences between groups were identified using one-way ANOVA and Duncan's test for multiple comparisons or Student's *t*-test for two groups. The significance level was set at $P < 0.05$.

Table 1
Composition of stock solution in the bio-floc culture systems.

Component	Composition	Culture condition	Culture period
EM (Effective microorganisms)	<i>Bacillus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.	Seawater (580 L) + Freshwater (380 L) + Molasses (20 L) + EM (20 L)	14 days
PB (Photosynthetic bacteria)	<i>Rhodobacter</i> sp.	Seawater (99.4 L) + Vitamin (0.1 L) + PB (0.5 L)	3 days

Table 2
Sequence of primers used in this experiment.

Primer		Sequence (5' to 3')
prophenoloxidase	Forward	GAT ATC CTC GGC GAT GTG T
	Reverse	AGG GTC ATG CGA GAA AGC T
Lysozyme	Forward	GTA ACA AAC GCC ACC TGG A
	Reverse	CCG TGC CAG GCT GTA TAT C
Serine protease	Forward	TAT GTC GCG GAT CCC TTA T
	Reverse	GCT GAT AGT CCC CAA GAC G
β -actin	Forward	CGA GGT ATC CTC ACC CTG A
	Reverse	CGG AGC TCG TTG TAG AAG G

3. Results

3.1. Growth performance

The growth rate of *Fenneropenaeus chinensis* in the bio-floc culture system (BFCS) was significantly increased for 90 days (Fig. 1). In weight growth rate, the considerable elevation was observed over 80% bio-floc concentrations compared to the control, and the highest rate was at 120% bio-floc concentration. The values of weight growth rate (%) were 5417 ± 589 , 6322 ± 477 , 7416 ± 1169 , 8546 ± 1247 , $12,524 \pm 603$, 9605 ± 1660 at control, 60, 80, 100, 120, and 140% bio-floc concentrations. In length growth rate, the notable increase was shown over 100% bio-floc concentrations, and the highest rate was at 120% bio-floc concentration ($P < 0.05$). The values of length growth rate (%) were 483 ± 76 , 512 ± 98 , 538 ± 78 , 647 ± 36 , 869 ± 66 , 664 ± 51 at control, 60, 80, 100, 120, and 140% bio-floc concentrations.

3.2. Immunological response

The relative mRNA expressions of proPhenoloxidase (proPO), lysozyme, and serine proteinase (SP) in hepatopancreas of *Fenneropenaeus chinensis* were demonstrated in Fig. 2. The gene expression of proPO was significantly increased over 120% bio-floc concentrations, compared to the control. In the gene expression of lysozyme, a considerable increase was observed over 120% bio-floc concentrations. The gene expression of SP was significantly elevated at 140% bio-floc concentration.

3.3. Antioxidant enzymes

The antioxidant enzymes of hepatopancreas in *Fenneropenaeus*

chinensis was shown in Fig. 3. The activity of SOD was considerably decreased over 80% bio-floc concentrations, compared to the control. The activity of CAT was notably decreased over 120% bio-floc concentrations.

4. Discussion

Bio-floc naturally forms in pond water as aggregates of nitrifying bacteria, organic materials, inorganic flocculants, and suspended algae. Bio-floc technology (BFT) has been applied in shrimp farming [6]. However, there are few challenges to apply the technology to commercial shrimp farms because of external environmental factors. For instance, high level of solar energy and intensity can induce the over productivity of microalgae, which cause oxygen exhaustion and water quality problems in open farms [10,33].

A number of studies have demonstrated that the bio-floc system application in shrimp aquaculture can improve their survival and growth performance [29,39,40,3,11,28]. In addition, bio-floc system enhance feed utilization of shrimp by supplementing essential nutrients such as minerals, vitamins, and lipids and stimulating digestive enzyme activities [30,4,31,16,53]. In this study, biofloc culture system (BFCS) using EM has effects on the growth performance of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, which result from the enhanced shrimp health by increasing immune responses and antioxidant abilities. Many authors reported a significant increase in growth performance of cultured shrimp using bio-floc system [2,13].

Bio-floc system functions as immunostimulation to enhance the shrimp innate immunity, thereby improving their resistance to pathogens [54,15], which is an alternative strategy to defend them against pathogens [41]. Bio-floc system using EM enables

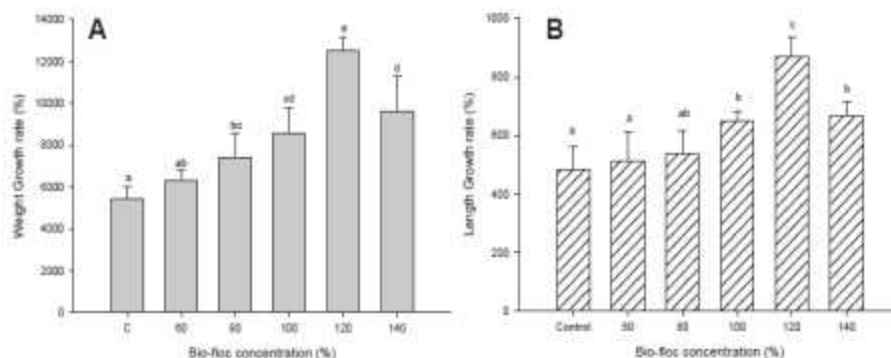


Fig. 1. Growth rate of weight (A) and length (B) in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* reared in the different concentrations of bio-floc for 90 days. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

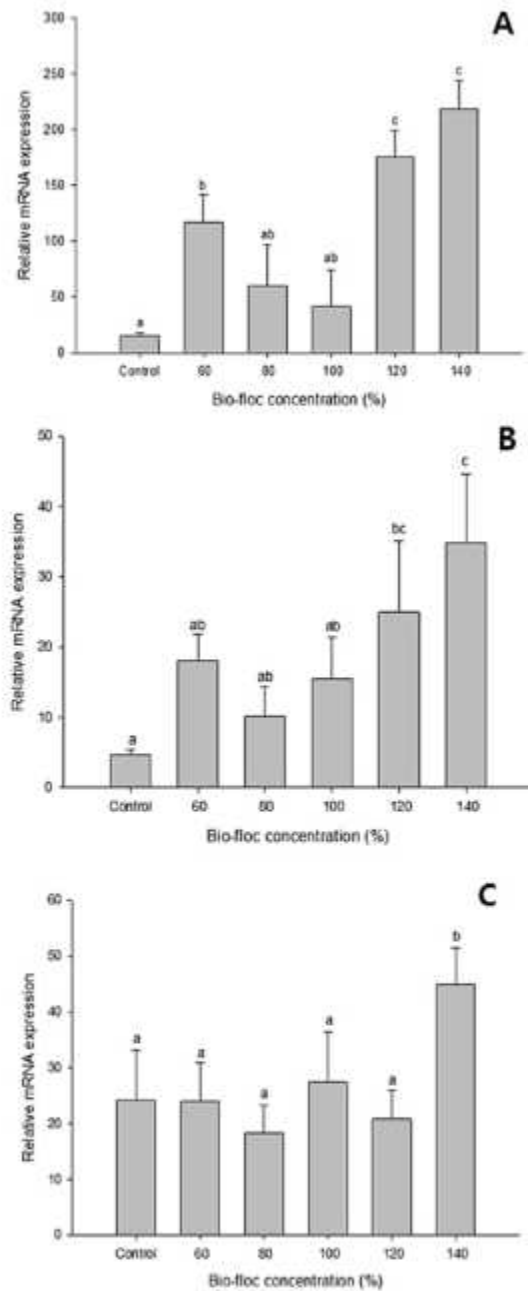


Fig. 2. Relative mRNA expression of proPhenoloxidase (A), lysozyme (B) and serine proteinase (C) of hepatopancreas in Chinese shrimp, *Fenempenarus chinensis* reared in the different concentrations of bio-floc for 90 days. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

to provide more effective non-specific protection than vaccination as a result of the enhancement in serological immunity [45].

In non-specific immune system, prophenoloxidase (proPO) is

one of the major components in shrimp humoral response, which is triggered by bacterial cell wall such as peptidoglycans, lipopolysaccharides, and β -glucans [36,17]. In shrimp, proPO is essential to defense against microbial pathogens such as *Vibrio* sp. [56]. In this study, the mRNA gene expression of proPO in Chinese shrimp, *F. chinensis* was significantly increased in bio-floc system using EM, which results from the regulation in phenoloxidase activation systems. Kim et al. [24] also reported that a significant proPO increase of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in bio-floc system. Lysozyme is a major antibacterial protein, which is well known as a component of the innate immune system in invertebrates. Lysozyme activity can be altered by health condition, stress, sex, temperature, and toxic substances [43]. In the present study, the lysozyme activity in Chinese shrimp, *F. chinensis* was considerably increased in the bio-floc system using EM, which is considered to involve an enhancement of antibacterial activity. Taoka et al. [47] reported a notable increase in lysozyme activity of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* treated with EM. Serine proteinase (SP) functions as an essential role in converting the inactive proPO into its active form of PO. Bio-floc system induced a significant increase in the gene expression of SP of Chinese shrimp, *F. chinensis* in this study. Rattanachai et al. [37] reported a marked increase in the mRNA gene expression of SP of Kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* by immune response for peptidoglycan. These results suggest that the bio-floc system using EM may contribute to improve the immunity such as proPO, lysozyme, and SP of Chinese shrimp, *F. chinensis*, considering the genes are known to be associated with the non-specific immune responses in shrimp [8,18,25,21].

Bio-floc system also influences the physiological health of cultured shrimp particularly in antioxidant defense systems [54]. The antioxidant defense systems are closely related with immune system [22,34], and it is recognized as a critical component to maintain the balance of reactive oxygen species (ROS) in shrimp [9]. EM can affect a reduction of ROS and enhancement of defense mechanisms against oxidative stress [26]. Superoxide dismutase (SOD) is one of the most important antioxidant enzymes, which is preventing the formation of lipid peroxidation by catalyzing the disproportionation of the lipid peroxidation initiator [46]. Tseng et al. [49] suggest that SOD activity is closely related to the immunity of shrimp. In this study, the activity of SOD in Chinese shrimp, *F. chinensis* was considerably decreased in bio-floc system using EM. Dandapat et al. [14] reported a notable decrease in the SOD activity of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* by dietary vitamin E, which result from the decreased formation of H_2O_2 . Catalase (CAT) is also an antioxidant enzyme in shrimp that acts as a critical role to protect organisms against oxidative stress by decomposing hydrogen peroxide [48]. The activity of CAT in Chinese shrimp, *F. chinensis* was significantly decreased in bio-floc system using EM. Castex et al. [9] reported the decreased CAT activity of Pacific blue shrimp, *Litopenaeus stylirostris* by EM supplement, which may cause lower free radical generation. In this study, the antioxidant enzymes of Chinese shrimp, *F. chinensis* such as SOD and CAT was notably decreased in bio-floc system using EM, which suggest that the system may influence the reduction of ROS.

In conclusion, this work demonstrated that bio-floc system substantially affects the experimental shrimp, *F. chinensis*. The growth performance of Chinese shrimp, *F. chinensis* was considerably increased. The immune responses (proPO, lysozyme, and SP) were significantly increased, whereas the antioxidant enzymes (SOD and CAT) were notably decreased. Considering these results, bio-floc system using EM should positively affect the experimental shrimp, Chinese shrimp, *F. chinensis*.



Fig. 3. Activities of SOD (A) and catalase (B) of hepatopancreas in Chinese shrimp, *Farfantepenaeus chinensis* reared in the different concentrations of bio-floc for 90 days. Values with different superscript are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

Acknowledgments

This research was a part of the project titled 'The development research of standard process and production of the shrimp in static seawater farm utilizing bio-floc system', funded by the Ministry of Oceans and Fisheries, Korea (Project code no. 20120332).

References

- 1] M. Asadzaman, M.A. Wahab, M.C.J. Verdegem, S. Hoque, M.A. Salam, M.E. Azim, C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds, *Aquaculture* 280 (2008) 117–123.
- 2] V. Avnimelech, Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge biofloc technology ponds, *Aquaculture* 264 (2007) 140–147.
- 3] M.E. Azim, D.C. Little, The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquaculture* 283 (2008) 29–35.
- 4] E.L.C. Ballester, P.C. Abreu, R.O. Cavalli, M. Emerenciano, L. Abreu, W. Wasielesky, Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulseni* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system, *Aquac. Nutr.* 16 (2010) 163–172.
- 5] C.L. Browdy, D. Bratvold, A.D. Stokes, R.P. Mcintosh, Perspectives on the application of closed shrimp culture systems, in: E.D. Jory, C.L. Browdy (Eds.), *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture*, The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 2001, pp. 20–34.
- 6] M.A. Burford, P.J. Thompson, P.R. McIntosh, R.H. Bauman, D.C. Pearson, The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system, *Aquaculture* 232 (2004) 525–537.
- 7] M.G. Bondad-Reantaso, E.R. Lovell, J.R. Arthur, D. Hurwood, P.B. Mather, Pathogen and Ecological Risk Analysis for the Introduction of Blue Shrimp *Litopenaeus stylirostris* form Brunei Darussalam to Fiji, *SPC Aquaculture Technical Papers*, Secretariat of the Pacific Community, Aquaculture Section, Noumea Cedex, New Caledonia, August 2004, 2005, p. 80.
- 8] E.J. Burge, D.J. Madigan, L.E. Burnett, K.G. Burnett, Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*, *Fish. Shellfish Immunol.* 22 (2007) 327–339.
- 9] M. Castes, P. Lesautre, N. Wabete, L. Chin, Effect of probiotic *Pedobacterus acitlasticus* on antioxidant defense and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge, *Fish. Shellfish Immunol.* 28 (2010) 622–631.
- 10] G. Chamberlain, Y. Avnimelech, R.P. McIntosh, M. Velasco, Advantages of aerated microbial reuse systems with balanced C/N, in: *Nutrient Transformation and Water Quality Benefits: Global Aquaculture Alliance Advocate* 4, 2001, pp. 53–56.
- 11] J. Cohen, T.M. Samocha, J.M. Fox, A.L. Lawrence, Biosecured production of juvenile Pacific white shrimp in an intensive recirculation system with limited water discharge, *Aquac. Eng.* 32 (2005) 425–442.
- 12] R. Crab, M. Kochwa, W. Verstraete, Y. Avnimelech, Bio-floc technology application in over-wintering of tilapia, *Aquac. Eng.* 40 (2009) 105–112.
- 13] R. Crab, A. Lambert, T. Defoerde, P. Bossier, W. Verstraete, The application of biofloc technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio* harvest, *J. Appl. Micro* 109 (2010) 1643–1646.
- 14] J. Dandapat, G.B. Chaitry, K.J. Rao, Dietary vitamin-E modulates antioxidant defense system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, *Comp. Biochem. Physiol.* 127 (2000) 101–115.
- 15] J. Ekasari, M.H. Azhar, E.H. Sorawidjaja, S. Nuryati, P.D. Schryver, P. Bossier, Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources, *Fish. Shellfish Immunol.* 41 (2014) 332–339.
- 16] M. Emerenciano, E.L.C. Ballester, R.O. Cavalli, W. Wasielesky, Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817), *Aquac. Res.* 43 (2012) 447–457.
- 17] F.F. Fagutan, H. Kondo, T. Aoki, I. Hirono, Prophenoloxidase has a role in innate immunity in penaeid shrimp, *Dis. Asian Aquac.* (2011) 171–176.
- 18] V.A. Francisco, Y.P. Gloria, Beta-glucan binding protein and its role in shrimp immune response, *Aquaculture* 191 (2000) 13–21.
- 19] S.E. Gilliland, R.B. Bruce, L.J. Bush, T.E. Stanley, Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves, *J. Dairy Sci.* 63 (1980) 964–972, [http://dx.doi.org/10.3168/jds.00022-0302\(80\)83033-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.00022-0302(80)83033-5).
- 20] S.E. Gilliland, C.R. Nelson, C. Maxwell, Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 377–381.
- 21] F. Han, X. Zhang, Characterization of a ran-related nuclear protein (Ran protein) up-regulated in shrimp antiviral immunity, *Fish. Shellfish Immunol.* 23 (2007) 937–944.
- 22] T. Holmblad, K. Söderhäll, Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity, *Aquaculture* 172 (1999) 111–123.
- 23] A. Irianto, B. Austin, Probiotics in aquaculture, *J. Fish. Dis.* 25 (2002) 633–642.
- 24] S.K. Kim, Z. Pang, H.C. Seo, Y.B. Cho, T. Samocha, I.K. Jang, Effect of biofloc on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae, *Aqua Res.* 45 (2014) 362–371.
- 25] K.Y. Lee, R. Zhang, M.S. Kim, J.W. Park, H.Y. Park, S.J. Kawabata, A zymogen form of mannanase like serine proteinase homologue is cleaved during prophenoloxidase activation by Ca^{2+} in coleopteran and coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 4375–4383.
- 26] F. Lutjendurff, L.M. Trulsson, P. Minnes, G.T. Rijkers, H.M. Timmerman, L.E. Franzén, H.G. Goosen, L.M.A. Akkermans, J.D. Söderholm, P.A. Sandström, Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis, *Am. J. Physiol.* 295 (2008) G1111–G1121.
- 27] S. Marlow, K.A. Kumar, R. Anandan, N.P.G. Viswanathan, K. Devadasan, Changes in tissue defense system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*, *Comp. Biochem. Physiol.* 145 (3) (2007) 315–320.
- 28] J.K. Mishra, T.M. Samocha, S. Patnaik, M. Speed, R.L. Gandy, A. Ali, Performance of an intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, under limited discharge condition, *Aquac. Eng.* 38 (2008) 2–15.
- 29] S.M. Moss, G.D. Pruder, Characterization of organic particles associated with rapid growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), reared under intensive culture conditions, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 187 (1995) 175–191.
- 30] S.M. Moss, S. Divakaran, B.G. Kim, Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), *Aqua Res.* 32 (2001) 125–131.
- 31] S.M. Moss, I.P. Forster, A.G. Tacon, Sparing effect of pond water on vitamins in shrimp diets, *Aquaculture* 258 (2006) 388–395.
- 32] D.P. Parrilla-Taylor, T. Zenteno-Savin, F.J. Magalón-Barajas, Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus, *Aquaculture* 380–383 (2013) 41–46.
- 33] C.I. Perez-Rostro, J.A. Pérez-Fuentes, M.P. Hernández-Vergara, Biofloc, a technical alternative for culturing Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii*, *Intech* 1 (2014) 87–104.

- [34] P. Rameshthangam, P. Ramasamy, Antioxidant and membrane bound enzymes activity in WSSV-infected *Penaeus monodon* Fabricius, *Aquaculture* 254 (2006) 32–39.
- [35] B. Ratcliffe, C.B. Cole, R. Fuller, M.J. Newport, The effect of yogurt and milk fermented with a porcine intestinal strain of *Lactobacillus reuteri* on the performance and gastrointestinal flora of pigs weaned at two days of age, *Food Microbiol.* 3 (1986) 203–211.
- [36] X.J. Rao, E. Ling, X.Q. Yu, The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta*: an in vitro approach, *Dev. Comp. Immunol.* 34 (2010) 264–271.
- [37] A. Rattasachai, I. Hirono, T. Ohira, Y. Takahashi, T. Aoki, Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Macrobrachium japonicum*), *Fish. Shellfish Immunol.* 18 (2005) 39–48.
- [38] S. Rengpipat, W. Phanphak, S. Pyatirattivorakul, P. Menasaveta, Effects of a probiotic bacterium in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth, *Aquaculture* 167 (1998) 301–313.
- [39] S. Rengpipat, S. Kukgratanporn, S. Pyatirattivorakul, P. Menasaveta, Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiotic bacterium (*Bacillus* 511), *Aquaculture* 191 (2000) 271–288.
- [40] S. Rengpipat, A. Tanyamum, A.W. Fast, S. Pyatirattivorakul, P. Menasaveta, Enhanced growth and resistance to vibrio challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic, *Dis. Aquat. Org.* 55 (2003) 169–173, <http://dx.doi.org/10.3354/dao055169>.
- [41] J. Rodriguez, G. Le Moullac, State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp, *Aquaculture* 191 (2000) 109–119.
- [42] T.N. Ryan, F.G. Rachel, W. Edward, Phototrophic utilization of taurine by the purple non-sulfur bacteria, *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodospirillum rubrum*, *Microbiology* 150 (2004) 1881–1891.
- [43] S. Saurabh, P.K. Sahoo, Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system, *Aquat. Res.* 39 (2008) 223–239.
- [44] I.M. Sokolova, Apoptosis in molluscan immune defense, *ISJ* 6 (2009) 49–58.
- [45] H.H. Sung, Y.L. Yang, Y.L. Song, Enhancement of microbial activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation, *J. Crustac. Biol.* 16 (1996) 278–284.
- [46] Y.X. Tao, L.Q. Pan, H. Zhang, S.M. Tian, Assessment of the toxicity of organochloride pesticide endosulfan in clams *Ruditapes philippinarum*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93 (2013) 22–30.
- [47] Y. Taoka, H. Maeda, J.Y. Jo, M.J. Jeon, S.C. Bai, W.J. Lee, Growth, stress tolerance and non-specific immune responses of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system, *Fish. Sci.* 72 (2008) 310–321.
- [48] D.L. Tavares-Sanchez, G.A. Gomez-Anduro, X. Felipe-Ortega, M.A. Islas-Osuna, R.R. Sotelo-Mundo, C. Barillas-Mury, G. Yepiz-Plascencia, Catalase from the white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*: molecular cloning and protein detection, *Comp. Biochem. Physiol.* 138 (2004) 331–337.
- [49] D.Y. Tseng, P.L. Ho, S.Y. Huang, S.C. Cheng, Y.L. Shiu, C.S. Chiu, C.H. Lin, Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, *Fish. Shellfish Immunol.* 26 (2009) 339–344.
- [50] L. Vazquez, J. Alpaache, G. Maldonado, C. Agudelo, Z.E. Penya-morales, Immunity mechanisms in crustaceans, *Innate Immun.* 15 (2009) 179–188.
- [51] F.N. Vieira, E.S. Pedrotti, C.C. Buglione, J.L.P. Mourino, E. Beltrame, M.L. Martins, C. Ramirez, L.A. Vinuesa, Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio* *harveyi*, *Braz. J. Oceanogr.* 55 (2007) 251–255.
- [52] Y.B. Wang, Z.R. Xu, Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities, *Anim. Feed Sci. Technol.* 127 (2006) 203–207.
- [53] W.J. Xu, L.Q. Pan, Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed, *Aquaculture* 356–357 (2012) 147–152.
- [54] W.J. Xu, L.Q. Pan, Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input, *Aquaculture* 412–413 (2013) 117–124.
- [55] W.J. Xu, L.Q. Pan, Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks, *Aquaculture* 426–427 (2014) 181–188.
- [56] M.S. Yeh, C.Y. Lai, C.H. Liu, C.M. Kuo, W. Cheng, A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection molt stage, and oral sodium alginate ingestion, *Fish. Shellfish Immunol.* 26 (2009) 49–55.