

멍게의 물렁증 발생에 미치는 용존산소의 영향

신윤경* · 박정준 · 전제천 · 명정인 · 양성진

국립수산과학원 양식관리과

Effect of Dissolved Oxygen on Occurrence of Tunic Softness Syndrome in Sea Squirt *Halocynthia roretzi*, Tongyeong, South Coast of Korea

Yun Kyung Shin, Jung Jun Park, Je Cheon Jun, Jeong-In Myeong and Sung Jin Yang

Aquaculture Management Division, Aquaculture Research Institute, NFRDI,
Busan 619-902, Korea

Abstract - This study analyzed the occurrence of tunic softness, survival rate, metabolic rate and histopathologic changes arising from the effect of hypoxic environment in order to find the causes of occurrences of tunic softness, which manifests as the key phenomenon of mass mortality of *Halocynthia roretzi*. Regarding the survival of *H. roretzi* with reduction in dissolved oxygen, all the entities died on the 4th day of exposure to the dissolved oxygen concentration of 2 mg L⁻¹ while 50% mortality was observed on the 5th day of exposure to the dissolved oxygen concentration of 3 mg L⁻¹. Therefore the 5 days-LC₅₀ was found to be 3.55 mg L⁻¹ (1.86 ~ 4.96 mg L⁻¹). However, occurrence of tunic softness was not observed during the period of exposure to low oxygen concentration. The oxygen consumption rate significantly decreases at the dissolved oxygen concentration of less than 5 mg L⁻¹ in comparison to the control group. Therefore, it is presumed that *H. roretzi* controls the respiration rate for prescribed period of time when exposed to hypoxic environment. Regarding the histopathologic changes in the gill, digestive gland and cyst of *H. roretzi* due to hypoxic environment, necrosis of epithelial layer, in filtration of blood cells, and condensation of nucleus that compose each of the organs were observed. Regarding morphological changes, the decrease in volume with shrinking of the tunic, discoloration of the internal organs and necrosis of gill and hepatopancreas were observed.

Key words : *Halocynthia roretzi*, hypoxic environment, tunic softness, mortality

서 론

멍게 sea squirt, *Halocynthia roretzi* (Drasche)는 우리나라의 전 연안에 분포하며 주로 남해안의 통영지역을 중

심으로 많이 양식되고 있다. 멍게생산량은 1990년 연간 20,000톤 이상을 기록한 후, 2000년 이후 해마다 7,000 ~ 8,000톤 정도를 나타내고 있는 실정이다. 반면 멍게 폐사는 2008년 80.4%, 2009년 67.5% 그리고 2012년에는 여름철 고수온 및 빈산소에 의해 멍게의 종묘 및 성체 70% 이상이 폐사한 것으로 추정하고 있으며, 피해금액은 약 200억 원 이상으로 추정되고 있다. 멍게의 대량

* Corresponding author: Yun Kyung Shin, Tel. 051-720-2421,
Fax. 051-720-2439, E-mail. yunkshin@korea.kr

폐사원인은 피낭이 연화되는 현상인 물렁증으로 추정되고 있으며, 최근 물렁증 발생 원인은 편모충, *Azumibodo hoyamusi* (Shin *et al.* 2011)과 미생물 (Kim *et al.* 2012) 등으로 밝혀지고 있다.

멍게에 관한 연구는 주로 양식기술개발에 관하여 보고되고 있으며, 형태변화 및 발생 (Hirai 1941, 1965), 유생의 부화율과 변태 (Yoo *et al.* 1990), 초기 성장 (Jang 1979), 성장 (Yoo *et al.* 1988) 등이 있다. 생태생리에 관한 연구는 중금속 축적 (Kim *et al.* 2001), 염분의 영향 (Shin *et al.* 2006), 에너지수지 (Jiang *et al.* 2008; Shin *et al.* 2011), 일주리듬 (Ryland 1990) 및 먹이 흡수효율 (Armsworthy *et al.* 2001) 등 단편적으로 보고되고 있으며, 대량폐사를 일으키는 물렁증에 관한 연구는 일본에서 동일종의 멍게에 관한 물렁증 발생에 관한 연구 (Kumagai *et al.* 2010, 2011)가 보고되고 있으며, 우리나라에서는 멍게 혈구에서 발견되는 기생충 (Choi *et al.* 2006), 피낭에서 발생하여 물렁증을 유발시키는 기생충 (Shin *et al.* 2011)과 미생물 (Kim *et al.* 2012) 등에 관한 보고가 있다.

일반적으로 수온, 염분, 용존산소 등 해양 환경의 요인들은 연안에 서식하고 있는 양식 생물의 생리적 과정에 영향을 미친다 (Bohle 1972; Widdows 1985). 용존산소는 수서생물의 다양한 생리적 과정에 영향을 미치는 가장 주요한 환경요인 중 하나로서, 저산소는 생물의 행동과 호흡, 순환, 섭이, 대사 및 성장 등과 같은 정상적인 생리적 과정에 영향을 미친다 (Aquacop and Soyez 1988). 저산소에 대한 수서생물의 반응은 대사를 감소 (Hill *et al.* 1971), 혈림프내 산-염기 균형, 헤모시아닌 결합능, 산화 헤모시아닌 단백질, 혈림프 삼투질 농도 및 이온 농도 등의 변화가 나타난다 (Maruo and Malecha 1984). 수서생물이 저산소 환경에 직면하면 아가미표면적을 증대시켜 과호흡을 하게 되고, 이로 인해 이산화탄소 배출이 증가하여 혈림프내 CO₂량은 감소하고 이는 혈액내 pH를 증가시키는 결과를 초래하고 (Morris and Bulter 1996), 이로 인한 생리적 불균형으로 결국 죽음을 초래하게 된다.

멍게 양식장은 주로 남해안의 내만에 위치하고 있으며, 굴, 담치 등이 양식되고 있는 지역에 밀집해 있으며, 양식시설이 바닥과 가까이 있어 여름철 양식장 바닥의 토양에 의한 오염과 냉수대의 잦은 출현으로 저산소에 노출될 경우가 많으며, 이로 인해 물렁증이 발생하는지에 관한 보고는 없다.

본 연구는 멍게 대량폐사의 주요 현상으로 나타나고 있는 물렁증 발생의 원인을 찾기 위하여 저산소의 영향에 의한 물렁증 발생, 생존률, 대사를 및 병리조직학적 변화를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에 사용된 멍게는 2012년 1월부터 10월 동안 경남 통영시 영운지선 멍게양식장에서 양성중인 멍게를 직접 채취하여 실험실로 운반한 후, 유수식 5 m³ 사육수조에 수용하여 일주일간 순치 시킨 후 실험에 사용하였다. 순치기간 중 먹이는 매일 2회씩 시판중인 복합규조류를 공급하였다. 수온은 실험기간 동안 실온 (13±1°C)을 유지하였으며, 염분 33.5±0.5 psu, 용존산소 7.7±0.5 mg L⁻¹을 유지하였다. 각 실험에 사용된 멍게는 순치중인 건강한 개체를 선별하여 각 실험구별 20마리씩 수용하여 실험에 사용하였으며, 3회 반복하여 평균값을 결과로 처리하였다. 실험에 사용한 개체의 평균 체고 72.10±7.08 mm, 평균 체폭 42.81±6.38 mm, 평균 전중량 73.69±16.12 g였다.

2. 실험 방법

수중의 용존산소 농도 감소에 따른 멍게의 생존율 및 물렁증 발생을 조사하기 위해 수온 12±0.5°C에서 용존산소 농도 2, 3, 4, 5 mg L⁻¹ 및 대조구 (염분 33.5±0.5 psu, 9 mg L⁻¹)에서 수행하였다. 실험은 지수식 및 순환 여과식으로 행하였으며, 실험용액은 여과해수 (φ 1.0 μm)를 사용하였으며, 용존산소 농도는 N₂가스를 주입하여 실험농도로 조절하였으며, 실험용액의 농도를 일정하게 유지하기 위하여 12시간 간격으로 환수하였다. 실험기간 동안 수질의 악화를 피하기 위하여 먹이공급은 중단하였다. 생존율은 12시간 간격으로 냄새를 맡거나 수관부의 수축반응 등을 통해 파악하였으며, 반응이 없을 시 죽은 것으로 간주하였다. 물렁증 발생 여부는 냄새, 수관부의 수축반응, 피낭의 연화상태, 피낭돌기의 탄력 및 피낭색을 관찰하여 물렁증 발생을 분석하였다. 용존산소 농도에 따른 멍게의 생리적 반응을 조사하기 위하여 산소소비율, 암모니아질소배설률 및 조직학적 분석을 수행하였다. 산소소비율은 Shin *et al.* (2011)의 방법에 따라 1.0 L의 respirometer chamber와 생물호흡측정기 (Orbis 3600 made by Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 암모니아질소배설률은 산소소비율 측정과 동시에 수행하였으며, respirometer chamber에서 용액 2 mL을 채수하여 phenol-hypochlorite (Solorzano 1969)의 방법을 이용하였다. 조직학적 분석은 새낭, 소화선 및 피낭을 적출하여 실시하였다. 광학현미경 표본제작은 시료를 Bouin 용액

에 24시간 동안 고정하여 파라핀절편법으로 5 μm 두께로 연속절편 후 Mayer's Hematoxylin-eosin (H-E) 염색과 Alcian blue-periodic acid and Schiff's solution (AB-PAS, pH 2.5) 반응을 실시하였다.

실험동물의 용존산소에 대한 반수치사 농도 (LC_{50})는

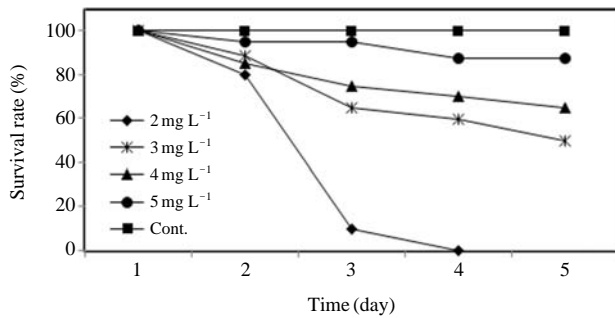


Fig. 1. Survival rate of sea squirt *Halocynthia roretze* with decrease of dissolved oxygen concentration.

probit법에 의해 분석 (Finney 1971) 하였으며, 자료 분석에 사용한 통계처리는 SPSS-통계패키지를 이용하여 ANOVA 및 Duncan's multiple range에 의해 판정하였다.

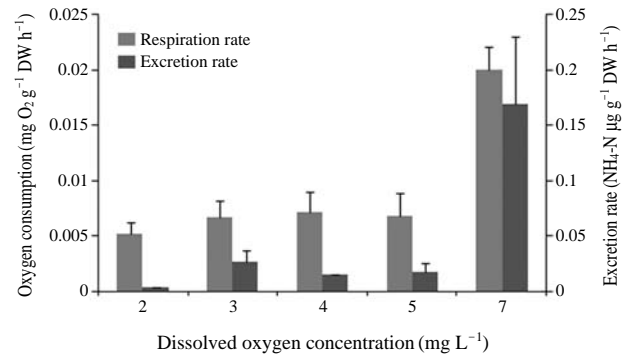


Fig. 2. Changes of oxygen consumption and ammonia excretion rate of sea squirt *Halocynthia roretze* with decrease of dissolved oxygen concentration.

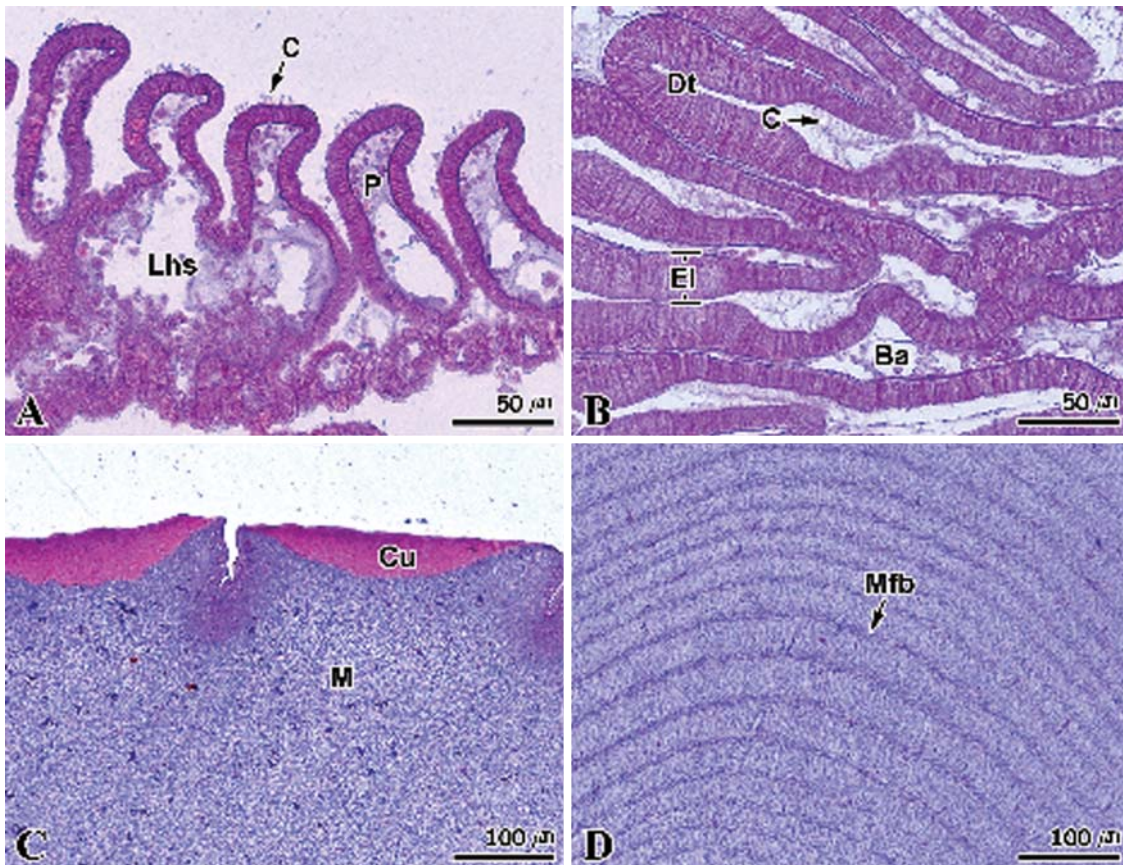


Fig. 3. Histological characteristics of sea squirt *Halocynthia roretze*. A: Stigmata, B: Digestive gland, C-D: Tunic. Ba, blind ampulla; C, cilia; Cu, cuticle; Dt, digestive tubule; El, epithelial layer; Lhs, longitudinal hemolymph sinus; M, matrix; Mfb, microfiber bundle; P, papillae.

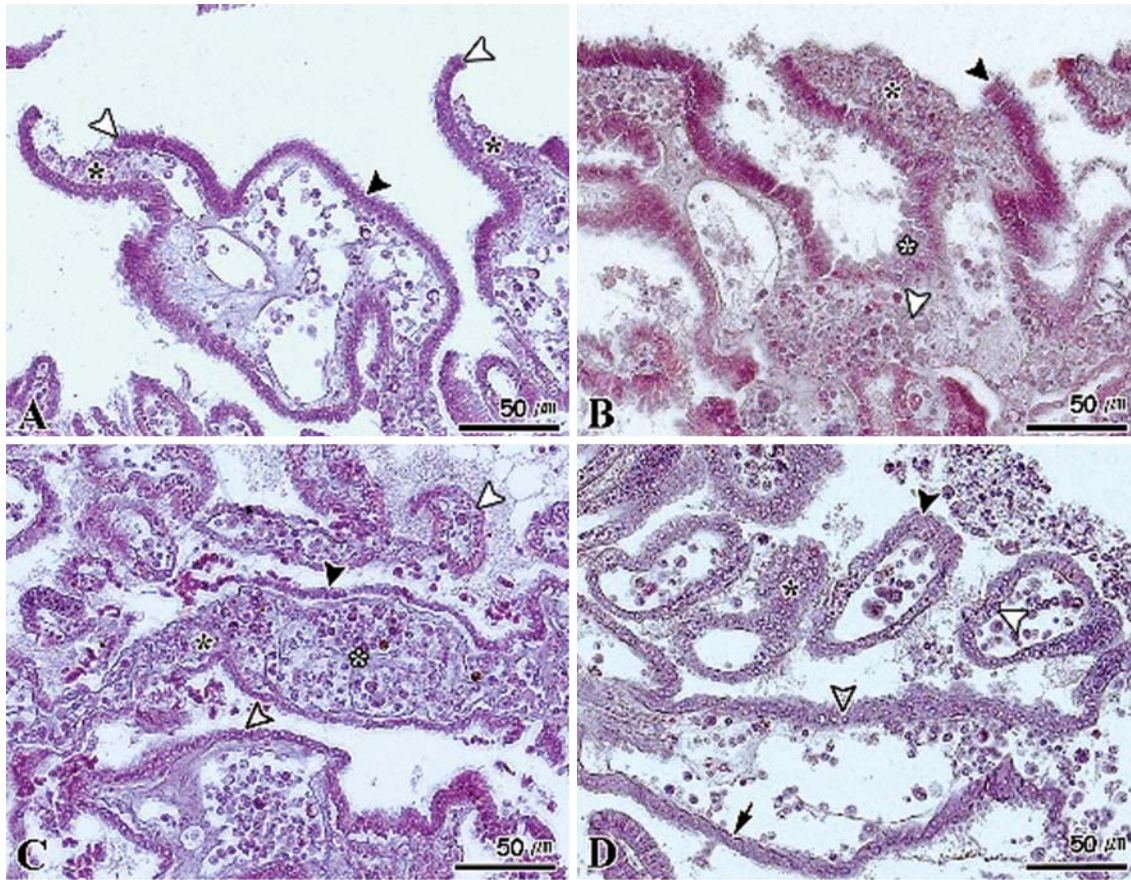


Fig. 4. Histopathological feature of stigmata in sea squirt *Halocynthia roretzi* by the effect of dissolved oxygen. A: 2 mg L^{-1} , showing the condense of nucleus (black arrowhead), epidermal layer destruction (white arrowhead), necrotic papillae (asterisk). B: 3 mg L^{-1} , showing the epidermal layer destruction (black arrowhead), phagocytes infiltration (white arrowhead), necrotic papillae (black asterisk), necrotic epithelial cells (white asterisk). C: 4 mg L^{-1} , showing the necrotic epithelial cells (black arrowhead), condense of nucleus (white arrowhead), hypertrophy of epithelial cells (open asterisk), necrotic papillae (black asterisk), phagocytes and blood cells infiltration (white asterisk). D: 5 mg L^{-1} , showing the deformation of epithelial cells (black arrowhead), necrotic epithelial cells (white arrowhead), hypertrophy of nucleus (open asterisk), hyperplasia of epithelial cells (asterisk).

결 과

수중 내 용존산소의 감소에 따른 멧게의 생존율은 용존산소 농도 2 mg L^{-1} 에서 노출 2일째부터 급격히 감소하기 시작하여 노출 4일째 모두 폐사하였으며, 3 mg L^{-1} 에서 노출 5일째 50%를 나타내어 5일 동안의 반수치사 용존산소 농도 (5 days- LC_{50})는 3.55 mg L^{-1} ($1.86 \sim 4.96 \text{ mg L}^{-1}$)였다 (Fig. 1).

용존산소 감소에 따른 멧게의 산소소비율과 암모니아 질소배설률의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 멧게의 산소소비율은 대조구 (9 mg L^{-1})에서 $0.02 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW hr}^{-1}$ 이었으나, 용존산소 농도 5 mg L^{-1} 이하에서는 $0.005 \sim 0.007 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW hr}^{-1}$ 으로 현저히 감소하여 5 mg L^{-1}

이하 낮은 용존산소의 농도 간에 산소소비율의 유의한 차이 ($p > 0.05$)를 나타내지 않았다. 그러나 대조구와 5 mg L^{-1} 이하에 노출시킨 멧게의 산소소비율은 유의한 차이를 나타내어 ($p < 0.05$) 수중에 용존산소가 감소하면 일정 기간 호흡률을 조절하는 것으로 추정된다. 암모니아질소 배설률은 5 mg L^{-1} 이하 저농도에서 매우 낮았으며, 호흡률과 유사한 경향을 나타내었으며, 대조구와 5 mg L^{-1} 이하에 노출시킨 멧게의 암모니아질소배설률은 유의한 차이를 나타내었다 ($p < 0.05$).

물렁증에 걸리지 않은 정상 멧게의 새낭(stigmata), 소화선(digestive gland) 및 피낭(tunic)의 조직학적 특징을 Fig. 3에 나타내었다. 새낭(stigmata)은 다수의 새낭돌기(papillae)들이 일렬로 배열되어 있으며, 새낭돌기 내부는 혈구들이 존재하는 혈림프동(hemolymph sinus)이 관찰

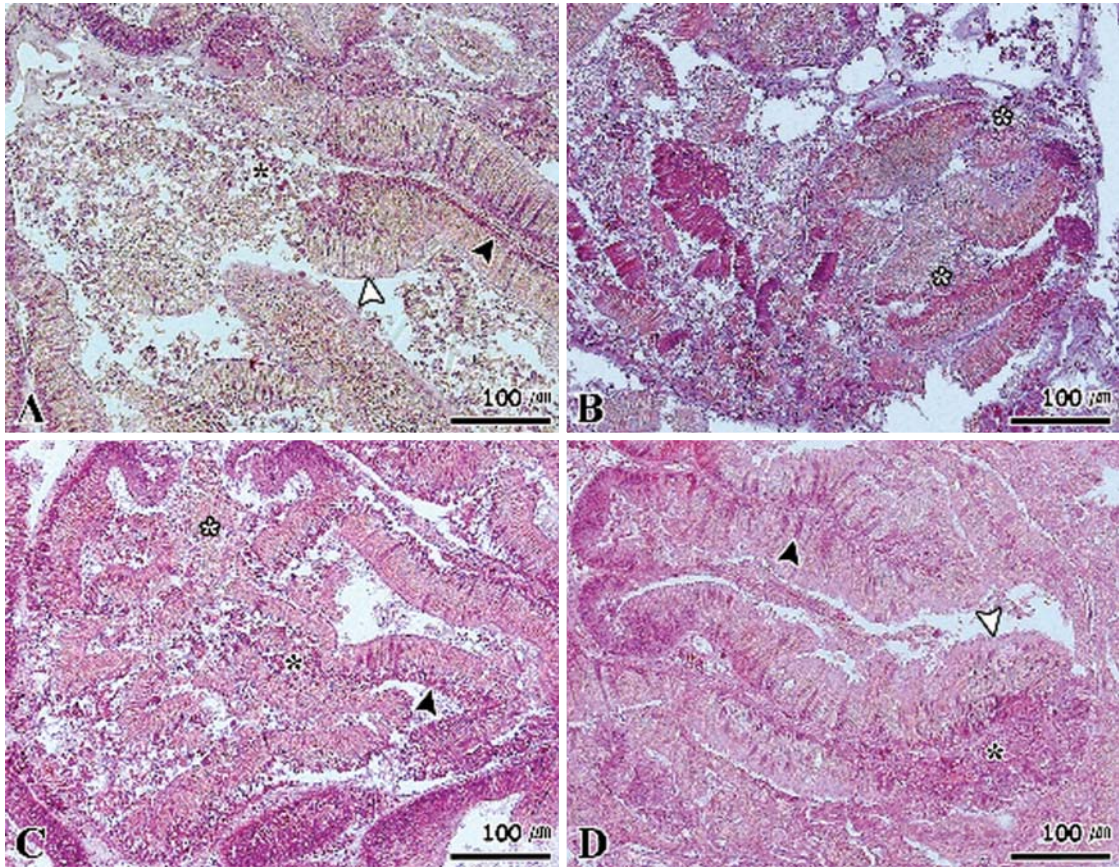


Fig. 5. Histopathological feature of digestive gland in sea squirt *Halocynthia roretzi* by the effect of dissolved oxygen. A: 2 mg L^{-1} , showing the condense of nucleus (black arrowhead), striated border and cilia destruction (white arrowhead), necrotic epidermal layer (asterisk). B: 3 mg L^{-1} , showing the necrotic epithelial cells (asterisk). C: 4 mg L^{-1} , showing the condense of nucleus (arrowhead), necrotic epithelial cells (asterisk). D: 5 mg L^{-1} , showing the deformation of nucleus (black arrowhead), striated border and cilia destruction (white arrowhead), blood cells infiltration in the lumen (asterisk).

되었다. 새낭돌기의 정단부에는 다수의 섬모들이 존재하고 있었으며, 새낭의 상피세포층은 단층의 원주형상피세포로 구성되어 있었다(Fig. 3A). 소화선은 위와 장의 전단부 외벽 바깥에 망상구조를 형성하는 기관으로 다수의 소화선세관(digestive tubule)과 맹낭(blind ampulla)들로 이루어져 있으며 도관을 통하여 위와 연결 된다. 상피세포들은 단층의 원주형섬모세포로서 자유면에는 섬모들과 다수의 미세용모(microvilli)를 가지며, 세포질에는 글리코겐 과립들을 함유한다(Fig. 3B). 피낭의 조직학적 구조는 외부로부터 큐티클(cuticle), 기질(matrix)로 구성되어 있었다. 피낭은 다수의 주름들이 존재하고 있었는데 주름의 정단부에는 반원모양의 큐티클층으로 이루어져 있었다. 큐티클은 얇은 막구조로서 비세포성 층이다(Fig. 3C). 기질은 다수의 미세섬유로 구성된 조밀한 구조로서 미세섬유 다발이 횡단으로 배열되어 있었다

(Fig. 3D).

멍게 새낭에 대한 병리조직학적 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 용존산소 농도 4 mg L^{-1} 이하에 노출된 경우 상피세포핵이 응축되고, 상피세포층이 파괴되었으며, 파괴된 상피세포층 주변의 맹낭부에는 다수의 혈구세포 침윤과 함께 맹낭부의 괴사 등 공통된 점이 관찰되었다(Fig. 4A, B, C). 5 mg L^{-1} 의 농도에서는 상피세포가 변형되거나 상피층의 두께가 두꺼워지는 조직상이 관찰되었다(Fig. 4D).

저산소에 노출된 멍게 소화선의 병리조직학적 변화는 Fig. 5와 같다. 용존산소 농도 4 mg L^{-1} 이하 저산소농도에서 소화선은 상피세포핵이 응축되고, 상피층이 괴사되었으며, 상피세포의 자유면에 존재하는 선조연(striated border)이 파괴되었으며(Fig. 5A, B, C), 농도가 낮을수록 조직학적 변형이 크게 나타났다. 5 mg L^{-1} 의 농도에 노

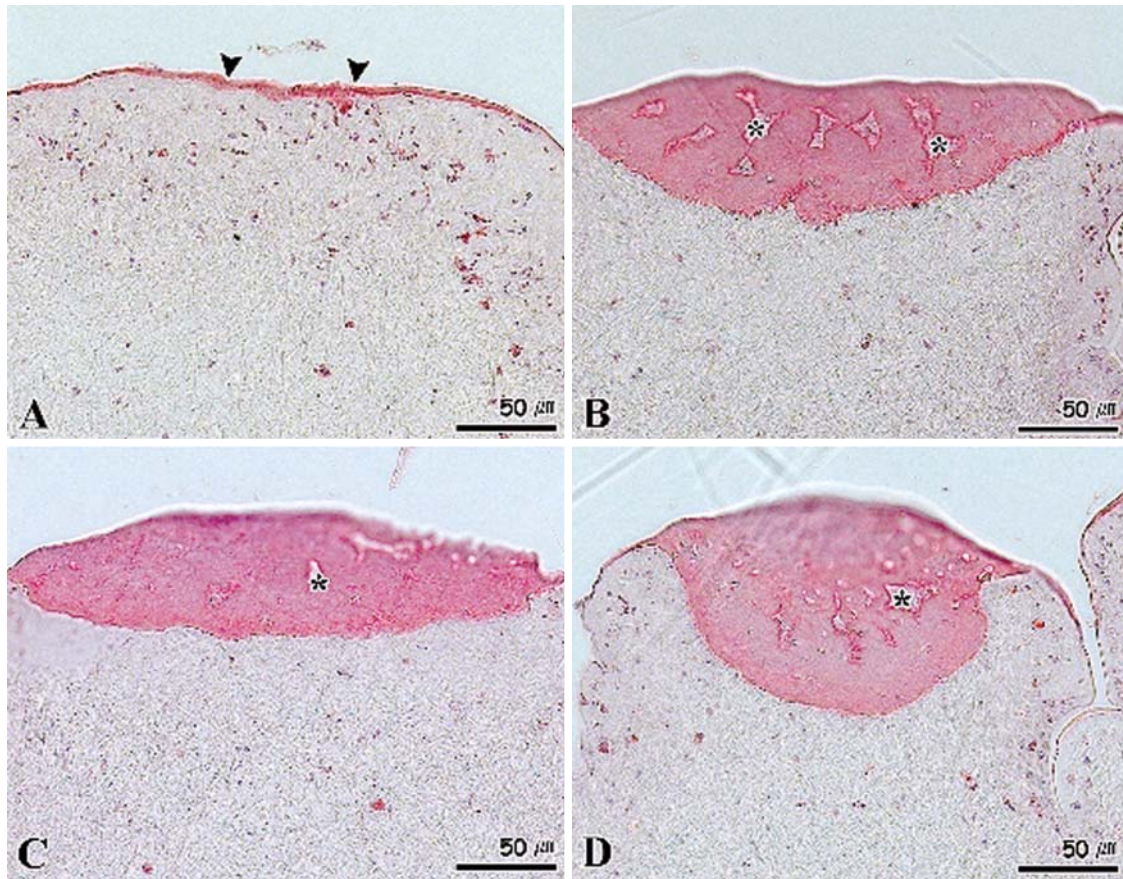


Fig. 6. Histopathological feature of tunic in sea squirt *Halocynthia roretzi* by the effect of dissolved oxygen. A: 2 mg L^{-1} , showing the necrotic cuticle layer (arrowhead). B: 3 mg L^{-1} , showing the inflammation of cuticle layer (asterisk). C: 4 mg L^{-1} , showing the inflammation of cuticle layer (asterisk). D: 5 mg L^{-1} , showing the inflammation of cuticle layer (asterisk).

출된 소화선들은 상피세포핵이 변형되고, 맹낭 내에 혈구세포들이 침윤되는 현상이 관찰되었다(Fig. 5D).

저산소에 의한 피낭의 조직학적 특징은 다음과 같다(Fig. 6). 피낭은 용존산소 농도 2 mg L^{-1} 에서 큐티클 층의 두께가 얇아졌다(Fig. 6A). 반면 용존산소 농도 3, 4, 5 mg L^{-1} 의 농도에 노출된 피낭의 경우에는 피낭막의 염증이 관찰되었으나 특이한 반응은 관찰되지 않았다(Fig. 6B, C, D).

고 찰

산소는 모든 생물이 생명현상을 유지하는데 필수적인 원소이며, 정상적인 대사활동에서는 용해된 상태에서만 흡수된다. 용존산소의 결핍은 생물상으로도 뚜렷이 구분되어 생물의 분포에 제한 요인이 될 수 있다. 수중 내 용존산소의 감소에 의한 생물의 반응은 혐기성대사가

증가하며, 먹이이용 및 생식주기의 불균형, 성장 감소, 호흡률과 배설률 등의 대사저하 및 활동성 감소 등과 같은 생물학적 요인에 영향을 미친다(Pamatmat 1980). 패류의 경우에는 에너지의 사용을 최소화하여 제한된 시간동안 저산소 및 무산소 상태에서도 생존할 수 있도록 생리적 반응을 조절하지만(Dezwaan and Wijsman 1976), 내성의 정도는 동물의 생리적 상태와 생물이 서식하고 있는 수온, 염분, pH 및 오염원 등 서식 생태에 따라 다르게 나타난다(Herleid 1980).

수온 $12 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 명계의 용존산소에 대한 반수치사 농도는 3.55 mg L^{-1} 으로 수온 20°C 에서 바지락, *Ruditapes philippinarum* 2.40 mg L^{-1} (Shin et al. 2001)과 꼬막 *Tegillarca granosa*의 1.13 mg L^{-1} (Shin et al. 2002) 보다는 높게 나타나 주기적으로 공기에 노출되는 시간이 길고 조간대 서식하고 있는 패류보다는 저산소에 대한 내성이 낮은 것으로 여겨지며, 저산소에 인내할 수 있는 능력은 서식환경에서 경험했던 저산소의 정도와 관련이

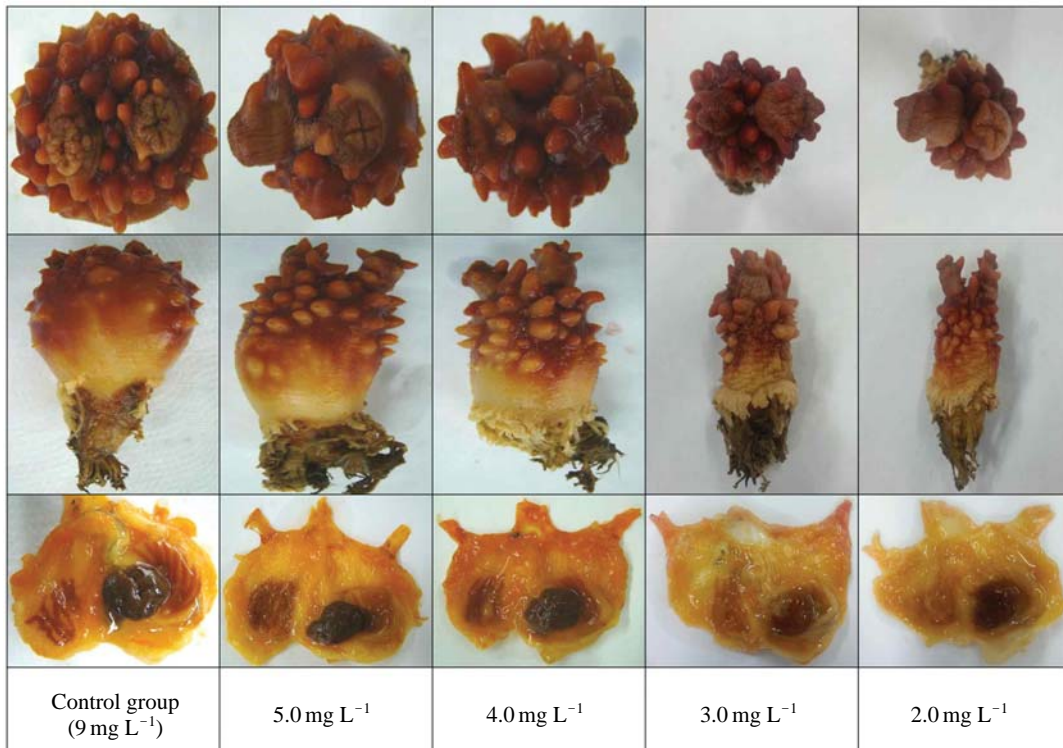


Fig. 7. Changes of external and internal feature of sea squirt *Halocynthia roretzi* exposed to different dissolved oxygen concentration.

있을 것으로 여겨진다.

용존산소가 감소하게 되면 생물의 초기 반응은 호흡 기관과 외부간의 외호흡이 과도하게 증가하여 호흡성 알칼리혈증 (respiratory alkalosis)이 나타나며, 이후 혈림프의 pH는 증가하고 pCO₂는 감소하는 것으로 보고되고 있다 (Truchot 1975; McMahon *et al.* 1978). 반면 저산소에서 혈림프내 산소분압이 80%까지 감소 (deFur *et al.* 1990) 한다는 보고 등 저산소에 기인한 생물의 호흡반응은 생물에 따라 다르다. 본 연구에서 용존산소 감소에 따른 멧게의 호흡반응은 용존산소 농도 5 mg L⁻¹ 이하에서 유의하게 감소하여 용존산소 농도 간에는 차이를 보이지 않았으며, 대조구에 비해 64~74% 감소하여 deFur *et al.* (1990)의 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 멧게의 새낭, 소화선 및 피낭의 병리조직학적 결과는 대체로 각 기관을 구성하고 있는 상피세포층의 괴사, 혈구세포의 침윤, 세포핵 응축 및 변형 등이 나타나고 있다. 특히 새낭은 용존산소 농도 5 mg L⁻¹ 이하에서 상피세포의 변형, 핵 응축 및 변형, 새낭돌기 괴사 등 조직학적 병변이 관찰되었다. 이는 유기호흡을 하는 생물에서 산소가 감소됨에 따라 호흡기관인 아가미의 조직학적 병변으로 인해 기능이 저하되어 호흡률이 감소되는 것으로 여겨

진다.

멧게의 저산소에 대한 반응은 Fig. 7에서와 같이 멧게 피낭의 형태적 변화와 내부 변화를 관찰 할 수 있었다. 용존산소의 감소에 따른 형태변화는 각 농도에 노출 후 3일째 생존한 개체를 대상으로 관찰한 것으로 실험기간 동안 물렁증은 발생하지 않았다. 그러나 3 mg L⁻¹ 이하 저산소 상태에서 생존한 모든 개체는 피낭의 돌기 및 형태는 대조구와 유사하게 유지하였으나 피낭이 쪼글어 들어 부피가 매우 작아지는 것이 관찰되었다. 또한 내부 기관은 전체적으로 탈색되는 것이 관찰되었고 아가미와 간체장의 탈색 및 괴사가 나타났다.

유기호흡을 하는 대부분의 생물은 용존산소 농도 12 kPa와 공기중 포화도의 50% 감소까지는 정상적인 대사를 유지할 수 있으며 (Bayne and Newell 1983), 호흡조절 능력이 없는 경우에는 외부 산소의 농도에 의존하여 변화하는데 (Wilbur and Yonge 1966) 본 연구에서 멧게는 용존산소 농도 5 mg L⁻¹ 이하에서 호흡률을 낮추어 대사를 조정하는 것으로 보아 용존산소 조절자 (Bayne 1973)이며, 호흡조절능력 (Wilbur and Yonge 1966) 이 있는 생물로 여겨진다. 그러나 외형 및 내부 기관의 변화는 뚜렷하지 않았으나 병리조직학적 병변, 대사율 감소 등의

영향이 있는 것으로 보아 용존산소의 변화에 매우 민감한 종으로 여겨지며, 양식기간 동안 저산소의 변화가 빈번히 발생한다면 멍게의 혈림프의 순환기 장애, 생리활성 감소, 성장저하 및 면역력 결핍 등을 일으킬 수 있으며, 이로 인해 대량폐사가 발생할 수 있으므로 양식장에서는 용존산소 농도 $4\sim 5\text{ mg L}^{-1}$ 이상이 유지될 수 있도록 관리해야 할 것이다.

적 요

본 연구는 멍게 대량폐사의 주요 현상으로 나타나고 있는 물렁증 발생의 원인을 찾기 위하여 저산소의 영향에 의한 물렁증 발생, 생존률, 대사율 및 병리조직학적 변화를 분석하였다. 용존산소의 감소에 따른 멍게의 생존률은 용존산소 농도 2 mg L^{-1} 에서 노출 4일째 모두 폐사하였으며, 3 mg L^{-1} 에서는 노출 5일째 50%를 나타내어 5days-LC₅₀은 3.55 mg L^{-1} ($1.86\sim 4.96\text{ mg L}^{-1}$)로 나타났다. 그러나 저산소에 노출된 기간 동안 물렁증 발생은 관찰되지 않았다. 산소소비율은 대조구와 비교하여 용존산소 농도 5 mg L^{-1} 이하에서 유의하게 감소하여 저산소에 노출되면 일정기간 호흡률을 조절하는 것으로 추정된다. 저산소에 의한 멍게의 새낭, 소화선 및 피낭의 병리조직학적인 변화는 각 기관을 구성하고 있는 상피세포층의 괴사, 혈구세포의 침윤, 세포핵 응축 및 변형 등이 관찰되었다. 형태적인 변화는 피낭이 쪼글어들어 부피가 작아지고 내부 기관은 탈색되고 아가미와 간체장의 괴사가 관찰되었다.

사 사

이 연구는 국립수산과학원 수산시험연구(양식생물 환경내성 범위 및 폐사메커니즘 구명) 연구의 지원(RP-2013-AQ-118)에 의해 운영되었습니다.

참 고 문 헌

- Aquacop EB and C Soyez. 1988. Effects of dissolved oxygen concentration on survival and growth of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. J. World Aquacult. Soc. 19:12A.
- Armsworthy SL, BA MacDonald and JE Ward. 2001. Feeding activity, absorption efficiency and suspension feeding processes in the ascidian, *Halocynthia pyriformis* (Stolodobranchia: Ascidiacea): responses to variations in die quantity and quality. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 260:41-69.
- Bayne BL. 1973. The responses of three species of bivalve mollusc to declining oxygen tension at reduced salinity. Comp. Biochem. Physiol. 45A:793-806.
- Bayne BL and RC Newell. 1983. Physiological energetics of marine molluscs. In the mollusca, Vol. 4 (Wilbur KM and AS Saleuddin eds.). Academic Press, New York. pp. 407-515.
- Bohle B. 1972. Effects of adaptation to reduced salinity on filtration activity and growth of mussels (*Mytilus edulis*). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 10:41-49.
- Choi DL, BY Jee, HJ Choi, JY Hwang, JW Kim and FCJ Berthe. 2006. First report on histology and ultrastructure of an intrahemocytic paramyxean parasite (IPP) from tunicate *Halocynthia roretzi* in Korea. Dis. Aquat. Organ. 72:65-69.
- deFur PL, CP Mangum and JE Resse. 1990. Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* in long term hypoxia. Biol. Bull. 178:46-54.
- DeZwaan A and TCM Wijsman. 1976. Anaerobic metabolism in bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism. Comp. Biochem. Physiol. 54B:313-317.
- Finney DJ. 1971. Probit analysis, 3rd. pp. 333. Cambridge University Press, London.
- Herreid CF. 1980. Hypoxia in invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 67A:311-320.
- Hirai E. 1941. An outline of the development of *Halocynthia roretzi* Drasche. Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ. Biol. 16:217-232.
- Hirai E. 1965. On the changes of the adhesive papillae of the larvae of an ascidian *Halocynthia roretzi*. Bull. Mar. Biol. St. Asamushi. 12:9-11.
- Jang YJ. 1979. Studies on the early growth of the sea squirt, *Halocynthia roretzi* (Drasche). Bull. Fish. Res. Dev. Agency 21:69-76. (in Korean)
- Jiang AL, J Lin and CH Wang. 2008. Physiological energetics of the ascidian *Styela clava* in relation to body size and temperature. Comp. Biochem. Physiol. part A 149:129-136.
- Kim BS, JD Bang, HY Ryu, JP Hong and EY Chung. 2001. Gametogenesis, Gonadal Development and Maturation of the Sea Squirt, *Halocynthia roretzi*. Dev. Reprod. 5:137-144.
- Kim SH, HO Yang, YK Shin and HC Kwon. 2012. *Haslibacter halocynthiae* gen.nov., sp. nov., a nutriacholic acid-producing bacterium isolated from the marine ascidian *Halocynthia roretzi*. Internal J. System. Evo. Micro. 62:624-631.
- Kumagai A, A Suto, H Ito, T Tanabe, JY Song, Kitamura, SI Hirose, ET Kamaishi and S Miwa. 2010. Soft tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi* is caused by a kinetoplastid protist. Dis. Aquat. Org. 95:153-161, 2011.

- Kumagai, A, A Suto, H Ito, T Tanabe, K Takahashi, T Kamaishi and S Miwa. 2010. Mass mortality of cultured ascidians *Halocynthia roretzi* associated with softening of the tunic and flagellate-like cells. *Dis. Aquat. Org.* 90:223-234.
- Maruo NA and SR Malecha. 1984. The effect of hypoxia on blood pH and lactate levels in *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Comp. Biochem. Physiol.* 77A:627-630.
- McMahon BR, WW Buggen and EW Taylor. 1978. Acid-base changes during recovery from disturbance and during long term hypoxic exposure in the lobster, *Homarus vulgaris*. *J. Exp. Zool.* 205:361-370.
- Morris S and SL Butler. 1996. Hemolymph respiratory gas, acid and ion status of the amphibious purple shore crab *Leptograpsus variegates* (Fabricus) during immersion and environmental hypoxia. *J. Crust. Biol.* 16:253-266.
- Pamatmat MM. 1980. Faculative anaerobiosis of benthos. In, marine benthic dynamics, edited by K.R. Tenore and B.C. Coull, University of south Carolina, Columbia. pp. 69-90.
- Ryland JS. 1990. A circadian rhythm in the tropical ascidian *Diplosoma virens* (Ascidacea : Didemnidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 138:217-225.
- Shin YK, BH Kim, BS Oh, CG Jung, SG Sohn and JS Lee. 2006. Physiological responses of the ark shell *Scapharca broughtonii* (Bivalvia: Arcidae) to decrease in salinity. *J. Fish. Sci. Technol.* 9:153-159.
- Shin YK, HJ Kim, KI Park, JC Jun and EO Kim. 2011. Occurrence of bi-flagellated protists in the tunics of ascidians *Halocynthia roretzi* with tunic-softness syndrome collected from Tongyeong, south coast of Korea. *J. Fish Pathol.* 24: 197-204.
- Shin YK, JC Jun, EO Kim and YB Hur. 2011. Physiological changes and energy budget of the sea squirt *Halocynthia roretzi* from Tongyeong, South Coast of Korea. *Korean J. Fish. Aqua. Sci.* 44:366-371.
- Shin YK, TS Moon and CH Wi. 2002. Effects of the dissolved oxygen concentration on the physiology of the Manila clam, *Tegillarca granosa* (Linnaeus). *J. Korean Fish. Soc.* 35:485-489.
- Shin YK, Y Kim and EY Chung. 2001. Effects of the dissolved oxygen concentration on the physiology of the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *J. Korean Fish. Soc.* 34:190-193.
- Solorzano L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.* 14: 799-801.
- Truchot JP. 1975. Changements de l'état acide-base du sang en fonction de l'oxygénation de l'eau chez le crabe *Carcinus maenas* (L.). *J. Physiol.* 70:583-592.
- Yoo SK, HS Lim and DT Lim. 1988. On the growth of the sea squirt (*Halocynthia roretzi*) from artificial seed. *Korean J. Aquacult.* 1:75-84.
- Yoo SK, KH Kang and YH Chang. 1990. Influence of water temperature on spawning induction, egg development and seed collection of sea squirt, *Halocynthia roretzi*. *Korean J. Aquacult.* 3:79-88.
- Wilbur KM and CM Yonge. 1966. *Physiology of mollusca*. Academic press, New York and London, Volume II, pp. 201-203.
- Winddows J. 1985. Physiological procedures. In: *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*, Bayne, ed. Academic Press, New York and London, pp. 161-178.

Received: 24 June 2013

Revised: 4 September 2013

Revision accepted: 4 September 2013