

꼬막, *Tegillarca granosa*의 생존, 호흡 및 기관계 구조에 미치는 구리 (Cu) 의 독성

신윤경, 박정준, 주선미¹, 이정식¹

국립수산과학원 전략양식연구소 양식관리과, ¹전남대학교 수산생명의학과

Copper Toxicity on Survival, Respiration and Organ Structure of *Tegillarca granosa* (Bivalvia: Arcidae)

Yun Kyung Shin, Jung Jun Park, Sun Mi Ju¹ and Jung Sick Lee¹

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

¹Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to find out the changes of survival, respiration and organ structure of *Tegillarca granosa* exposed to copper (Cu). Experimental period was four weeks. Experimental groups were composed of one control condition and three copper exposure conditions (0.125, 0.250 and 0.500 mg/L). The results of the study confirmed that copper induces reduction of survival rate and respiration rate and histopathology of organ structure of the bivalve. In the copper concentration of 0.500 mg/L, mortality was 66.7% after Cu exposure of 4 weeks. Respiration rate was observed exposure groups lower than control decline by 18%. Histological analysis of organ system illustrated degeneration of epithelial layer and connective tissue layer of the mantle. Also, histological degenerations as epithelial atrophy and disappearance of lateral cilia are recognized in the gill and it was observed expansion of hemolymph sinus, disruption of epithelial layer, acidification of mucous and degeneration of muscle fiber bundles in the foot. In the digestive diverticulum, it was showed atrophy and destruction of basophilic cell and epithelial cell in the digestive tubules.

Key words: *Tegillarca granosa*, Copper (Cu), Survival, Oxygen consumption, Histopathology

서 론

구리는 생물체의 정상적인 대사기능에 필요한 필수 미량금속이지만 생물이 필요이상의 농도에 노출될 경우 세포의 구조 및 기능적 이상을 유발하거나 생체기능의 장애를 일으켜 생리적 활동에 부정적인 영향을 미치기도 한다 (Sutherland and Major, 1981). 최근 들어 구리는 양식용 어망 등의 부착생물 억제제를 위한 도료의 성분으로 사용되거나 항균활성을 위한 재

료로 사용되고 있다 (Park *et al.*, 2003; Xiuling *et al.*, 2012). 그러나 산업용수 및 생활하수 유입에 의한 장기적인 노출에 따라 구리의 체내축적 (Rojik *et al.*, 1983), 형태적 기형 및 생식장애 (Park *et al.*, 2009) 등 구리독성에 의한 영향이 보고되고 있다.

환경요인들의 영향으로 인해 생물이 받는 위해도를 평가하는 방법은 위험성 확인 (hazard identification), 노출평가 (exposure assessment), 용량-반응 평가 (dose-response assessment) 및 위해도 결정 (risk characterization) 의 주요 4단계이다 (NRC, 1983). 위와 같은 방법에 따라 위해도를 평가하기 위해서는 지표생물 (indicator organism) 과 생물지표 (biomarker) 의 선정이 중요하다 (Huggett *et al.*, 1992).

이때패류들은 수서환경을 평가할 수 있는 중요한 생물군으로 주로 여과섭식에 의해 먹이를 섭취하기 때문에 환경오염원에 쉽게 노출된다. 또한 이동성이 낮아 일생동안 서식범위가 국한되며, 체내로 유입된 오염원들의 축적은 용이하지만 체내에서 해독과 체외방출이 낮아 특정 지역의 오염상태를 알아보

Received: June 9, 2015; Revised: June 22, 2015; Accepted: June 29, 2015

Corresponding author : Sun Mi Ju

Tel: +82 (61) 659-7172 e-mail: mi357579@nate.com
1225-3480/24578

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

기 위한 지표종으로 많이 사용되고 있다 (Marin *et al.*, 2006; Schintu *et al.*, 2008; Husmann *et al.*, 2012).

꼬막, *Tegillarca granosa*은 한국 남해안의 중요한 패류 생물자원 가운데 하나로서 해양생태계의 관리, 생물자원의 보존 및 수산물 안전성 측면에서 관리가 필요한 종이다. 본 연구에서는 꼬막의 생존, 호흡 및 기관계 구조에 미치는 구리의 독성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 꼬막, *Tegillarca granosa*은 각장 3.5-4.0 cm의 성체였으며, 외형 및 운동성에 이상이 없는 개체를 실험에 사용하였다.

시험물질인 구리는 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Copper Chloride Dihydrate, Showa Chem. Inc., Japan) 를 증류수로 1000 mg/L의 표준용액을 만든 다음, 실험 농도별로 희석하여 조제하였다.

2. 방법

1) 농도구

급성독성 실험의 농도구는 Viarengo (1985, 1990) 와 Krishnakumar *et al.* (1990) 의 보고를 이용하여 10개 농도구를 설정하였다. 각 농도구에서 2회 반복실험을 실시하여 $\text{LC}_{50-96\text{h}}$ 을 구한 다음, 이를 기준으로 1개의 대조구와 3개의 노출구 (0.125, 0.250, 0.500 mg/L) 를 설정하였다.

2) 사육조건

본 실험에서 사용된 수조는 유리로 제작된 10 L 용량으로 실험방법은 기수식 및 환수식을 병행한 생물검정법을 이용하였다. 실험생물은 채집한 후, 0.5 ton 수조에서 실내사육하면서 10일 동안 순치시킨 다음 노출실험을 실시하였다. 실험기간 동안 광주기는 자연조건으로 하였고 수온은 $17 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 였다.

만성독성 실험의 노출실험 기간은 4주였다. 각 농도구당 실험 개체들은 밀도를 고려하여 30개체였으며, 실험기간 동안 광주기는 자연조건으로 하였으며, 수온은 $17 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 였다. 먹이는 식물플랑크톤인 *Isochrysis galbana*를 개체 당 $1-2 \times 10^6$ cell/ml씩 매일 1회 공급하였고, 실험 중 실험 개체들의 분비물로 인한 사육수의 변화와 중금속 농도변화를 최소화하기 위해 매일 1 회 사육수를 교환하였다.

3) 사망률

실험생물의 사망여부는 패각을 벌리고 있는 개체들 가운데 외부에서 인위적인 자극을 가하여 반응이 없는 개체를 사망한

개체로 판단하였다. 사망개체는 매일 오전 오후 각 1회씩 확인하여 전체 실험 개체수에 대한 누적사망 개체수를 사망률로 환산하였다.

4) 호흡률

호흡률은 Shin *et al.* (2011) 의 방법에 따라 실험생물의 호흡에 의한 산소 소비량을 측정하여 표시하였다. 산소소비량은 실험생물의 크기에 따라 0.5-1.6 L의 respirometer chamber와 생물호흡측정기 (Orbis 3600 made by Switzerland) 를 이용하여 측정하였다.

5) 조직학적 분석

꼬막의 각장 등 측정형질을 계측한 후, 해부하여 외투막, 아가미, 발 그리고 소화맹장이 포함된 내장낭 일부를 적출하였다. 광학현미경 조직표본제작은 적출한 시료들을 Bouin 용액에 24 시간 동안 고정하고, 48시간 동안 흐르는 물에 수세하였다. 파라핀 절편법에 의해 4-6 μm 두께로 연속 절편하여 슬라이드 글라스에 부착하였다. 그 후, Mayer's hematoxyline-eosin (H-E) 염색 및 alcian blue-periodic acid and Schiff's solution (AB-PAS, pH 2.5) 반응을 실시하였다. 그리고 lipofuscin을 확인하기 위해 Long Ziehl-Neelsen 염색을 시행하였으며, lipofuscin의 분포비율은 Lee and Park (2007) 의 방법에 따라 현미경 화상분석장치 (IMT, Visus, USA) 를 이용하여 분석하였다.

6) 통계분석

대조구에 대한 노출구들의 유의적인 차이 ($P < 0.05$) 를 알아보기 위해 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 paired sample t-test를 하였다.

결 과

1. 사망률

꼬막의 4주 동안 구리 노출에 의한 만성독성 실험결과, 사망률은 대조구에서는 3.35%였으나 0.125, 0.250, 0.500 mg/L의 구리 노출구에서는 각각 33.3%, 60.0%, 66.7%로 농도의 준적 사망률의 증가를 보였다 (Fig. 1).

2. 호흡률

구리에 노출된 꼬막의 호흡률은 구리 노출구 간의 농도에 따른 유의한 차이는 없었으나 ($P > 0.05$) 대조구에 비해 유의하게 낮은 ($P < 0.05$) 경향을 보여 노출 종말점에서는 대조구에 비해 약 18.2%로 감소하였다 (Fig. 2).

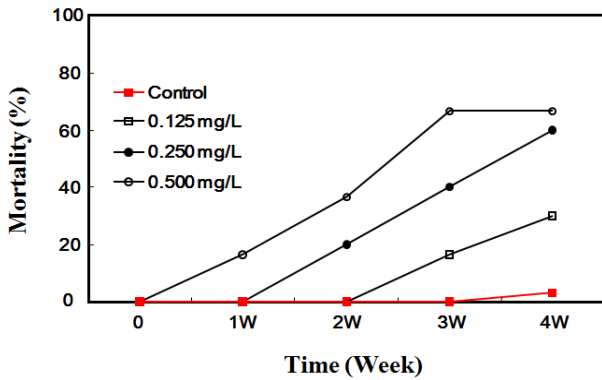


Fig. 1. Mortality of *Tegillarca granosa* exposed to copper for 4 weeks.

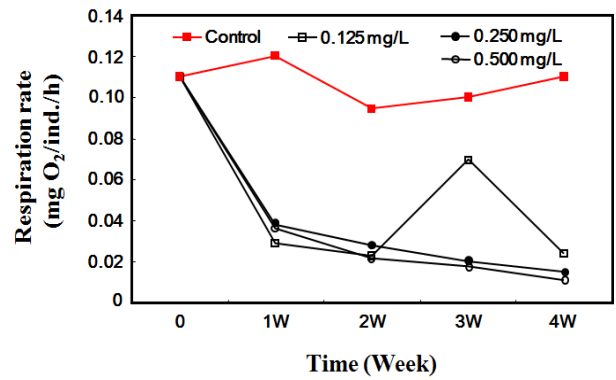


Fig. 2. Respiration rates of *Tegillarca granosa* exposed to copper for 4 weeks.

3. 기관계의 조직학적 변화

1) 외투막

꼬막의 외투막은 횡단면에서 가운데 결합조직층을 상피층이 위 아래로 싸고 있는 구조로서 상피층은 단층이며, 상피층을 구성하는 세포들은 섬모원주형 상피세포와 점액세포들로 구분된다. 결합조직층은 주로 교원섬유와 일부 근섬유다발로 이루어지며, 다수의 혈림프동이 발달되어 있다 (Fig. 3A). 0.125 mg/L의 구리 노출구에서는 외투막 상피층의 자유면에 존재하는 섬모의 탈락, 결합조직층의 변성, 점액세포의 증가 및 점액

의 산성화가 확인되었다 (Fig. 4A, B). 0.250 mg/L와 0.500 mg/L 구리 노출구에서는 외투막 상피층의 위축과 파괴, 결합조직층의 붕괴 및 혈구의 침윤이 확인되었다 (Fig. 4C, D).

2) 아가미

꼬막의 아가미는 사생형으로 각각의 새엽은 가운데 혈림프동을 단층의 새엽상피층이 둘러싸고 있으며, 새엽상피층은 상피세포, 점액세포, 섬모세포로 구성된다. 상피세포의 형태는 측면섬모대와 정단섬모대가 존재하는 부위에서는 입방형 또는

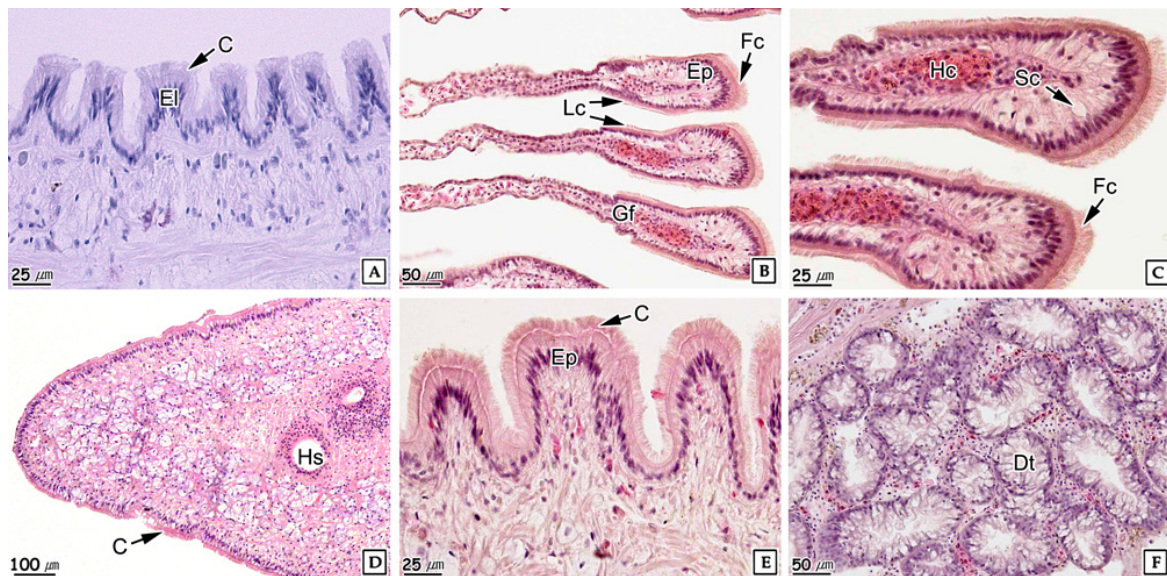


Fig. 3. Microstructure in the mantle cavity organs of *Tegillarca granosa*. **A:** Mantle, note the simple epithelial cell with cilia on the free surface. **B:** Gill, showing the frontal cilia (Fc) on the frontal region and lateral cilia (Lc) on the lateral region. **C:** Gill, showing the secretory cell (Sc) in the epithelial layer of the gill filament (Gf). **D:** Foot, note the composition of the simple epithelial cell and connective tissue with hemolymph sinus (Hs). **E:** Foot, numerous cilia (C) on the free surface of the epithelial cell (Ep). **F:** Digestive diverticulum, showing the irregular digestive tubule (Dt). Hc, hemocyte.

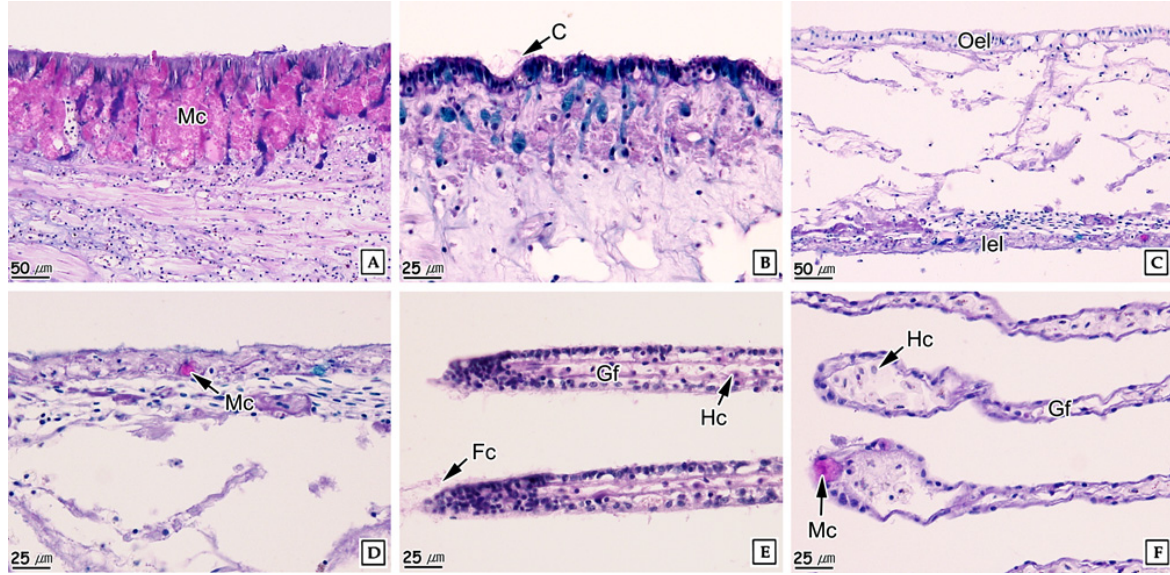


Fig. 4. Histopathological changes in the mantle and gill of *Tegillarca granosa* exposed to copper for 4 weeks. **A:** Mantle, showing the increased mucous cell (Mc). 0.125 mg/L. **B:** Mantle, note the partially disappeared cilia. 0.125 mg/L. **C:** Mantle, showing the edema epithelium in the outer epithelial layer (Oel). 0.250 mg/L. **D:** Mantle, showing the destruction of the epithelial layer and decrease mucous cell. 0.250 mg/L. **E:** Gill, showing the disappearance lateral cilia and frontal cilia (Fc). 0.125 mg/L. **F:** Gill, note the degeneration of the gill filament (Gf) and infiltration of hemocyte (Hc). 0.500 mg/L. Iel, inner epithelial layer.

원주형세포이며, 나머지 부위에서는 편평형이다 (Fig. 3B, C). 0.125 mg/L와 0.250 mg/L의 구리 노출구에서는 새엽 측면섬모와 정단섬모의 탈락이 관찰되었으며 (Fig. 4E), 가장 높은 농도구인 0.500 mg/L의 노출구에서는 새엽 말단부의 변형, 정단 및 측면 상피층의 위축과 탈락 그리고 혈구의 침윤이 확인되었다 (Fig. 4F).

3) 발

꼬막의 발은 전형적인 부족류의 발 형태이다. 발은 조직학적으로 상피층, 결합조직층, 근육층으로 구성된다. 상피층은 단층으로 섬모원주형 상피세포와 점액세포로 구성되며, 자유면에는 선조연이 발달되어 있다. 근육층은 주로 근섬유다발로 구성되며, 일부 교원섬유와 혈림프동이 발달되어 있으며, 일부 상피층으로부터 발달된 점액세포들이 분포한다 (Fig. 3D, E). 0.125 mg/L와 0.250 mg/L의 구리 노출구에서는 상피세포의 위축, 점액의 산성화 및 상피층의 일부가 부분적으로 붕괴되었다 (Fig. 5A, B). 0.050 mg/L의 구리 노출구에서는 상피층 자유면 섬모의 탈락, 상피층의 붕괴, 근섬유 다발의 갈라짐 및 분절화가 확인되었다 (Fig. 5C).

4) 소화맹낭

소화맹낭은 다수의 소화선세포들로 구성되며, 소화선세포는 단층으로 섬모원주형 상피세포와 호염기성세포들로 이루어져

있다 (Fig. 3F). 0.125 mg/L와 0.250 mg/L의 구리 노출구에서는 소화선세포 상피층의 위축, 호염기성세포와 상피세포의 변형 및 내장낭 외부 상피층의 탈락이 확인되었다 (Fig. 5D, E). 가장 높은 농도구인 0.500 mg/L의 구리 노출구에서는 소화선세포의 붕괴 및 혈구 침윤이 뚜렷하였다 (Fig. 5F).

고 찰

수중오염원에 대한 수서동물의 반응을 평가하기 위해 생존율, 성장, 행동의 이상, 호흡률, 조직학적 반응 및 효소학적 반응의 평가 등이 주요한 생물지표로 사용된다 (Hebel *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2001). 이러한 생물지표는 종에 따라 오염원에 반응하는 농도가 다르므로 생체 안전농도 및 생태계 보호를 위한 안전농도 설정을 위한 기초자료로 활용이 가능할 것으로 여겨진다.

구리에 대한 생존반응은 종에 따라 다르게 나타나고 있다. *Scrobicularia plana*는 0.5 mg/L에서 노출 시간의 경과에 따라 사망률은 증가하며, 5-7일 동안 50%가 사망하였다 (Hassan and Julia, 1980). 동족, *Maetra veneriformis*은 구리의 만성 노출실험 결과, 0.1 mg/L 농도에서 노출 3주 후에 모두 사망하였다 (Shin *et al.*, 2013). 본 연구에서 꼬막의 4주 동안 구리 노출에 의한 만성독성 실험결과, 0.125, 0.250, 0.500 mg/L의 구리 노출구에서는 사망률이 각각 33.3%,

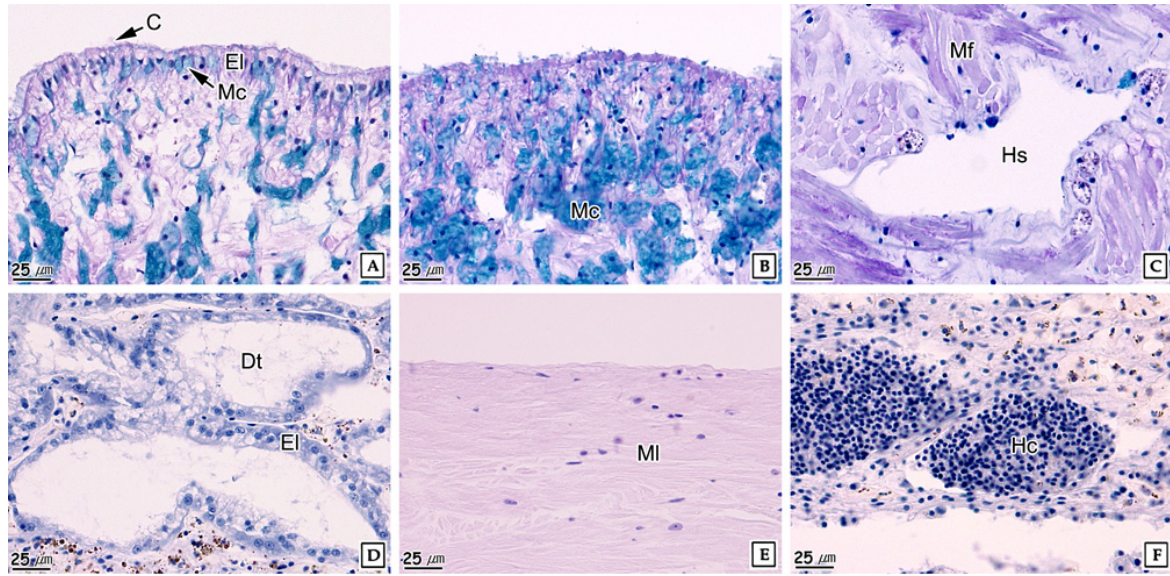


Fig. 5. Histopathological changes in the foot and digestive diverticulum of *Tegillarca granosa* exposed to copper for 4 weeks. **A:** Foot, showing the increased mucous cell (Mc) and partially disappearance cilia (C). 0.125 mg/L. **B:** Foot, note the destruction epithelial layer. 0.250 mg/L. **C:** Foot, showing the extended hemolymph sinus (Hs). 0.500 mg/L. **D:** Digestive diverticulum, showing the atrophy of epithelial layer and extended lumen of the digestive tubule (Dt). 0.250 mg/L. **E:** Visceral mass, showing the destruction of the epithelial layer. 0.125 mg/L. **F:** Digestive diverticulum, showing the destruction of digestive tubule and increased hemocytes (Hc). 0.500 mg/L. El, epithelial layer; Mf, muscle fiber; MI, muscle layer.

60.0%, 66.7%로 농도 의존적으로 증가하였다.

생물의 생체반응을 알아보기 위해 대사지표로 이용되고 있는 호흡률은 구리에 노출된 동종의 경우 대조구에 비해 0.100 mg/L의 농도구에서 약 75% 감소하였다 (Shin *et al.*, 2013). *Littorina rudi* (James and Robert, 1981) 는 구리농도 증가에 따라 유의한 호흡률의 증가를 나타내었다. 한편 수은, 카드뮴 및 TBTC1에 노출된 총알고둥, *Littorina brevicula* (Chin *et al.*, 1999) 와 납에 노출된 바지락, *Ruditapes philippinarum* (Shin *et al.*, 2013) 의 산소소비율은 노출 초기 감소 후 증가하는 경향을 보이며, 카드뮴과 아연에 노출된 *Perna viridis* (Cheung and Cheung, 1995), 카드뮴에 20일간 노출된 곤쟁이, *Neomysis awatschensis* (Kang *et al.*, 1997) 그리고 은과 크롬에 노출된 *Perna viridis* (Vijayavel *et al.*, 2007) 는 증금속의 농도 증가에 따라 산소소비율은 감소하였다. 꼬막의 호흡률은 구리 노출구 간의 농도에 따른 유의한 차이는 없었으나 대조구에 비해 유의하게 낮은 경향을 보여 호흡률은 생물종과 증금속의 종류에 따라 다양한 반응을 나타내고 있다.

이때패류에서 화학물질 및 미량금속 등의 오염원들은 외투막, 아가미, 신장, 발 그리고 소화낭에 주로 축적되며 (Morrison, 1993), 직·간접적으로 수서생물의 기관계 구조의 변화를 일으켜 생리학적 불균형을 초래한다 (Gregory *et al.*,

1999; Otludil *et al.*, 2004).

이때패류에서 외투막은 감각, 폐각형성 및 외투강 정화기능을 수행한다 (Eble, 2001). 수중오염원에 의한 이때패류의 외투막 이상은 상피층의 정단부에 존재하는 섬모 탈락, 점액세포들의 활성 감소, 결합조직층에서 교원섬유와 근섬유 다발의 변성을 들 수 있다. 노닐폐놀에 노출된 바지락의 외투막에서 혈림프동의 확장과 혈구의 증가, 상피층 자유면의 선조연 탈락, 결합조직층의 근섬유 다발의 분절과 산성 점액세포의 증가가 확인되었다 (Park and Lee, 2011). 또한 납에 노출된 바지락의 경우에도 농도가 증가할수록 외투막에서 다양한 조직학적 이상을 보였다 (Shin *et al.*, 2013). 본 연구의 꼬막에서도 구리 농도 증가에 따른 외투막의 점액세포 감소와 상피층 파괴 등은 정상적인 외투강 정화기능의 장애 및 폐각형태의 기형 등을 유발할 것으로 판단된다.

이때패류의 아가미는 호흡뿐 만 아니라 여과섭식 기능을 수행하는 중요한 기관계이다 (Benninger *et al.*, 1988; Eble, 2001). 수중의 구리, 염소, 철에 노출된 굴, *Crassostrea gigas*, 진주담치, *Mytilus edulis* 및 납에 노출된 바지락 아가미에서는 새엽 상피층의 분리, 혈림프동의 확장, 새엽 섬모대의 소실 그리고 새엽 상피층의 분리와 파괴 등 아가미로써의 기능을 상실한 조직상들이 관찰되었다 (Kim and Lee, 1988; Shin *et al.*, 2013). DDT와 PCB에 오염된 핀란드의 해안에

서 채집된 진주담치의 아가미에서는 정단상피와 측면상피의 붕괴와 측면섬모의 탈락을 보였다 (Sunila, 1988). 수은에 노출된 *Perna viridis* (Gregory *et al.*, 1999) 와 중금속 오염 지역에서 채집된 *Perna viridis*의 아가미에서도 이와 유사한 아가미의 구조적 이상이 보고되고 있다 (Vasanthi *et al.*, 2012). 구리에 노출된 동족 (Shin *et al.*, 2013) 과 꼬막에서도 이러한 조직학적 변화가 확인되는데, 이러한 변화는 이매패류의 여과섭이 능력과 호흡능력의 감소를 초래하는 원인으로 작용할 수 있다.

이매패류의 발은 단층의 상피세포로 구성되어진 상피층이 조밀하게 발달한 근육층을 둘러싸고 있는 구조를 하고 있다. 이들 근육층은 저질에 잠입 시 이완, 수축하면서 저질에 파고 들면서 이동한다 (Eble, 2001). 0.4와 0.8 mg/L의 endosulfan에 30일 동안 노출된 *Planorbarius corneus*의 발은 노출 10일에는 점액세포가 증가한 후 노출 20일 이후에는 다시 감소하며, 상피세포가 탈락된다. 사망 직전의 개체들에서는 상피세포의 탈락과 더불어 근섬유들이 위축되는 조직상이 관찰된다 (Otludil *et al.*, 2004). 또한, 아연에 노출된 대복, *Gomphina veneriformis*의 발은 노출 초기에는 상피층 선조연의 일부가 소실되고 혈림프동이 확장된다. 그리고 농도 의존적으로 상피층의 박리와 상피세포의 괴사, 근육층을 구성하는 환상근층과 종주근층의 근섬유 다발의 분절화가 나타난다 (Ju *et al.*, 2006). 본 연구에서도 이와 유사한 조직학적 변성이 확인되는데, 이는 패류의 이동과 저질잠입 능력의 저하로 이어질 수 있는 결과들이다.

이매패류에서 소화맹낭의 소화선세관은 소화, 흡수 및 오염원의 해독기능을 수행하는데, 소화맹낭은 다른 기관에 비해 오염원의 축적성이 높다 (Moore and Allen, 2002). 특히, 아연, 구리, 카드뮴, 망간의 농도는 아가미나 외투막 보다 소화맹낭에서 높다 (Husmann *et al.*, 2012). 소화맹낭을 구성하는 세포들의 손상은 독성영향을 평가하는데 중요한 지표가 된다 (Depledge and Hopkin, 1995). 0.08 mg/L의 구리, 아연 및 카드뮴에 41일 동안 노출된 지중해담치, *Mytilus galloprovincialis*의 소화선세관을 구성하는 상피세포들은 모두 섬모가 소실되었다 (Soto *et al.*, 1996). 0.227 mg/L 농도의 니켈에 30일 동안 노출된 *Lammellidaens marginalis*의 소화선세관은 상피층의 파괴와 기저막 분리현상을 보인다 (Andhale *et al.*, 2011). 노르웨이의 심각한 구리 오염지역에서 채집한 진주담치의 소화선세관에서 내강의 팽창이 관찰되며, 오염의 정도가 심한 지역에서 채집한 개체들은 호염기성 세포의 비율이 높고, 소화세포의 비율은 낮다 (Zorita *et al.*, 2006). 본 연구 결과, 소화맹낭에서 소화, 흡수, 분비 및 해독 작용 등의 대사활동에 관여하는 소화선세관의 상피세포와 호염기성세포의 변화와 파괴가 확인되었는데, 이러한 결과로 인

해 구리에 노출된 꼬막의 소화맹낭에서는 정상적인 대사활동이 불가능할 것으로 여겨진다.

요 약

본 연구는 구리에 노출된 꼬막, *Tegillarca granosa*의 생존율, 호흡 및 기관계의 반응을 알아보려고 하였다. 실험기간은 4주였으며, 실험구는 대조구와 구리 노출구 3개 (0.125, 0.250 and 0.500 mg/L) 였다. 실험 결과 구리는 꼬막의 생존율과 호흡률의 저하 및 기관계의 조직학적 변성을 유도하는 것이 확인되었다. 노출 종말점에서 0.500 mg/L의 구리 노출구에서 사망률은 66.7%였으며, 호흡률은 대조구에 비해 18.2%로 감소하였다. 기관계의 조직학적 분석 결과, 외투막 상피층과 결합조직층의 변성, 아가미 세엽 상피세포의 위축과 측면섬모의 소실, 발에서는 상피층의 붕괴, 점액의 산성화 및 혈림프동의 확장과 근섬유 다발의 변성을 나타냈다. 소화맹낭의 소화선세관에서는 호염기성세포와 상피세포의 위축 및 붕괴가 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 수산시험연구사업 (RP-2015-AQ-033) 으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Andhale, A.V., Bhosale, P.A. and Zambare, S.P. (2011) Histopathological study of nickel induced alterations in the fresh water bivalve, *Lammellidens marginalis*. *Journal of Experimental Sciences*, 2: 1-3.
- Beninger, P.G., Le Penneec, M. and Salaun, M. (1988) New observations of the gills of *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia), and implications for nutrition. *Marine Biology*, 98: 61-70.
- Cheung, S.G. and Cheung, R.Y. (1995) Effects of heavy metals on oxygen consumption and ammonia excretion in green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Marine Pollution Bulletin*, 31: 381-386.
- Chin, P., Lee, J.A., Shin, Y.K. and Lee, J.S. (1999) Environmental tolerance for pollutants in *Littorina brevicula* (Philippi). 2. The growth, metabolism and histological changes exposed to TBTCI and heavy metals in *Littorina brevicula*. *Journal of Korean Fisheries Society*, 32: 593-600. (in Korean)
- Depledge, M.H. and Hopkin, S.P. (1995) Methods to assess effects on brackish, estuarine and near-coastal water organisms. *In: Methods to assess the effects of chemicals on ecosystems.* (ed. by Linthurst, R.A., Bourdeau, P. and Tardiff, R.G.). pp. 125-149. Wiley, Chichester, United Kingdom.

- Eble, A.F. (2001) Anatomy and histology of *Mercenaria mercenaria*. In: Biology of the hard clam. (ed. by Kraeuter, J.N. and Castagna, M.). pp. 117-220. Elsevier, New York.
- Gregory, M.A., George, R.C., Marshall, D.J., Anandraj, A. and McClurg, T.P. (1999) The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filament in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Marine Pollution Bulletin*, **39**: 116-121.
- Hassan, B.A. and Julia, E.B. (1980) Behavioral responses of the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa) subjected to short-term copper (Cu II) concentrations. *Marine Environmental Research*, **4**(2): 97-107.
- Hebel, D.K., Jones, M.B. and Depledge, M.H. (1997) Responses of crustaceans to contaminant exposure: a holistic approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **44**: 177-184.
- Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M. Jr and Bergman, H.L. (1992) Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. pp. 1-347, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Husmann, G., Abele, D., Monien, D., Monien, P., Kriews, M. and Philipp, E.E.R. (2012) The influence of sedimentation on metal accumulation and cellular oxidative stress markers in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **111**: 48-59.
- James, G.W. and Robert, F.M. (1981) Effects of high environmental copper concentration on the oxygen consumption, condition and shell morphology of natural populations of *Mytilus edulis* L. and *Littorina rudis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Comparative Pharmacology*, **70**(2): 139-147.
- Ju, S.M., Lee, J.W., Jin, Y.G., Yu, J. and Lee, J.S. (2006) Effect of zinc bioaccumulation on survival rate, activity, growth and organ structure of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Environmental Toxicology*, **21**: 115-126.
- Kang, J.C., Kim, H.Y. and Chin, P. (1997) Toxicity of cooper, cadmium and chromium on survival, growth and oxygen consumption of the mysid, *Neomysis awatschensis*. *Journal of Korean Fisheries Society*, **30**: 874-881. (in Korean)
- Kim, S.Y. and Lee, T.Y. (1988) The effects of pollutants effluent from a steam-power plant on coastal bivalves. *Ocean Research*, **10**: 47-56. (in Korean)
- Krishnakumar, P.K., Asokan, P.K. and Pillai, V.K. (1990) Physiological and cellular responses to copper and mercury in the green mussel *Perna viridis* (Linnaeus). *Aquatic Toxicology*, **18**: 163-173.
- Lee, J.S., Kang, J.C., Shin, Y.K., Ma, K.H., Chin, P. (2001) Histological responses of the flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to copper. *Journal of Fish Pathology*, **14**(2): 81-90. (in Korean)
- Lee, J.S. and Park, J.J. (2007) Risk assessment of nonylphenol using the sex ratio, sexual maturation, intersex and lipofuscin accumulation of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Korean Fisheries Society*, **40**: 16-23. (in Korean)
- Marin, M.G., Boscolo, R., Cella, A., Degetto, S. and Ros, L.D. (2006) Field validation of autometallographical black silver deposit (BSD) extent in three bivalve species from the Lagoon of Venice, Italy (*Mytilus galloprovincialis*, *Tapes philippinarum*, *Scapharca inaequivalvis*) for metal bioavailability assessment. *Science of Total Environment*, **371**: 156-167.
- Moore, M.N. and Allen, J.I. (2002) A computational model of the digestive gland epithelial cell of the marine mussel and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, **54**: 579-584.
- Morrison, C.M. (1993) Histology and cell ultrastructure of the mantle and mantle lobes of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, Gmelin: A summary atlas. *American Malacological Bulletin*, **10**: 1-24.
- NRC (National Research Council). (1983) Risk assessment in the federal government: managing the process. pp. 1-192, National Academy Press. Washington.
- Otludil, B., Cengiz, E.I., Yildirim, M.Z., Unver, O. and Unlu, E. (2004) The effects of endosulfan on the great ramshorn snail, *Planorbis cornutus* (Gastropoda, Pulmonata): a histopathological study. *Chemosphere*, **56**: 707-716.
- Park, K.Y., Lee, D.J., Lee, C.H., Won, D.H., Lee, W.H. and Kwak, I.S. (2009) Studies on endpoints of toxicological evaluation of heavy metals in *Brachinella kugenumaensis*. *Journal of Environmental Toxicology*, **24**(3): 241-249.
- Park, S.J., Kim, B.J. and Rhee, J.M. (2003) Antibacterial activity of activated carbon fibers containing copper metal. *Polymer Korea*, **27**(3): 235-241.
- Rojik, I., Nemcs'OK, J. and Boross, L. (1983) Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. *Acta Biologica Hungarica*, **34**: 81-92.
- Schintu, M., Durante, L., Maccioni, A., Meloni, P., Degetto, S. and Contu, A. (2008) Measurement of environmental trace-metal levels in mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. *Marine Pollution Bulletin*, **57**: 832-837.
- Shin, Y.K., Jun, J.C., Kim, E.O. and Hur, Y.B. (2011) Physiological changes and energy budget of the sea squirt *Halocynthia roretzi* from Tongyeong, South Coast of Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **44**(4): 366-371. (in Korean)
- Shin, Y.K., Park, J.J., Lim H.S. and Lee, J.S. (2013) Changes of biomarker in manila clam, *Ruditapes philippinarum* exposed to lead. *Korean Journal of Malacology*, **29**(1): 7-13. (in Korean)
- Shin, Y.K., Park, J.J., Lim H.S. and Lee, J.S. (2013) Copper toxicity on survival, respiration and organ structure of *Macraa veneriformis* (Bivalvia: Mactridae). *Korean Journal of Malacology*, **29**(2): 129-137. (in Korean)

- Soto, M., Cajaraville, M.P. and Marigómez, I. (1996) Tissue and cell distribution of copper, zinc and cadmium in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, determined by autometallography. *Tissue and Cell*, **28**: 557-568.
- Sunila, I. (1988) Acute histological responses of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. *Journal of Invertebrate Pathology*, **52**: 137-141.
- Sutherland, J. and Major, C.W. (1981) Internal heavy metal changes as a consequence of exposure of *Mytilus edulis*, the blue mussel, to elevated external copper (II) levels. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **68**: 63-67.
- Vasanthi, L.A., Revathi, P., Arulvasu, C. and Munuswamy, N. (2012) Biomarkers of metal toxicity and histology of *Perna viridis* from Ennore estuary, Chennai, south east coast of India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **84**: 92-98.
- Viarengo, A. (1985) Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, **16**: 153-158.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N. and Orunesu, M. (1990) Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochemistry and Physiology, C*, **97**: 37-42.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S. and Balasubramanian, M.P. (2007) Sublethal effect of silver and chromium in the green mussel *Perna viridis* with reference to alterations in oxygen uptake, filtration rate and membrane bound ATPase system as biomarkers. *Chemosphere*, **69**: 979-986.
- Xiuling, J.I., Qunhui, S., Fang, L., Jing, M., Gang, X., Yuanlong, W. and Minghong, W. (2012) Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China. *Journal of Hazardous Materials*, **235-236**: 178-185.
- Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M. and Cajaraville, M.P. (2006) Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): an integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquatic Toxicology*, **78**: 109-116.