

다환방향족탄화수소 (PAHs) 에 노출된 굴, *Crassostrea gigas*의 생리 반응 변화

최은희, 최중기¹, 이원영, 윤주현, 심니영, 김수경, 임현정

국립수산과학원 서해수산연구소, ¹인하대학교 해양학과

The change of the physiological response of the *Crassostrea gigas* exposed to PAHs

Eun Hee Choi, Joong Ki Choi¹, Won Young Lee, Ju Hyun Yoon, Na Young Shim, Su Kyoung Kim and Hyun Jeong Lim

West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Incheon 400-420, Korea

¹Department of Ocean Science, Inha University, 100 Inharo, Incheon, 402-751, Korea

ABSTRACT

PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: PAHs) is the hydrophobic inorganic material composed of carbon and hydrogen that is easily adsorbed biological organisms in the ocean. Bivalves is the indicator of environment monitoring because of reflect growth, physiological response of bivalve followed their habitat environment. The aim of research is understand the change of oysters (*Crassostrea gigas*) physiological response under exposed PAHs concentration for control, 1, 10 and 100 µg/L. We investigated induced immune change response for oyster hemocyte and effect of tissue RNA/DNA ratio for mantle, gill and adductor muscle individually. As a result of experiment change of immune response the oyster hemocyte when exposed PAHs showed that viability and adhesion is no significant difference (ANOVA test, $p < 0.05$). However phagocytosis decreased under the over 10 µg/L of PAHs concentration and ROS increased with the increase of PAHs concentration. The change of RNA/DNA ratio is R/D ratio decreased with the increase of PAH concentration in adductor muscle. However gill and mantle showed no change of R/D ratio with PAHs concentration. The oysters when exposed inorganic pollutant that decreased of physiological condition and damaged protein synthesis of adductor muscle.

Key words: oyster, *Crassostrea gigas*, PAHs, hemocyte, R/D ratio

서 론

해운산업의 발달로 선박을 이용한 화물 운송이 증가함에 따라 해상에서의 선박 사고로 인한 유류 유출 사고가 종종 발생하고 있다. 특히 연안해역에서의 선박 사고로 인한 유류 유출은 수산물에 많은 피해를 유발하게 된다. 서해안에서는 2007

년 12월 태안 앞바다에서 허베이 스피리트호에 의한 다량의 유류 유출 사고가 있었다. 이로 인하여 인근 해역 양식장이 대부분 철거되었으며 수산물의 안전성에도 많은 우려를 자아내게 되었다 (MIFAFF, 2010). 유류 유출 사고가 발생하는 경우, 어장 환경과 수산물 생육 및 식품 안전에 가장 큰 문제가 되는 것은 유류에 포함된 다환방향족탄화수소 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 이다 (Kim *et al.*, 2010). PAHs는 벤젠고리를 기본으로 가진 유기 화합물로 그 성질이 매우 안정하여 잘 분해되지 않는 성질을 가지고 있으며 생물에 농축되기 쉽고 분해가 잘 되지 않아 발암물질 유발원, 돌연변이원이 된다. 유류 유출 사고 외에 대기를 통한 침식, 홍수, 공장이나 축산업으로 인한 폐수 등으로 인하여 해양에 유입되기도 한다 (Hong *et al.*, 2008; Echeveste *et al.*, 2010; Croxton *et al.*, 2012). 소수성이며 용해도가 낮은 PAHs는 입자화되어 해저에 가라앉아 퇴적물에 쌓이거나 조석의 흐름

Received: September 15, 2014; Revised: September 18, 2014; Accepted: September 23, 2014

Corresponding author : Hyun Jeong Lim

Tel: +82 (32) 745-0720 e-mail: limhj@korea.kr
1225-3480/24527

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.

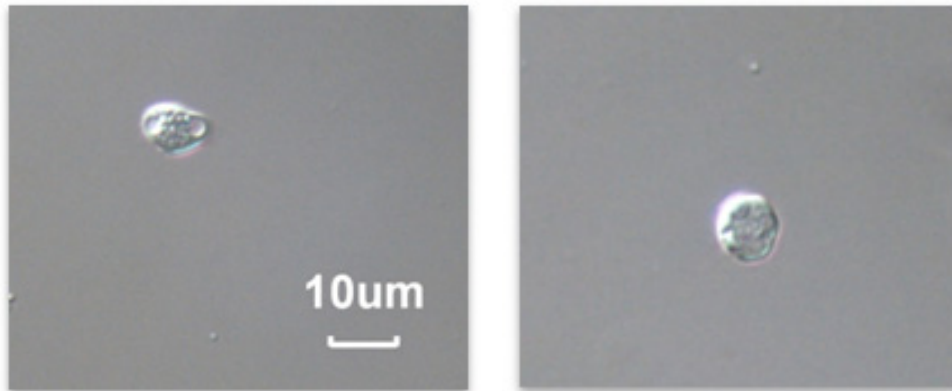


Fig. 1. Examination of representative oyster haemocyte, granulocyte under the microscope ($\times 1000$).

등으로 인하여 조건대로 이동하게 된다. 조건대로 이동한 PAHs는 세포막을 통한 확산으로 인하여 생물 체내로 들어오게 된다. PAHs에 노출된 생물들은 세포의 DNA에 손상을 입어 성장이 저해되거나 색소침착 등과 같은 변형이 유발될 수 있다 (Croxtton *et al.*, 2010; Echeveste *et al.*, 2010; Newmann, 2010). 특히 PAHs 중 benzo[a]pyrene은 잔류기간이 길고 독성도 강하여 더욱 문제화되고 있으며 이러한 특징으로 인해 진주담치와 굴 세포들의 DNA 손상을 유발한다고 보고되었다 (Nacci *et al.*, 1996; Steinert, 1996; Michelmores *et al.*, 1998).

굴과 같은 이매패류들은 조건대에 붙어 여과 섭식을 통하여 서식, 성장을 하여 서식지 환경을 그대로 반영하기 때문에 환경 모니터링의 지표종으로 이용되고 있다. 굴은 생물학적으로 이용할 수 있는 다양한 화학 오염물질들을 축적하므로 환경 요인에 의한 면역 반응의 변화와 같은 생리적 영향을 평가하기에 좋은 실험대상 종이다 (Gagnaire *et al.*, 2006, Mirza *et al.*, 2012). 굴과 같은 이매패류는 일차적으로 폐각을 통하여 외부 물질에 대한 방어를 수행하며, 이후 박테리아, 균류, 기생성 물질 또는 화학 오염물질이 체내에 침입하면 생체를 보호하기 위하여 세포성 면역 반응을 일으킨다. 세포성 면역 반응은 체내를 순환하는 hemocyte에 의해 수행된다. 외부 물질 침입시 hemocyte는 외부 물질 주변으로 이동하여 이물질들을 둘러싼 후 식세포 작용, 효소 반응, 활성산소를 통해 외부 물질을 분해하게 된다 (Sami *et al.*, 1992, Girón-Pérez, 2010). 이에 본 연구에서는 PAHs가 굴의 생리 활성 변화에 미치는 영향을 파악하기 위하여 hemocyte를 이용한 면역 반응과 DNA 정량 분석을 응용한 RNA/DNA 비율 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험구 설정 및 사육 조건

실험에 사용한 굴은 영흥도산으로 각고 85.34 ± 11.91 mm

크기를 사용하였다. 실험 수조는 3 L로 PAHs 농도별 10마리의 굴을 수용하였다. 수온은 20°C, 염분은 30 psu로 조절하였으며, 산소의 공급을 위하여 24시간 aeration시켜주었다. PAHs 농도별 굴의 노출 기간은 7일이었다. PAHs는 미국 환경청 (EPA)에서 지정한 우선 분석 종 16 종 (Naphthalene, Acenaphthylene, Acenaphthene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Pyrene, Fluoranthene, Benzo[a]anthracene, Chrysene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Bibenzo[a,h]anthracene, Indeno[1,2,3-c,d]pyrene, Benzo[ghi]perylene) 이 포함된 PAHs mixture (Accustandard, Inc.) 를 사용하였다. PAHs 농도는 각 수조별 최종 농도가 1, 10, 100 및 200 µg/L 이 되도록 조절하였다.

2. 생리활성 분석

굴의 생리활성은 각 농도별 5마리 굴을 사용하여 분석하였다. 혈구는 21-gauge needle과 1 mL syringe를 사용하여 폐각근에서 600 µL 씩 채취하였다. 채취된 혈구는 삼투압과 응집을 막기 위하여 0.2 µm 여과해수 300 µL 에 혈구 100 µL 를 혼합하여 ice위에 두고 사용하였으며 실험에 사용하기 전 광학현미경하에서 존재의 유무 및 상태를 확인하였다. 면역반응은 flow cytometry (C6 accury, BD Science, USA) 를 이용하여 viability, phagocytosis, adhesion 및 ROS를 분석하였다. 분석 시 입자 크기의 식별을 위해서는 FSC detector 를 사용하였으며, 입자의 과립 등 complexity의 구분을 위해서는 SSC detector를 사용하였다. 형광 강도를 이용한 detector로는 FL-1 (530 ± 15 nm, 녹색), FL-2 (585 ± 20 nm, 오렌지색) 및 FL-3 (670 nm, 적색) 를 사용하였다. 모든 분석은 14 µL/min 의 flow rate로 30초간 진행하였으며, 각 분석 항목의 전처리 는 Hégarret *et al.*, (2003 a, b) 의 방법을 따랐다.

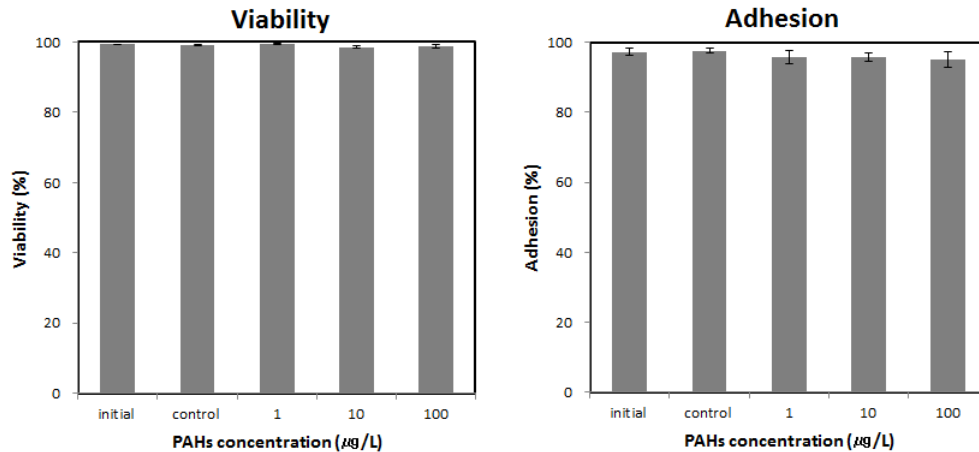


Fig. 2. Viability and adhesion rate of oyster hemocyte exposed to PAHs mixture for 7 days.

1) Viability

0.2 µm 여과해수에 haemolymph를 3:1의 비율로 넣고 SYBR Green (Invitrogen, USA) 과 Propidium Iodide (Sigma, USA) 를 1시간 반응시킨 후 FL-2 히스토그램 plot 에서 분석하였다.

2) Phagocytosis

Phagocytosis는 0.2 µm 여과해수에 haemolymph를 1:1 비율로 넣은 후 2 µm fluorescent microbeads (Polysciences, USA) 를 2시간 반응시킨 후 FL-1 histogram에서 분석하였다.

3) Adhesion

Adhesion은 24 well plate에 0.2 µm 여과해수와 haemolymph를 1:1 비율로 넣고 2시간 정치시킨 후 상층액을 microcentrifuge tube에 옮긴 다음 6% formalin (Junsei, Japan) 과 SYBR Green을 1시간 반응시켜 SSC-FL1 density plot으로 분석하였다. 최종적인 adhesion rate는 viability 분석 시 살아있는 세포에서 adhesion 전처리 후 상층액에 잔존한 세포를 제거하여 계산하였다.

4) ROS (Reactive oxygen species)

0.2 µm 여과해수와 haemolymph를 3:1 비율로 넣고 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA (sigma, USA) 를 넣어 2시간 반응시켰다. DCFH-DA는 세포 내에서 활성산소, 특히 과산화수소와 반응하여 dichlorofluorescein; DCF으로 변하므로 이 형광물질의 강도를 FL1 histogram에서 분석하였다.

3. RNA/DNA 비율 분석

핵산비 함량 분석은 Clemmesen (1994) 의 분석방법을 보완한 Kim *et al.* (2005) 의 방법으로 분석하였다. 즉, PAHs에 노출시키기 전의 굴과 PAHs에 노출시킨 굴의 이가미, 폐각근, 외투막을 분리하여 동결건조시키고 건조된 샘플의 무게는 전자저울 (Sartorius analytic, Germany) 로 소숫점 넷째자리까지 측정하였다. 이후 pH 8의 Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (TE; 5 mM Tris-HCl과 0.5 mM EDTA의 혼합액) 와 Sodium dodecyl acrylamide (SDS, Merck, Germany) 용액을 넣은 후 진동마쇄기 (Qiagen, Germany) 로 파쇄하여 균질화시켰다. 균질화된 시료는 원심분리 후 96 well microplate에 상등액을 분주하였다. 분주한 한쪽 샘플에는 RNase (serva, Germany) 와 ethidium bromide (EtBr, serva, Germany) 을 첨가하여 microplate reader (Thermo Fisher, USA) emission 365 nm 와 excitation 590 nm 에서 형광 강도를 측정하여 RNA와 DNA의 함량을 측정하였다.

4. 통계 분석

PAHs 농도별 혈구의 면적 반응과 RNA/DNA비의 유의차 분석은 OriginPro 8 SRO (ver 8, Origin Lab. Corp., USA) 를 사용하여 one-way ANOVA test로 분산분석한 후 Tuckey test (5% 유의 수준) 로 집단별 차이를 분석하였다.

결 과

1. 굴의 생리 활성

16종 PAHs에 노출된 굴 hemocyte의 viability는 98.56-99.48%로 PAHs 농도별 유의한 차이를 나타내지 않았으며, adhesion rate 또한 95.17-97.60%로 모든 실험구에서

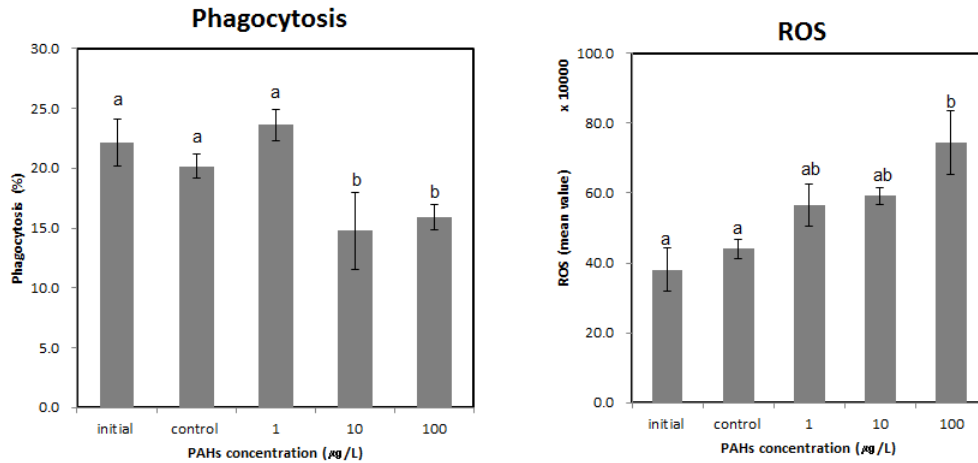


Fig. 3. Phagocytotic rate and ROS value of oyster hemocyte exposed to PAHs mixture for 7 days. Values (mean \pm SE of 5 individuals) with different letters on the bar are significantly different ($p < 0.05$).

유의한 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 2). Phagocytosis는 실험기간 중 1 µg/L까지는 증가하는 경향을 나타내었으나 이후 10 µg/L에서는 감소하는 경향을 나타내었으며, ROS는 1 µg/L부터 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 10 µg/L 이상의 농도에서는 95% 신뢰구간에서 PAHs에 노출되지 않은 굴과 유의한 차이가 있는 것으로 분석되었다 (Fig. 3).

2. DNA/RNA 비율

실험 시작 전 폐각근의 R/D 비율은 4.24 ± 0.71 였으나 일주일간 PAHs에 노출시간 후 R/D 비율은 10 µg/L에서 2.66 ± 0.46 , 100 µg/L에서 2.34 ± 0.40 으로 지속적인 감소의 경향을 나타내었다. 아가미의 R/D 비율은 실험 시작 전 3.60 ± 0.42 이었으며 일주일간 PAHs 노출 후에는 1 µg/L에서 2.89 ± 0.47 , 10 µg/L에서 2.41 ± 0.37 , 100 µg/L에서 2.19 ± 0.22 으로 분석되어 농도별 감소 경향을 파악할 수 있었다. 그러나 95% 신뢰수준에서 유의한 차이는 나타나지 않았다. 외투막은 실험시작 전 4.09 ± 1.15 였으며 PAHs 노출 일주일 후에는 1 µg/L에서 3.27 ± 0.62 , 10 µg/L에서 3.09 ± 0.83 , 100 µg/L에서 3.76 ± 0.91 로 분석되어 농도별 일정한 경향을 나타내지 않았다 (Fig. 4).

고 찰

조간대에 부착하여 서식하는 굴과 같은 이매패류는 외부 환경에 그대로 노출되어 있어 성장과 생리 반응에 환경의 영향을 민감하게 반영하므로 외부 환경 요인의 영향을 파악하기에 좋은 실험대상 종이다. 이매패류의 혈구는 부서진 폐각의 보수, 소화, 영양물질 수송 등의 물리적인 기능을 수행할 뿐 아니라

세포성 면역 기능을 담당한다. 이런 물리적, 생리적 기능을 수행하는 혈구는 granulocyte, hyalinocyte 및 hemoblast cell의 세 그룹으로 대별된다 (Freitas Rebelo *et al.*, 2013). 이 중 phagocytosis는 주로 granulocyte에서 담당한다 (Girón-Pérez, 2010). 따라서 본 연구에서는 granulocyte를 대상으로 면역 반응을 분석하였다 (Fig. 1). Haemocyte를 통한 면역 반응은 유세포 분석기를 이용하여 분석한다. 유세포 분석은 세포 크기의 판별, hemocyte의 생존율, 외부 물질 침입 시 세포의 아메바성 운동으로 외인성 물질을 제거하는 식세포 작용, 항상성 유지를 위해 세포의 대사 물질인 O₂를 측정하는 ROS, 면역 반응시 발생하는 aggregation (adhesion)과 같은 면역 반응의 측정이 가능하다. 유세포 분석은 급변하는 환경 변화의 스트레스로 인해 발생하는 hemocyte의 면역 반응 변화를 빠르고 정확하게 측정할 수 있어 매우 유용하게 이용되고 있다 (Hégaret *et al.*, 2003 a, b, Park *et al.*, 2009). 해상에서의 유류 유출 사고는 수산생물의 서식과 식품 위생에 크게 영향을 미친다. 따라서 본 연구는 유류에 포함된 PAHs가 수산생물의 생리적 기능에 미치는 영향을 파악하고자 flow cytometry를 이용하여 진행하였다.

그 결과, viability와 adhesion은 본 실험이 진행된 PAHs 농도 범위에서 차이가 없는 것으로 조사되었다 (Fig. 2). Giron-Perez (2010)는 굴의 hemolymph는 Benzo(a)pyrene과 phenanthrene에 노출되었을 시 granulocyte의 비율이 증가하여 혈구의 폐사율이 증가하더라도 전체적인 생존율에 변화를 보이지 않는다고 보고하여 본 실험과 일치하는 경향을 보였다. 따라서 혈구의 생존율 분석은 패류의 면역능 분석을 지표로 사용하기에 유용하지 못한 것으로 생각된다. Phagocytosis는 Fig. 3과 같이 1 µg/L PAHs까지는 외인성

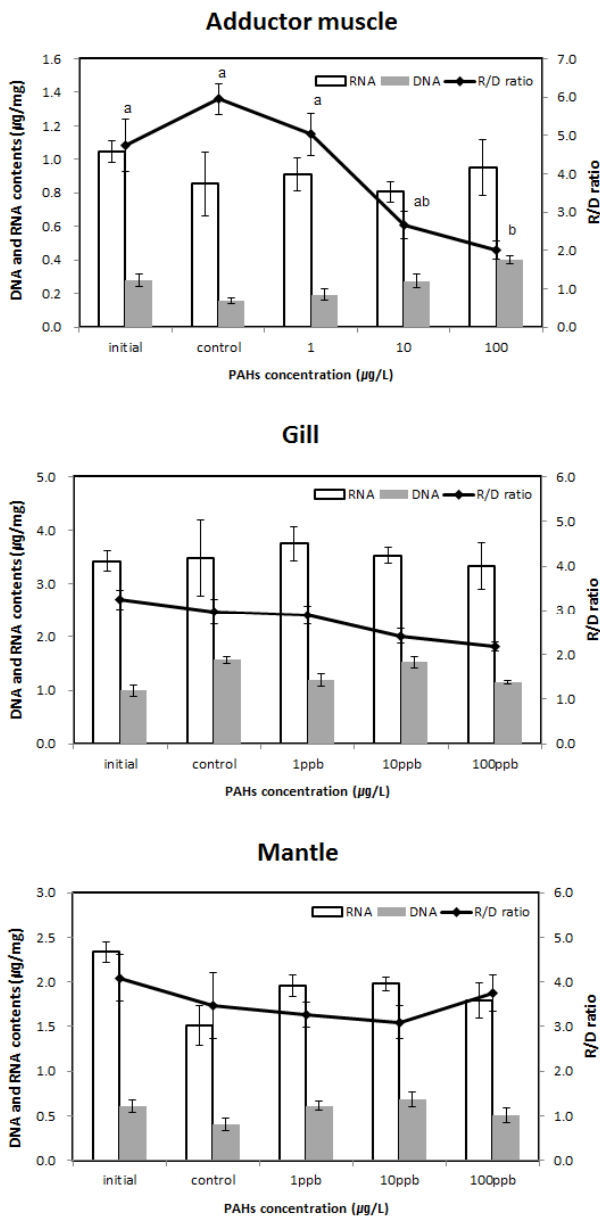


Fig. 4. Changes of R/D ratio of oyster by tissues. Values (mean ± SE of 5 individuals) with different letters on the bar are significantly different ($p < 0.05$).

물질의 자극을 받아 유도되었으나 그 이상의 농도에서는 식세포 작용이 감소하는 것으로 나타났다. 이 결과는 이전의 연구에서 PAHs 5 µg/L의 농도까지 식세포 작용이 증가하도록 유도되지만 이후 농도에서는 감소하는 것을 확인한 결과와 유사하게 나타났다 (Croxtton *et al.*, 2012). Hannam *et al.*, (2010) 는 PAHs에 노출된 패류들은 대부분 PAHs에 노출된 후에 식세포 작용이 감소하는 경향을 보이게 되는데 이는

PAHs에 노출된 이후 세포막의 유동성이 감소하는 것과 연관되어 있다고 보고했다. 즉, 세포막에서 진행되는 endocytosis가 정상적으로 이루어지지 않아 식세포 작용이 감소한다고 보고하였다. 따라서 본 실험을 통하여 PAHs 10 µg/L 이상의 농도에서는 혈구 세포막의 유동성이 감소한 것으로 판단된다. 이외에 식세포 작용은 haemocytes의 운동 능력을 같이 판별할 수 있다 (Ganaire *et al.*, 2006). 따라서 패류에서 phagocytosis의 분석은 면역능, 나아가 생리적 활성도를 판단하는 유용한 지표로 사용 가능한 것으로 여겨진다. 외부물질의 침입에서 방어하기 위한 기작 중 하나인 ROS는 응집력이 발생한 이후 반응하는 단계로 granulocyte와 agranulocyte에서 모두 발생하는 반응이다. Fig. 3에서와 같이 PAHs의 농도가 증가 할수록 ROS의 양도 증가하는 것으로 나타났다. Giron-Perez (2010) 은 PAHs 이외의 잔류성 유기 오염 물질에 노출된 굴에서도 ROS의 양이 증가한다고 보고하였다. Hannam *et al.* (2010) 은 PAHs 중 하나인 phenanthrene에 노출된 가리비의 경우 PAHs의 중간대사물질인 quinones이 세포막 내 thiol기와 강한 친화력을 가져 생체 내에 과산화물질들을 생성하게 되어 활성산소의 양이 증가하게 된다고 보고하였다. 본 연구에서도 ROS의 양은 PAHs의 농도가 높아질수록 증가하는 경향을 나타내어 상기 연구들과 일치하는 경향을 나타내었다.

RNA는 DNA에 의해 전사되어 단백질 합성이 가능하게 되는데 환경이 변화하게 되면 생존을 위한 단백질 합성 양의 차이가 발생하게 된다 (Kim *et al.*, 2009). 따라서 체내의 단백질 합성이나 생체 유지에 관한 간접적인 지표로 핵산 함량비를 이용하는 것이 가능하다. 이러한 사실에 근거하여 PAHs에 직접 노출된 굴의 haemolymph 면역반응과 더불어 RNA/DNA 비율을 측정하여 PAHs가 굴의 생체에 영향을 미치는지 확인하였다. 폐각근은 글리코젠을 저장하는 에너지 저장소로 이용된다. 폐각근은 이매패류의 폐각을 여닫는 기능적 문제에 관여하며 조직이 손상을 입게 되면 RNA/DNA 비율이 감소하게 된다. Fig. 4를 보면 PAHs의 농도가 증가함에 따라 R/D 비율이 감소하는 경향을 보여 PAHs에 노출되면 단백질 합성이 저해 받는 것을 확인할 수 있었다. Hanoutene *et al.* (2002) 는 comet assay로 패류 DNA가 PAHs 노출에 영향을 받는지 조사한 결과 낮은 농도의 PAHs에 노출이 되어도 DNA가 손상이 된다고 본 실험과 같은 결과를 보고한 바 있다. 또한 본 실험의 결과는 폐각근에서의 단백질 합성이 먹이에 의한 환경 변화보다 PAHs와 같은 외인성 물질에 더 밀접한 영향을 받는 것으로 보인다는 Kim *et al.* (2009)의 주장과도 일치한다. 아가미는 호흡과 먹이를 거르는 역할을 하므로 PAHs에 노출되는 경우, 아가미 조직의 R/D 비율 감소를 예상하였다. 그러나 본 실험 결과, R/D 비율이 감소하는 경향을 보이기는 했으나

유의한 차는 나타내지 않았다. 그러므로 향후 본 실험보다 높은 PAHs 농도에서 R/D 비율의 변화를 확인할 필요가 있을 것으로 여겨진다. 이외 외투막은 폐각근이나 아가미의 R/D 비율 변화와 다른 패턴을 나타내었다. 이는 외투막의 기능이 대사 물질의 수송과 먹이를 운반하는 역할과 폐각 손상 시 보수를 담당하는 역할이므로 외부 환경에 즉각적으로 변화하지 않는 것으로 보이며 또한 외투막의 R/D 비율은 유기오염물질에 의한 환경 변화보다는 다른 요인에 따라 반응을 나타내는 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합하면 굴은 10 µg/L 이상의 PAHs 농도에서 면역 기능과 단백질 합성 기능이 감소한다. Bushek *et al.* (2007) 은 직접적으로 PAHs에 다량 노출된 굴의 유생은 성장이 저해되고 면역 활성 기능이 떨어져 *Perkinsus marinus*와 같은 질병에 감염이 쉽다고 하였다. 이처럼 PAHs에 노출된 굴일수록 주변 환경의 변화에 능동적 대처가 불가해지며, 병원생물 등 질병에 대한 저항력이 약해지므로 해양 환경의 유기오염물질에 대한 관리가 필요할 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물학원 연구사업 “갯벌참굴 양식생산성 향상 연구 (RP-2014-AQ-99)” 의 일환으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Bushek, D., Heidenreich, M. and Porter, D. (2007) The effects of several common anthropogenic contaminants on proliferation of the parasitic oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Marine Environmental Research*, **64**: 535-540.
- Clemmesen, C. (1994) The effect of food availability, age or size on the RNA and DNA content in individual measured herring larvae: laboratory calibration. *Mar. Biol.*, **118**: 377-382.
- Croxtan, A.N., Wikfors, G.H. and Schulerbrandt-Gragg, R.D. (2012) Immunomodulation in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to a PAH-contaminated, microphytobenthic diatom. *Aquatic toxicology*, **118-119**: 27-36.
- Echeveste, P., Agusti, S. and Dachs, J. (2010) Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations. *Environmental Pollution*, **158**: 299-307.
- Freitas Rebelo, M., Souza Figueiredo, E., Mariante, R.M., Nobrega, A., Barros, C.M., and Allodi, S. (2013) New Insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PLOS ONE*, **8**: 1-6.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T.h. and Renault, T. (2006) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes : Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*, **22**: 1-14.
- Girón-Pérez, M.I. (2010) Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *ISJ*, **7**: 149-156.
- Hannam, M.L., Bamber, S.D., Moody, A.J., Galloway, T.S. and Jones, M.B. (2010) Immunotoxicity and oxidative stress in the Arctic scallop *Chlamys islandica*: Effects of acute oil exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**: 1440-1448.
- Hamoutene, D., Payne, J.F., Rahimtula, A. and Lee, K. (2002) Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, **54**: 471-474.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. and Soudant, P. (2003a) Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation I. Haemocyte type and morphology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **293**: 237-248.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H. and Soudant, P. (2003b) Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **293**: 249-265.
- Hong, Y.W., Yuan, D.X., Lin, Q.M. and Yang, T.L. (2008) Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin*, **56**: 1400-1405.
- Kim, P.H., Kim, M.J., Jo, M.R., Lee, D.S., Song, K.S., Byun, H.S., Cho, K.C., Park, K.J., Jun, J.C. and Yoon, H.D. (2010) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Hazard Assessment of shellfish due to Oil Spill Accidents. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.*, **43**(3): 211-216.
- Kim, S.K., Rosenthal, H., Clemmesen, C., Park, K.Y., Kim, D.H., Choi, Y.S. and Seo, H.C. (2005) Various methods to determine the gonadal development and spawning season of the purplish Washington clam, *Saxidomus purpuratus* (Sowerby). *J. Appl. Ichthyol.*, **21**: 101-106.
- Kim, S., Lee, C., Kim, Y.D., Jo, Q., Lee, J.H., Park, M.W., Kim, J.W., and Gong, Y.G. (2009) Histological and biochemical analyses on reproductive cycle of *Gomphina melanaegis* (Bivalvia; Veneridae). *J. Kor. Fish. Soc.*, **42**(1): 41-47.
- MIFAFF, (2010) Detailed survey and restoration after oil spill in Taean costal fisheries. MIFAFF: 498p.
- Mitchelmore, C.L., Birmelin, C., Chipman, J.K. and Livingstone, D.R. (1998) Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells. *Aquatic toxicology*, **41**: 193-212.
- Mirza, R., Mohammadi, M., Sohrab, A.D., Safahieh, A., Savari, A. and Hajeb, P. (2012) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seawater, Sediment, and Rock oyster *Saccostrea cucullata* from the Northern Part

- of the Persian Gulf (Bushehr Province). *Water Air Soil Pollut*, **223**: 189-198.
- Nacci, D.E., Cayula, S., and Jackim, E. (1996) Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic toxicology*, **35**: 197-210.
- Newman M.C. (2010) Fundamentals of Ecotoxicology. CRC Press, Inc, Boca Raton.
- Park, K.I., Choi, M.S. Park, S.W., Park, K.H., Choi, S.H. and Yoon J. M. (2009) Cellular Immune responses of the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Exposed to Cadmium Chloride. *Korean J. Malacol.*, **25**(2): 135-143.
- Sami, S., Faisal, M. and Huggett, R.J. (1992) Alterations in cytometric characteristics of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated environment. *Marine Biology*, **113**: 247-252.
- Steinert, S.A. (1996) Contribution of Apoptosis to Observed DNA Damage in Mussel Cells. *Marine Environmental Research*, **42**(1-4): 253-259.