

납 (Pb) 에 노출된 굴 *Crassostrea gigas*의 사망률, 산소소비율 및 기관계 구조의 변화

신윤경, 주선미¹, 박정준², 진영국², 임현식³, 이정식¹

국립수산과학원 남동해수산연구소, ¹전남대학교 수산생명의학과, ²국립수산과학원 남해수산연구소, ³목포대학교 해양수산자원학과

Changes of Mortality, Oxygen Consumption Rate and Organ Structure in the Oyster *Crassostrea gigas* Exposed to Lead

Yun Kyung Shin, Sun Mi Ju¹, Jung Jun Park², Young Guk Jin², Hyun Sig Lim³
and Jung Sick Lee¹

Southeast Sea Fisheries Research Institute, NIFS, Tongyeong 39768, Korea

¹Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

²South Sea Fisheries Research Institute, NIFS, Yeosu 59780, Korea

³Department of Marine and Fisheries Resources, Mokpo National University, Muan 58554, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to find out biological response of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to lead (Pb). Experimental period was four weeks. Experimental groups were composed of one control condition and three lead exposure conditions (0.20, 0.40 and 0.80 mg/L). The results of the study confirmed that lead induces reduction of survival rate and oxygen consumption rate and degeneration of organ structure of the bivalve. Oxygen consumption rate was observed exposure groups lower than control decline by 15%-55%. Histological analysis of organ system illustrated expansion of hemolymph sinus, degeneration of epithelial layer and connective tissue layer of the mantle. Also, epithelial degeneration and disappearance of cilia band are recognized in the gill filament and it was observed disruption of epithelial layer and degeneration of basophilic cell and epithelial cell in the digestive tubules.

Keywords: *Crassostrea gigas*, Lead (Pb), Mortality, Oxygen consumption, Histopathology

서 론

수서생물에게 미치는 스트레스는 그 특성에 따라 물리, 화학 및 생물학적 요인으로 구분된다. 중금속은 비중 4.0 이상의 금속 원소의 화학적 스트레스 요인으로 필수원소와 비필수원소로 구분한다. 필수원소들은 구리 (Cu), 철 (Fe), 아연 (Zn), 망간 (Mn) 등으로 생물대사의 다양한 생화학적 과정에서 중요한

역할을 한다. 비필수원소들은 납 (Pb), 카드뮴 (Cd), 수은 (Hg), 비소 (As), 크롬 (Cr) 등으로 생물대사의 저해 및 수서생태계의 주요 환경오염원으로 작용한다 (Viarengo, 1985; Fichet *et al.*, 1998).

중금속 가운데 납에 의한 수서 무척추동물의 생물독성은 *Artemia salina*, *Crassostrea gigas* 및 *Paracentrotus lividus* 유생 발생과정의 이상 (Fichet *et al.*, 1998), *Perna viridis*의 아가미와 소화선의 구조적 이상에 따른 기능의 저하 (Vasanthi *et al.*, 2012) 그리고 바지락 *Ruditapes philippinarum*의 생물지표 변화 (Shin *et al.*, 2013) 등이 보고되고 있다.

환경요인에 의한 생물 위해도 평가는 위험성 확인 (hazard identification), 노출평가 (exposure assessment), 용량-반응 평가 (dose-response assessment) 및 위해도 결정 (risk characterization) 의 주요 4단계이다 (NRC, 1983). 이러한

Received: February 16, 2016; Revised: March 21, 2016;
Accepted: March 30, 2016

Corresponding author : Jung Sick Lee

Tel: +82 (61) 659-7172, e-mail: ljs@jnu.ac.kr
1225-3480/24604

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.

생물 위해도 평가를 위해서는 지표생물 (indicator organism) 과 생물지표 (biomarker) 의 선정이 중요하다.

이때패류는 중요한 지표생물 가운데 하나로 주로 여과섭식에 의해 먹이를 섭취하기 때문에 환경오염원에 쉽게 노출된다. 또한 이동성이 낮아 일생동안 서식범위가 국한되어 있고, 체내로 유입된 오염원들의 체내에서 해독과 체외방출이 낮아 특정 지역의 오염상태를 알아보기 위한 지표종으로 많이 사용되고 있다 (Marin *et al.*, 2006; Schintu *et al.*, 2008; Husmann *et al.*, 2012).

우리나라에서 굴 *Crassostrea gigas*은 수산학적 측면에서 매우 중요한 패류자원 가운데 하나로서 해양생태계의 관리, 생물자원의 보존 및 수산물 안전성 측면에서 관리가 필요한 종이다. 본 연구에서는 굴에 미치는 납의 독성을 사망률, 산소소비율 및 조직학적 지표 등을 이용하여 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에서는 각고 7.0-8.0 cm 의 굴 *Crassostrea gigas* 성체를 실험에 사용하였다. 시험물질인 납은 $PbCl_2$ (Lead Chloride, Shinyo Pure Chem. Co., Japan) 를 증류수로 1000 mg/L 의 표준용액을 만든 다음, 실험 농도별로 희석하여 조제하였다.

2. 방법

1) 농도구

급성독성 실험의 농도구는 Watling and Watling (1982), Viarengo (1985) 그리고 Shin *et al.* (2013) 의 보고를 이용하여 13개 농도구를 설정하였다. 각 농도구에서 2회 반복실험을 실시하여 LC_{50-96h} 을 구한 다음, 이를 기준으로 1개의 대조구와 3개의 납 노출구 (0.20 mg/L, 0.40 mg/L, 0.80 mg/L) 를 설정하였다.

2) 사육조건

본 실험에서 사용된 수조는 유리로 제작된 30 L 의 지수형 수조였다. 실험생물들을 채집한 후, 1주일 동안 순치시킨 다음 노출실험을 실시하였다. 만성독성 실험의 노출실험 기간은 4주였다. 각 농도구당 노출되어진 개체들은 밀도를 고려하여 각각 20-30개체였다. 실험기간 동안 광주기는 자연조건으로 하였으며, 수온은 $17 \pm 0.5^\circ C$ 였다. 먹이는 식물플랑크톤인 *Isochrysis galbana*를 개체 당 $1-2 \times 10^6$ cell/mL 씩 3일에 1회 공급하였고, 실험 중 실험 개체들의 분비물로 인한 사육수의 변화와 중금속 농도변화를 최소화하기 위해 3일에 한 번씩 사육수를 교환하였다.

3) 사망률 분석

실험생물의 사망여부는 폐각을 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) 산소소비율 분석

산소소비율은 Shin *et al.* (2006) 의 방법에 따라 실험생물의 호흡에 의한 산소 소비량을 측정하여 표시하였다. 산소소비량은 실험생물의 크기에 따라 0.5-1.6 L 의 respirometer chamber 와 산소검량기 (Isteck, 915PDC) 를 이용하여 측정하였다.

5) 조직학적 분석

굴의 각장 등 측정형질을 계측한 후, 해부하여 외투막, 아가미 그리고 소화맹장이 포함된 내장낭 일부를 적출하였다. 광학현미경 조직표본 제작은 적출한 시료들을 Bouin 용액에 24시간 동안 고정하고, 48시간 동안 흐르는 물에 수세하였다. 파라핀 절편법에 의해 4-6 μm 두께로 연속절편하여 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.

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

납 노출에 의한 굴의 4주 동안의 사망률은 Fig. 1에 나타난 것처럼 대조구와 0.20 및 0.40 mg/L 노출구에서는 0%였다. 하지만, 0.80 mg/L 의 납 노출구에서는 노출 1주 후부터 노출 종료기 까지 약 5%의 누적사망률을 보였으나 대조구와 비교하여 유의차는 없었다.

2. 산소소비율

납 노출에 의한 굴의 호흡 반응은 Fig. 2에 나타난 것처럼 대조구에 비해 모든 납 노출구에서 산소소비율은 노출 1주 후부터 감소하였다. 이후, 산소소비율은 큰 폭으로 변화하여 노출 종료기인 4주 후에는 대조구에 비해 각 노출구 별로 약 15-55%의 감소를 나타내었다.

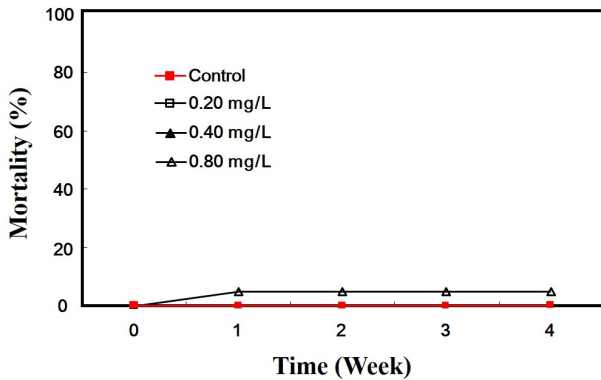


Fig. 1. Mortality of *Crassostrea gigas* exposed to lead for 4 weeks.

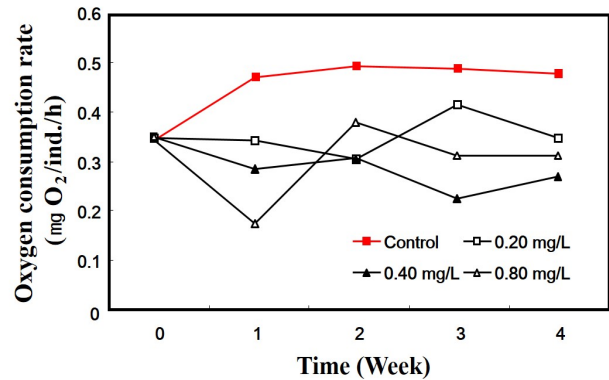


Fig. 2. Oxygen consumption rate of *Crassostrea gigas* exposed to lead for 4 weeks.

3. 기관계의 조직학적 변화

1) 외투막

굴의 외투막은 조직학적으로 폐각 쪽의 외부상피층, 가운데 부분의 결합조직층 및 외투강에 인접한 내부상피층으로 구성된다. 외투막의 외부상피층과 내부상피층은 모두 단층으로 원주형 상피세포와 점액세포들로 이루어져 있다. 원주형 상피세포들은 정단면에 섬모를 가지며, AB-PAS (pH 2.5) 반응 결과, 점액세포들은 붉은색과 푸른색으로 반응하였다. 결합조직층은 교원섬유와 일부 근섬유들로 구성되며, 여러 곳에 직경이 다양한 혈림프동을 가진다 (Fig. 3A and B). 0.20 mg/L 농도의 납에 노출된 굴의 외투막 상피층에서는 모든 개체가 부분적

인 상피세포의 정단섬모들의 탈락, 상피세포의 파괴 및 일부 상피층의 탈락현상을 나타냈으며, 점액세포의 활성화가 뚜렷했다. 그리고 결합조직층에서는 공포화 및 혈림프동의 확장이 관찰되었다 (Fig. 3C). 0.40 mg/L의 납 노출구에서는 상피세포의 정단섬모 탈락, 상피세포의 파괴 및 상피층의 탈락현상이 더욱 심하게 나타났다. 결합조직층에서는 공포화의 진행, 교원섬유의 분절화와 혈림프동의 확장 및 혈구의 증가가 나타났다 (Fig. 3D). 가장 높은 농도구인 0.80 mg/L의 납 노출구에서 대부분 개체들의 외투막 상피층의 탈락 및 점액의 산성화가 확인되었다. 결합조직층에서는 교원섬유 다발의 갈라짐, 결합조직층의 공포화 및 파괴가 뚜렷했다 (Fig. 3E and F).

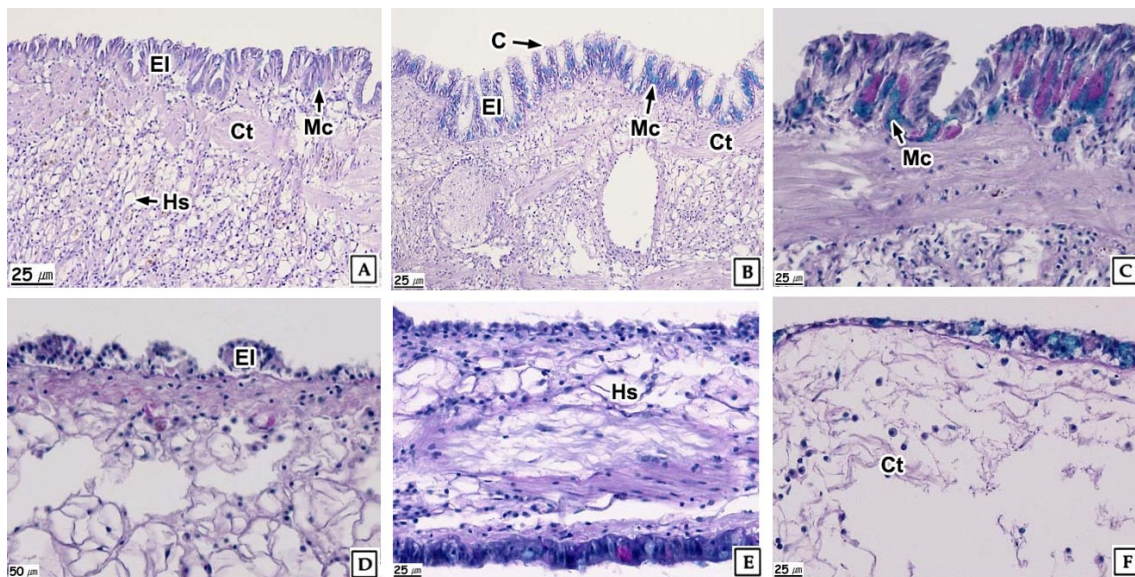


Fig. 3. Histopathology of mantle of *Crassostrea gigas* exposed to lead. **A** and **B**: control. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **C**: 0.20 mg/L. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **D**: 0.40 mg/L. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **E** and **F**: 0.80 mg/L. AB-PAS (pH 2.5) reaction. C: cilia, Ct: connective tissue, EI: epithelial layer, Hs: hemolymph sinus, Mc: mucous cell.

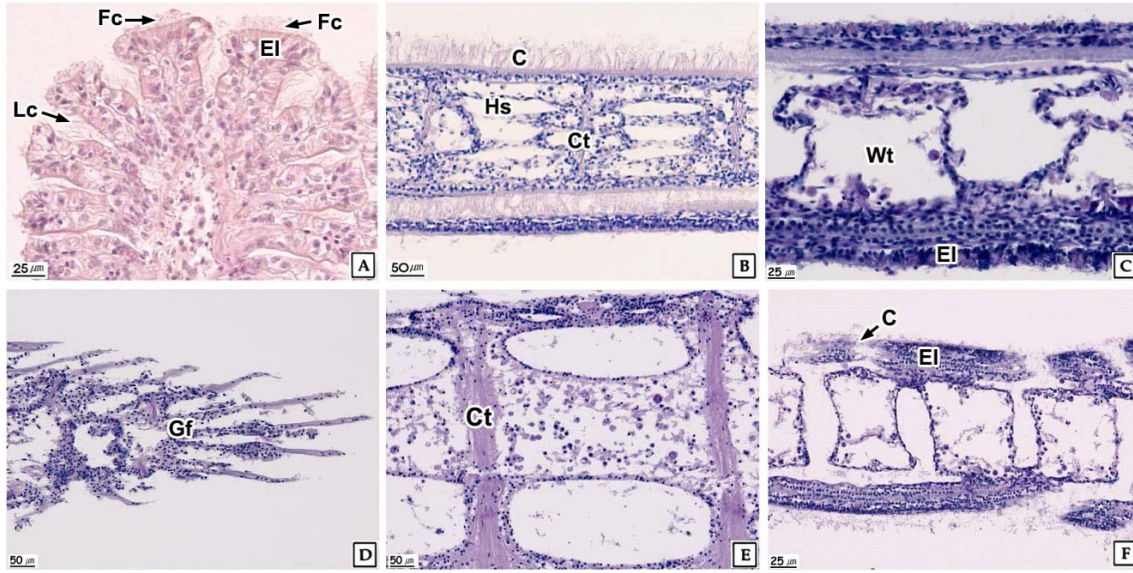


Fig. 4. Histopathology of gill of *Crassostrea gigas* exposed to lead. **A:** control. H-E stain. **B:** control. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **C and D:** 0.20 mg/L. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **E:** 0.40 mg/L. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **F:** 0.80 mg/L. AB-PAS (pH 2.5) reaction. C: cilia, Ct: connective tissue, EI: epithelial layer, Fc: frontal cilia, Gf: gill filament, Hs: hemolymph sinus, Lc: lateral cilia, Wt: water tube.

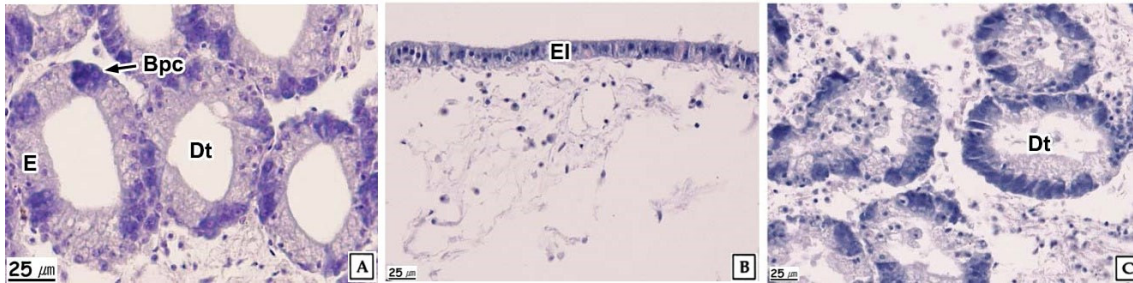


Fig. 5. Histopathology of digestive diverticulum of *Crassostrea gigas* exposed to lead. **A:** control. H-E stain. **B:** 0.40 mg/L. H-E stain. **C:** 0.80 mg/L. H-E stain. Bpc: basophilic cell, Dt: digestive tubule, E: epithelium, EI: epithelial layer.

2) 아가미

굴의 아가미는 판상형으로 다수의 새엽들로 구성되는데, 각각의 새엽 상피층은 단층으로 상피세포와 점액세포들로 이루어져 있다. 새엽 상피세포들은 원주형으로 자유면에 정단섬모대와 측면섬모대가 발달되어 있다 (Fig. 4A and B). 0.20 mg/L 농도의 납에 노출된 개체의 아가미에서는 새엽 상피층의 다층화 및 변형, 측면섬모의 탈락 그리고 새엽 상피층의 부분적인 탈락이 관찰되었다 (Fig. 4C and D). 0.40 및 0.80 mg/L의 납 노출구에서는 혈구의 증가, 새엽 상피층의 부분적인 탈락 및 새엽의 붕괴 그리고 수관 경계를 이루는 결합조직층의 변성이 확인되었다 (Fig. 4E and F).

3) 소화맹낭

소화맹낭은 다수의 소화선세포들로 구성되는데, 소화선세포

의 상피층은 단층으로 섬모원주형 상피세포와 호염기성세포들로 이루어져 있다. H-E 염색결과, 호염기성세포의 세포질은 헤마톡실린에 반응하여 푸른색을 나타낸다 (Fig. 5A). 0.20 mg/L의 납에 노출된 굴의 소화선세포에서 조직학적 변성은 뚜렷하지 않았다. 하지만, 0.40 및 0.80 mg/L 농도의 납에 노출된 굴의 내장낭 외막 상피층에 존재하는 섬모의 탈락이 관찰되었다. 이들의 소화맹낭에서는 결합조직층 파괴와 소화선세포 상피세포의 위축 및 붕괴, 호염기성세포의 핵 및 세포질 변형 그리고 소화선세포의 내강에 혈구의 출현 등이 확인되었다 (Fig. 5C and D).

고 찰

화학물질의 생물독성을 평가하는 매우 유용한 수단 가운데

하나인 생물지표는 중 및 오염원특이성을 가지는데 (Huggett *et al.*, 1992), 사망률 역시 이러한 특이성을 가진다. 납 노출에 의한 바지락 *Ruditapes philippinarum*의 4주 동안의 사망률은 대조구에서 0%였으나 0.25, 0.50 및 1.00 mg/L의 농도구에서는 7.0-20.0%의 누적사망률을 보였다 (Shin *et al.*, 2013). 본 연구에서 4주 동안 납 노출에 의한 굴의 사망률은 대조구와 0.20 및 0.40 mg/L 노출구에서는 0%였다. 하지만, 0.80 mg/L의 납 노출구에서는 노출 1주 후부터 노출 종료기까지 약 5%의 누적사망률을 보였다.

중금속 및 유기물 증가 등에 의한 수서환경의 악화는 수중의 용존산소 농도를 감소시키며, 용존산소 양이 감소되면, 이매패류들은 일정기간 동안 호흡률을 저하시켜 대사반응을 최소화한다. 생물체의 호흡반응을 나타내는 생물지표 가운데 하나인 산소소비율 역시 이러한 경향을 보인다. TBTCI, 수은, 카드뮴에 노출된 총알고둥 *Littorina brevicula* (Chin *et al.*, 1999), 구리에 노출된 진주담치 *Mytilus edulis* (Brown and Newell, 1972), 카드뮴과 아연에 노출된 *Perna viridis* (Cheung and Cheung, 1995), 은과 크롬에 노출된 *Perna viridis* (Vijayavel *et al.*, 2007) 그리고 납에 노출된 바지락의 산소소비율은 감소하다가 다시 증가하는 변화 경향을 보였다 (Shin *et al.*, 2013). 본 연구에서도 납에 노출된 굴 *Crassostrea gigas*의 산소소비율 역시 노출시간 및 농도에 따라 차이는 있지만, 전체적으로 기존의 결과들과 유사한 경향을 보였다.

이매패류에서 화학물질 및 중금속 등의 오염원들은 외투막, 아가미, 신장, 발 그리고 소화맹낭에 주로 축적되며 (Morrison, 1993). 직간접적으로 이들은 수서생물의 기관계 구조의 변화를 일으켜 생리학적 불균형을 초래한다 (Gregory *et al.*, 1999; Otludil *et al.*, 2004).

이매패류에서 외투막은 감각, 폐각형성 및 외투강 정화 기능을 수행하는 기관계이다 (Eble, 2001). 수중오염원에 의한 이매패류의 외투막 이상은 상피층의 정단부에 존재하는 선조연과 섬모들이 탈락, 상피세포의 변성, 점액세포들의 활성 변화, 결합조직층에서 교원섬유와 근섬유 다발의 변성을 들 수 있다.

노닐페놀에 노출된 바지락의 외투막 결합조직층에서 혈림프동의 확장, 혈구의 증가, 상피층 자유면의 선조연 탈락, 결합조직층의 근섬유 다발의 분절과 산성 점액세포의 증가가 확인되었다 (Park and Lee, 2011). 납에 4주 동안 노출된 바지락의 외투막에서도 상피층의 변성을 비롯한 다양한 조직학적 이상을 보였다 (Shin *et al.*, 2013). 납에 노출된 굴의 외투막에서는 상피세포 변형, 상피층 선조연과 섬모의 소실, 점액세포의 변성 그리고 결합조직층의 파괴가 관찰되었는데 이러한 외투막의 구조적 이상은 정상적인 외투강 정화기능의 장애 및 폐각형태의 기형 등을 유발할 것으로 판단된다.

이매패류의 아가미는 호흡뿐 만 아니라 여과섭식 기능을 수행하는 중요한 기관계 가운데 하나이다 (Benninger *et al.*, 1988; Eble, 2001). 수중의 구리, 염소, 철에 노출된 굴, 진주담치, 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). DDT와 PCB에 오염된 핀란드의 해안에서 채집된 진주담치의 아가미에서는 정단상피와 측면상피의 붕괴와 측면섬모의 탈락이 나타났다 (Sunila, 1988). 수은에 노출된 *Perna viridis* (Gregory *et al.*, 1999) 와 중금속 오염지역에서 채집된 *P. viridis*의 아가미에서도 이와 유사한 아가미의 구조적 이상이 보고되고 있다 (Vasanthi *et al.*, 2012). 납에 4주 동안 노출된 바지락의 아가미에서도 주로 새엽의 구조적 이상현상과 호흡률의 변화를 보였다 (Shin *et al.*, 2013). 납에 노출된 굴의 아가미 새엽에서도 구조적 변성을 보였는데 이러한 결과는 본 연구 결과의 산소소비율의 변화를 유도하는 원인 가운데 하나이며, 또한 이들의 여과섭식 기능의 장애를 유발하는 것으로 생각된다.

이매패류에서 소화맹낭의 소화선세포는 소화, 흡수 및 외부 이물질 등의 해독기능을 수행하는데, 소화맹낭은 다른 기관에 비해 오염원의 축적성이 높다 (Da Ros *et al.*, 2000; Moore and Allen, 2002). 특히, 아연, 구리, 카드뮴, 망간의 농도는 외투막과 아가미에 비해 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 노출된 지중해담치 *Mytilus galloprovincialis*의 소화선세포에서는 세관 상피세포의 정단섬모가 소실되었다 (Soto *et al.*, 1996). 구리 오염지역의 진주담치 소화선세포에서는 내강의 팽창이 관찰되며, 오염의 정도가 심한 지역에서 채집한 개체들은 호흡기성세포의 비율이 높고, 소화세포의 비율은 낮다 (Zorita *et al.*, 2006). 30일 동안 0.227 mg/L의 니켈에 노출된 *Lammellidaens marginalis*의 소화선세포는 상피층의 파괴와 기저막 분리현상을 보인다 (Andhale *et al.*, 2011). Shin *et al.* (2013) 은 바지락을 4주간 납에 노출시킨 결과, 소화선세포의 상피세포와 호흡기성세포의 변화와 파괴를 관찰하였으며, 이러한 구조적 이상은 소화선의 소화, 흡수, 분비 및 해독 작용 등의 정상적인 대사활동이 불가능할 것으로 고찰하였다. 본 연구에서도 0.40 및 0.80 mg/L 농도의 납에 노출된 굴의 내장낭 외막 상피층의 변성, 소화맹낭 결합조직층 파괴와 소화선세포 상피세포 및 호흡기성세포의 변성 등이 확인되어 기존의 연구들과 유사한 결과를 보였다.

요 약

본 연구는 납에 노출된 굴 *Crassostrea gigas*의 생물학적 반응을 알아보고자 하였다. 실험기간은 4주였으며, 실험구는 대조구 1개와 납 노출구 3개 (0.20, 0.40 and 0.80 mg/L) 였다. 실험 결과 납은 굴의 생존율과 산소소비율의 저하 및 기관계의 조직학적 변성을 유도하는 것이 확인되었다. 산소소비율은 대조구에 비해 납 노출구에서 15-55% 감소하였다. 기관계의 조직학적 분석 결과, 외투막에서는 혈림프동의 팽창, 상피층과 결합조직층의 변성을 보였다. 아가미에서는 세엽 상피세포의 변성과 섬모대의 소실이 확인 되었으며, 소화선세포에서는 상피세포와 호염기성세포의 변성 및 상피층의 파괴가 관찰되었다.

사 사

이 논문은 2015년도 국립수산물과학원 수산시험연구소사업 (RP-2016-AQ-020) 의 지원으로 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**(4): 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**(2): 61-70.
- Brown, B.E. and Newell, R.C. (1972) The effect of copper and zinc on the metabolism of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, **16**(2): 108-118.
- 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**(5): 593-600.
- Da Ros, L., Nasci, C., Marigómez, I. and Soto, M. (2000) Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. *Marine Environmental Research*, **50**: 417-423.
- 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.
- 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.
- Fichet, D., Radenac, G. and Miramand, P. (1998) Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Marine Pollution Bulletin*, **36**(7): 509-518.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 inaequalvis*) 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 cornus* (Gastropoda, Pulmonata): a histopathological study. *Chemosphere*, **56**(7): 707-716.
- Park, J.S. and Lee, J.S. (2011) Change of reproductive and histological biomarkers of *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae) exposed to nonylphenol. *The Korean Journal of Malacology*, **27**(3): 181-190.

- 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., Kim, B.H. Oh, B.S., Jung, C.G., Sohn, S.G. and Lee, J.S. (2006) Physiological responses of the ark shell, *Scapharca broughtonii* (Bivalvia: Arcidae) to decrease in salinity. *Journal of Fisheries Sciences and Technology*, **9**(4): 153-159.
- 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. *The Korean Journal of Malacology*, **29**(1): 7-13.
- 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**(5): 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**(1): 137-141.
- 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**(1): 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**(6): 979-986.
- Watling, H.R. and Watling, R.J. (1982) Comparative effects of metals on the filtering rate of the brown mussel, *Perna perna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **29**(6): 651-657.
- 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.