

# 바지락 조직병리 연구를 위한 조직시료 처리에 관하여

조영관<sup>1</sup>, 강현실<sup>2</sup>, 유용운<sup>2</sup>, 정희도<sup>1</sup>

<sup>1</sup>국립수산과학원 기후환경연구부 갯벌연구센터, <sup>2</sup>국립수산과학원 아열대수산연구소

## Histological Techniques Used in Pathologic Survey of Manila Clam *Ruditapes philippinarum*

Young-Ghan Cho<sup>1</sup>, Hyun-Sil Kang<sup>2</sup>, Yongwoon Ryu<sup>2</sup> and Hee-Do Jeung<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tidal Flat Research Center, National Institute of Fisheries Science (NIFS), Gunsan 540042, Korea

<sup>2</sup> Subtropical Fisheries Research Institute, NIFS, Jeju 63068, Korea

### ABSTRACT

Occurring in a high density on numerous tidal flats on the west coast, Manila clam *Ruditapes philippinarum* is one of the crucial shellfish resources on the west coast of Korea where clams are explored on a commercial scale. Histology has been utilized in monitoring clam populations by providing detailed insights into the health, reproduction, and overall condition of clam populations. This study provides comprehensive guidelines involved in sample processing, tissue slide preparation, digitizing, and subsequent image analysis. These technical details for each step are expected to standardize mollusk tissue research by ensuring accurate and reproducible results for researchers.

**Keywords:** Histopathology, Technical guidelines, Mollusks tissue, Microscopic observations

### 서 론

바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 은 우리나라 전 연안에 서식하는 대표적인 이매패류로, 특히 서해안 갯벌에 있어 바지락은 가장 중요한 연체동물 자원이다 (Park *et al.*, 2013). 우리나라 바지락 생산량은 연간 30,000-50,000 톤으로, 이 중 대부분은 서해안의 경기만, 충남 태안 및 전북 곰소만에서 생산되고 있다 (Yang *et al.*, 2021). 수온, 염분 및 해수 중 먹이생물은 바지락의 성장 및 번식을 결정하는 주된 환경인자이나, 인간의 산업활동에서 파생되는 다양한 오염물질 역시 바지락 성장 및 번식의 시, 공간적 변화에 영향을 미친다 (Hong *et al.*, 2016; Sikdokur *et al.*, 2020; Subramaniam *et al.*, 2024). 바지락은 수산업적 가치 이외에도 해양환경 모니터링에 있어

지표종으로 널리 활용되고 있으며, 환경오염 또는 자연적 환경인자가 바지락 생리에 미치는 영향은 조직학적 방법에 의해 다양하게 분석되고 있다 (Uddin *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2024).

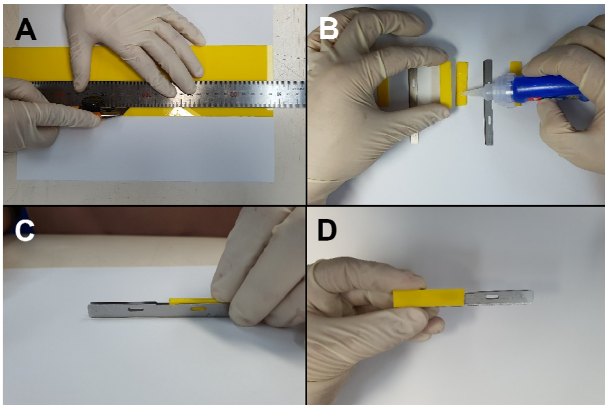
조직병리학 (Histopathology: histo, tissue; pathos, disease; logos, study) 은 조직의 미세구조와 병리학적 변화를 연구하는 학문으로 정상조직에 대한 이해를 바탕으로 외부 자극으로 유발된 비정상적 조직변화를 관찰하는데 널리 이용되고 있다. 패류 연구에서 조직병리학은 다양한 환경변화에 대한 생리적 반응 (Shaw & Battle, 1957; Jeung *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2017; Farzadfar *et al.*, 2021) 및 기생성 질병 진단 (Park & Choi, 2001; Bignell *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2022) 뿐 만 아니라 독성, 오염 등 물리화학적 환경 스트레스를 이해하는 연구 및 모니터링에 활용되고 있다 (Wester *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2013; Joshy *et al.*, 2022). 바지락 조직의 미세구조 및 변화를 관찰하기 위한 조직 슬라이드 제작 과정은 관찰 조직 적출, 조직 단편 절취 (dissection), 고정 (fixation), 포매 (embedding), 조직 절편 제작 (sectioning), 염색 (staining), 현미경 관찰 및 분석 (microscopic examination and image analysis) 로 구성되어 있으며, 각 과정은 전문화된 기술과 높은 일관성이 요구된다. 그러나, 조직 슬라이드 제작 과정에는 연구자의 숙련도,

Received: November 10, 2024; Revised: November 20 2024;  
Accepted: December 02, 2024

Corresponding author: Hee-Do Jeung

Tel: +82 (63) 472-8604, e-mail: hdjeung83@korea.kr  
1225-3480/24882

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.** Preparation of a custom tissue slicing knife. (A) Measuring and cutting of an acrylic sheet to the required size. (B) Apply glue to attach the cut acrylic pieces to the sides of the knife blade. (C) Ensuring proper alignment and attachment of the pieces to the blade. (D) The completed custom knife, ready for tissue sectioning.

주관성 등 높은 기술력과 일관성을 저해하는 요소가 존재한다. 따라서, 조직병리학적 방법을 활용한 바지락 조직을 연구함에 있어서 정확하고 재현 가능한 결과를 얻기 위해서는 조직 슬라이드 제작법에 대한 보편화된 분석과정 정립이 필요시된다. 이 연구에서는 바지락 조직병리학적 관찰을 위한 시료 처리부터 이미징분석 과정까지의 분석 방법에 관한 보편적 과정을 정립하고자 한다.

**재료 및 방법**

미국 해양대기청 (National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA) 은 연안 해양환경 변화의 장기적 모니터링에 널리 쓰이는 해양생물 조직학 방법에 관한 매뉴얼을 작성, 조직학적 방법을 표준화한 바 있다 (Howard *et al.*, 2004). 이 연구에 있어 바지락 조직시료 처리법 작성은 NOAA에서 발간한 패류 및 갑각류 조직의 표준 시료처리 방법 및 바지락의 번식 및 병리에 관하여 발표된 다수의 논문을 참조하였다 (Park *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2021; Subramaniam *et al.*, 2024).

**결과 및 고찰**

**1. 조직 관찰을 위한 시료 전 처리**

**1) 개각 및 해부**

바지락 연체부를 해부하기 위해서는 개각 또는 탈각을 해야 하며, 개각을 위해 수관 (siphon) 의 반대편인 전폐각근 (anterior adductor muscle) 에 칼집을 넣어 패각이 벌어지도록 한다. 이 과정에서 내장기관이 손상되지 않도록 하는 것이 중요하다. 패각으로부터 분리된 바지락의 연체부는 종이 티슈로 조직의 물기를 충분히 제거한 뒤, 조직 절취에 사용한다.

**2) 조직 절취**

조직 슬라이드 작성을 위한 조직 단면은 바지락의 생식소 (gonad), 소화맹낭 (digestive diverticular), 외투막 (mantle), 아가미 (gills), 족부 (foot) 가 포함되도록 한다. 조직 절편 제작 시 균일한 형태의 절편을 얻기 위해 두 개의 조직 절편 칼을 평행하게 붙여 제작한 조직 칼을 이용해 절취한다 (Fig. 1). 이 때, 조직 절단용 칼은 가로 4 cm, 1 cm로 자른 1.5 mm 두께 아크릴 판 4개를 지지대로 활용하여 제작한다. 조직은 위 방법으로 제작된 조직 칼로 약 3 mm 두께로 절취하며, 절취 두께는 시료와 분석 특성에 따라 조절한다.

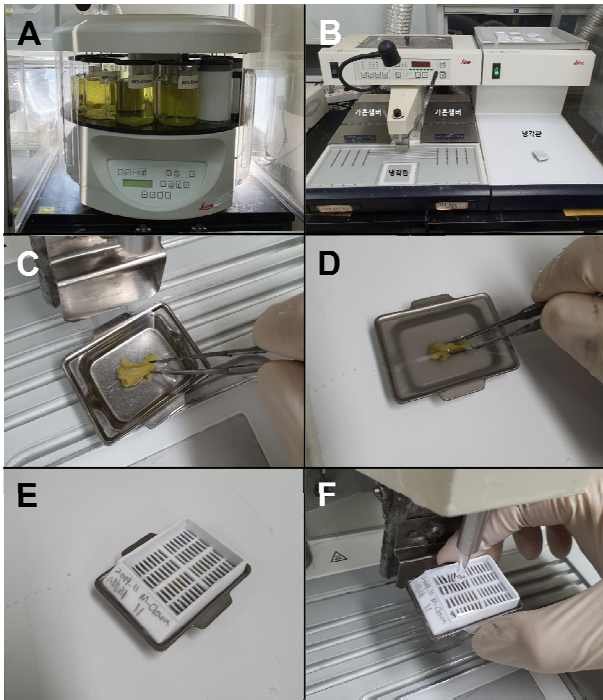
**2. 고정 (fixation)**

조직작성을 위한 바지락 시료는 포르말린, 에탄올을 기반으로 하는 고정액을 이용하여 고정하나, 연체동물 조직 고정에 최적화된 Davidson 용액이 가장 효율적이다 (Howard, 2004). 저장용 (stock) Davidson 용액의 성분 및 농도는 Table 1과 같으며, 여과 해수-포르말린-에탄올-글리세린 순서로 혼합하여 밀봉한 뒤, 냉장 보관한다. 실험용 (working) 용액은 저장용 용액과 아세트산을 9:1로 혼합하여 사용한다. Davidson 용액은 휘발성이 강하므로 흡입하지 않도록 주의하며 밀폐용기에서 시료를 고정한다. 절취된 조직은 곧바로 고정액에 넣어 시료의 변성을 방지하며, 상온 (25°C) 에서 24 시간 동안 고정 후 70% 에탄올로 치환하여 장기 보관한다.

**3. 파라핀 포매 (paraffin embedding)**

**Table 1.** Components and concentration of Davidson solution

Components	Volume for 1L Preparation	Final Concentration (%)	Roles
Glycerin	100 mL	10%	Disinfection
35% Formalin	200 mL	20%	Disinfection & Fixation
99% Ethyl alcohol	300 mL	30%	Disinfection & Fixation
Filtered seawater	300 mL	30%	Osmoregulation
Acetic acid	100 mL	10%	Fixation



**Fig. 2.** Preparation of paraffin blocks for tissue embedding. (A) Automated tissue processor used for dehydration, clearing, and infiltration steps. (B) Embedding center with heating and cooling plates. (C) Placement of the tissue sample in a mold. (D) Solidification of sample on a cooling plate. (E) A mold covered by the embedding cassette. (F) Pouring melted paraffin into the mold to embed the tissue sample, ensuring it fills completely and covers the cassette for secure embedding.

포매 (embedding) 란 분석에 이용될 시료 조직을 파라핀 (paraffin), 셀로이딘 또는 카보왁스 등에 침투시켜 굳히는 과정이다. 패류의 포매에는 주로 파라핀이 이용되며, 파라핀은 조직내부에 침투되어 조직을 경화시키고 빈공간을 채워 조직 단면이 일정하게 박절 되도록 한다.

**1) 탈수, 투명화, 침투**

조직 포매를 위한 첫 단계는 조직 시료내에 포함된 수분을 제거하는 과정 (dehydration) 으로, 농도가 다른 에탄올 (80%, 95%, 100% ethanol) 를 이용한다. 고정 후 70% 에탄올에 보관된 조직 절편은 에탄올 처리 과정을 통해 조직 내 모든 수분이 100%에탄올로 치환되게끔 한다. 이때 급격한 에탄올 농도변화는 조직의 수축을 초래하여 형태의 변화를 야기하므로 단계적으로 농도를 높이며 탈수를 진행한다. 탈수과정은 3회 반복하여 남아있는 수분이 완전히 제거되도록 한다. 탈수가 완료된 조직 시료는 유기용매인 자일렌 (xylene) 을 이용, 에탄올을 제거하는데, 이를 투명화 (clearing) 라 한다. 이후, 최종 파라핀 침투과정 (infiltration) 은 파라핀의 녹는 점인 56.6°C이상의 용기에서 액체 상태의 파라핀을 조직에 스며들게 하며, 위 과정은 수동으로 또는 회전형 자동침투기 ( Fig. 2A) 를 활용하여 진행되며, 탈수, 투명화 및 침투 시간은 Table 2와 같다.

**2) 파라핀 블록 제작**

파라핀 블록은 전문 제조사에서 판매하는 embedding center를 이용해 제작한다. 이 연구의 경우, Leica사에서 제

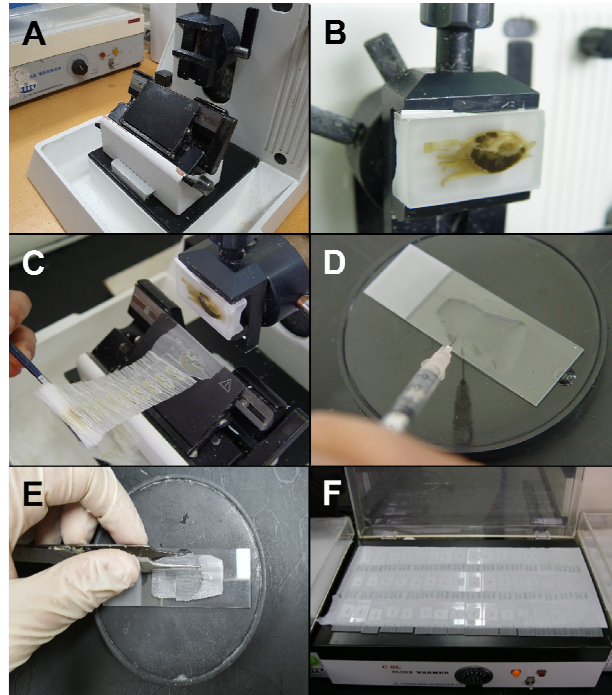
**Table 2.** Processing time for tissue dehydration, clearing, and paraffin infiltration

Process	Agents	Duration (min)
Dehydration	80% Ethanol	60
	95% Ethanol	120
	95% Ethanol	120
	95% Ethanol	120
	100% Ethanol	120
	100% Ethanol	60
Clearing	Xylene	60
	Xylene	120
	Xylene	120
Paraffin Infiltration	Paraffin	120
	Paraffin	120
	Paraffin	120

조하는 Leica EG1150 H (가열대) 와 Leica EG1150 C (냉각판) 을 이용한 파라핀블록 제작 과정을 설명한다 (Fig. 2B). Embedding center는 사용 2시간 전 전원을 켜, 파라핀이 모두 녹을 수 있도록 하며, 몰드, 핀셋 등 기구와 조직 절편은 60°C 가온 챔버에서 보관하여 상온에서 응고되지 않도록 한다. 파라핀 침투과정이 끝난 조직은 파라핀 가온 챔버 안에 넣어 보관하며, 파라핀 용액을 몰드 (mold) 에 가득 채운다. 조직 절편은 분석하고자 하는 면이 밑으로 향하도록 몰드 위에 올린 뒤 (Fig. 2C), 조직을 고르게 눌러 냉각판에서 파라핀 용액을 굳힌다 (Fig. 2D). 이 때, 바닥의 빈 공간을 최소화하고 기포를 제거한다. 또한, 몰드의 상단부가 완전히 굳기 전에 카세트에 덮어야 하며 (Fig. 2E), 그 위에 파라핀 용액을 가득 채워 카세트가 몰드로부터 분리되지 않도록 한다 (Fig. 2F). 몰드가 과도하게 응고된 이후, 파라핀을 채우면 카세트-몰드 층 분리가 발생할 수 있기 때문에 적절한 시점에 파라핀을 보충하는 것이 중요하며, 60 °C 파라핀에 담긴 조직시료 카세트는 신속히 냉각판 (-6°C) 위에서 30분 이상 굳혀 파라핀 블록에 기포가 포함되지 않도록 한다.

#### 4. 조직 절편 제작

파라핀 블록에 최종적으로 고정된 조직 시료는 회전형 박절기 (Rotary microtome) 을 이용하여 4-6 μm 두께로 박절한다. 조직 박절에 이용되는 칼은 주로 전문 제조사에서 제작한 일회용 칼을 사용하며, 이 연구에서는 Feather사의 A35 Microtome Blades를 사용한다. 일회용 칼의 장점은 사용 중간 연마가 필요 없고 무디어질 경우 교환하며 사용하므로 항상 예리한 날을 유지할 수 있다는 점이다. 회전형 박절기의 날 각도는 5°에 맞추고 microtome blade를 장착한다 (Fig. 3A). 조직 시료가 포함된 파라핀블록은 블록 고정대에 고정한 뒤 (Fig. 3B), 조동 핸들을 움직여 불필요한 파라핀을 깎아내고 조직의 박절면을 노출시킨다 (Fig. 3C). 조직 단면의 모든 면이 노출되면 슬라이드에 40-50 °C의 물을 한 방울 떨어뜨린다 (Fig. 3D). 조직 절편은 핀셋을 이용하여 슬라이드에 올린 뒤 (Fig. 3E), 50 °C의 건조판에서 24시간 건조한다 (Fig. 3F). 조직 박절 중, 빈번하게 발생하는 문제와 해결방법은 Table 3과 같다.



**Fig. 3.** Sectioning and mounting of paraffin-embedded tissue samples. (A) Rotary microtome setup for sectioning paraffin blocks. (B) Paraffin block with tissue embedded, ready for sectioning. (C) Cut sections from the microtome. (D) Transferring sections to a slide using a drop of warm water to flatten and adhere the tissue. (E) Positioning the section properly on the slide. (F) Slides placed on a slide warmer to dry and ensure tissue adherence before staining.

#### 5. 염색 및 슬라이드 제작

광학현미경으로 세포나 조직의 구조를 관찰하기 위해 각종 염료로 세포와 조직을 착색하는 과정을 염색 (staining) 이라 한다. 염색과정은 방법에 따라 차이가 있으나 일반적으로 탈파라핀 (deparaffinization) → 탈자일렌 (dexylene) → 재함수 (rehydration) → 염색 (staining) → 탈수 (dehydration) → 투명 (clearing) → 봉입 (mounting) 의 순서로 진행된다. (Table 4). 박지락에서 가장 흔하게 관찰되는 원생성 기생생물 *Perkinsus olseni* 감염 진단에는

**Table 3.** Troubleshooting for tissue sectioning

Problems	Causes	Troubleshooting
Sections are curled and uneven	- The blade is set at an angle - One side of the blade is dull	- Secure the blade parallelly - Change the blade
Sections are compressed and wrinkled	- Dull blade - Warm block	- Change the blade - Cool down the block
Sections are cracked or torn	- Debris on the blade - Damaged blade	- Change the blade

**Table 4.** Staining process and processing time for staining using Hematoxylin and Eosin Y

Step	Agents	Duration (min)
Deparaffinization	Xylene	30
	Xylene	5
	Xylene	5
Dexylene	100% Ethanol	5
	100% Ethanol	1
	80% Ethanol	2
	50% Ethanol	2
	30% Ethanol	1
	Distilled water	5
Staining	Hematoxylin	1.5
	Eosin Y	20 sec
Dehydration	30% Ethanol	1
	50% Ethanol	1
	70% Ethanol	1
	80% Ethanol	1
	95% Ethanol	Several dips
	100% Ethanol	1
	100% Ethanol	1
Clearing	Xylene	10
Mounting	Canada balsam	

hematoxylin-eosin Y 염색 (H&E staining) 이 일반적으로 이용되며, 원리는 다음과 같다. hematoxylin의 산화에 의해 생긴 hematein이 매염제의 금속 부분과 결합하여 레이크를 형성하면, 이 레이크는 양(+) 전하를 띠게 되어 음(-) 전하를 띤 핵 인산기와 결합하여 청색으로 염색된다. 또한 양(+)으로 하전 되어 있는 세포질이나 결합조직은 음(-) 전하를 띤 eosin Y와 결합하여 분홍색으로 염색된다.

### 1) 염색 (staining)

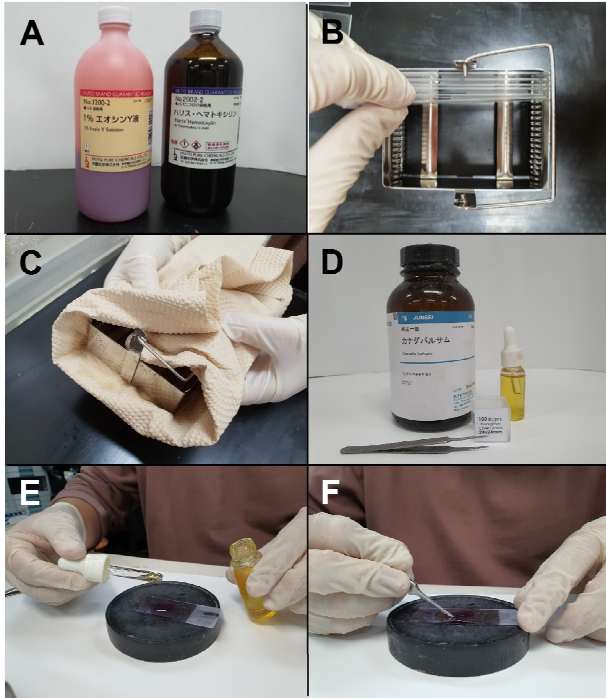
H&E 염색을 위한 시약 중 hematoxylin은 원액을 사용하며, 1% eosin Y 용액은 증류수에 2배 희석하여 사용한다 (Fig 4A). 건조가 완료된 슬라이드는 염색용 rack에서 1시간 동안 xylene에 넣어 파라핀을 제거한다 (Fig. 4B). Xylene은 Table 4에 따라 단계적 농도의 에탄올로 제거하며, 슬라이드 rack을 다른 용액으로 이동하기 전에 종이 타올을 이용하여 남아있는 에탄올 용액을 제거해주며, 에탄올이 증발되지 않도록 신속히 옮겨야 한다 (Fig. 4C). 또한, hematoxylin 및 eosin Y 반응 시간은 절대적이지 않기 때문에 다양한 조합의 시험을 통해 연구자가 결정할 필요가 있다.

### 2) 봉입 (mounting)

봉입은 투명화가 완료된 조직 슬라이드를 현미경으로 관찰하기 위해 cover glass 부착하는 과정이다. 봉입에는 캐나다 발삼 (Canada balsam) 또는 말린올 (Malinol) 이 주로 이용된다 (Fig. 4D). 염색이 완료된 이후, xylene에서 보관 중인 슬라이드는 편평한 받침대 위에 올려 놓은 뒤, 위에 캐나다 발삼 또는 말린올을 한, 두 방울 떨어뜨린다 (Fig. 4E). Xylene은 휘발성이 강하므로 조직이 건조되지 않도록 하는 것이 중요하며, 적당한 크기의 cover glass 선정 또한 중요하다. Cover glass는 기울여 덮어주며, 기포를 반드시 제거하여 장기간 보관이 가능하도록 한다 (Fig. 4F). 상온에서 24시간 이상 건조한 슬라이드는 광학 현미경으로 관찰한다.

### 6. 조직시료의 현미경 관찰 및 이미지화

오늘날 현미경 관찰 결과의 사진 촬영은 거의 대부분 디지털 (digital) 이기 때문에 조직 미세구조를 명확하게 관찰할 수 있으며, 관찰 과정부터 이미지를 확보한 이후까지 소프트웨어를 사용해 쉽게 조작하고 보정할 수 있다. 이러한 장점을 극대화하기 위한 간략한 지침을 아래에 기술하였다.



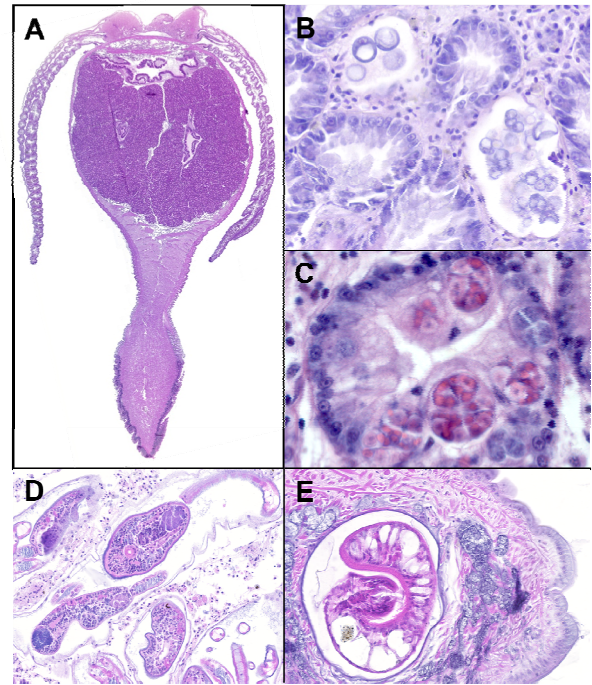
**Fig. 4.** Staining and mounting of tissue sections. (A) Hematoxylin and eosin (H&E) staining solutions. (B) Slides in a staining rack ready for H&E staining. (C) Drying slides after staining. (D) Preparation of Canada balsam or Malinol as mounting medium. (E) Applying mounting medium to the stained slide. (F) Placing a cover slip over the tissue section with Canada balsam to finalize the mounting process, ensuring proper adhesion and preservation of the sample for microscopic examination.

### 1) 조직 시료 관찰

상기 제작된 조직 슬라이드에는 바지락의 생식소, 소화맹낭, 외투막, 아가미, 족부가 포함되어있다. 이 중 외투막과 아가미는 여과섭식을 하는 바지락의 특성상 병원체에 쉽게 노출될 수 있는 기관이므로 면밀한 관찰이 필요하다. 소화맹낭, 생식소, 족부 또한 관찰하고자 하는 병원체의 분포 특성에 따라서 중요한 관찰 대상이 될 수 있다. 예를 들어, *Marteilia* spp. 또는 *Eomarteilia* spp.는 소화맹낭에 특이적으로 분포하여 바지락의 소화 및 영양분 흡수를 방해하며 (Kang *et al.*, 2022), 바지락 흡충류는 숙주의 생식소에 주로 분포하며 생식활동을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Cho *et al.*, 2022). 기생생물의 출현여부 확인 외에도 이들로 인한 숙주의 조직 변화 (세포 변형, 염증 반응, 조직 괴사, 혈구 침윤) 또한 주요 관찰대상이 되어야 한다.

### 2) 현미경 사진 촬영 (image taking)

현미경 및 카메라 제조사에서 제공하는 다양한 소프트웨어



**Fig. 5.** Histological microphotography of Hematoxylin & Eosin-stained Manila clam tissues. (A) Whole mount view of a clam tissue section. (B) Clusters of *Perkinsus olseni* trophozoite. (C) *Eomarteilia granula* within a digestive gland tubule. (D) Cercariae inside trematode sporocysts. (E) Encysted metacercaria in the clam foot muscle.

를 현미경 사진 촬영에 활용할 수 있다. 정확한 초점 조절 외에 화이트 밸런스 (white balancing) 및 그림자 보정 (shading corrections) 은 고품질 이미지를 확보하기 위한 가장 중요한 요소라고 할 수 있다. 화이트 밸런스는 조직 외 배경의 흰 바탕을 선택함으로써 조직의 색 정확도를 높이고 가장 실제에 가까운 색 값을 얻을 수 있는 방법이며, 그림자 보정은 이미지의 균일성을 유지하기 위해 그림자 인공물을 보정하는 것을 의미한다. 이를 통해 손쉽게 좋은 이미지를 얻을 수 있다.

### 3) 사후 보정 (post hoc image corrections)

밝기조정 (brightness) 및 대비 조정 (contrast) 은 각각 조직 세부 사항의 가시성을 높이기 위해 밝기를 조정하거나 다양한 조직 구성 요소 간의 구분을 극대화하는 것을 의미한다. 이는 사진 촬영 이후에 이미지 품질과 활용성을 향상시킬 수 있는 방법이다.

### 4) 이미지 보관 형식

그림 파일의 해상도는 출판, 발표, 웹 게시, 전시 등의 다양

한 목적에 따라 연구자가 결정하여 저장할 수 있다. 따라서, 이 연구에서는 다양한 파일저장 형식을 이용한다. 가장 널리 이용되는 JPEG (Joint Photographic Experts Group) 와 GIF (Graphics Interchange Format) 영상 저장 방식은 컴퓨터 화면에서 일반 용도로는 무난하나, 이미지 사후 보정 과정 중 손실 압축될 수 있기 때문에 출판 용으로는 적합하지 않다. 반면, TIFF (Tagged Image File Format) 및 PNG (Portable Network Graphics) 는 보정 중에도 손실 없는 압축을 제공하기 때문에 출판용으로 널리 활용되고 있다. Fig. 5는 바지락의 조직 단면사진과 주요 기생성 생물로서, 위 지침을 활용하여 제작한 결과물의 예시로 제시하였다.

## 요 약

이 연구는 우리나라 전 연안에 널리 분포하는 바지락의 조직병리 관찰을 위한 시료처리, 조직 슬라이드 제작, 이미지화 등, 일련의 분석방법을 소개하며, 이를 표준화 하기위한 방법론에 관하여 고찰하였다. 이 연구에서 소개된 바지락 조직 연구 표준화는 향후, 이매패류 조직 병리 또는 바지락 연중 생식 주기 연구 등에 있어 방법론적 신뢰성을 높이며, 이 연구에서 소개된 표준화된 방법은 다양한 연구실 및 연구자들에 의해 널리 활용될 것으로 기대한다.

## 사 사

이 연구는 2024년도 국립수산물학원 수산시험연구사업 “제주 양식넙치 대체참조기 양식산업화 기반 연구 (R2024027)”의 지원으로 수행되었습니다. 연구 수행에 도움을 주신 제주대학교 무척추동물양식학 연구실 및 갯벌연구센터 연구원 여러분께 감사 인사를 드립니다.

## REFERENCES

- Bignell, J. P., Dodge, M. J., Feist, S. W., Lyons, B., Martin, P. D., Taylor, N. G. H., Stentiford, G. D. (2008) Mussel histopathology: effects of season, disease and species. *Aquatic Biology*, **2**(1): 1-15.
- Cho, Y.-G., Lee, H.-M., Kim, J.-H., Shin, J.-S., Jeung, H.-D., Choi, K.-S. (2022) Effects of larval trematode parasitism on the reproductive capacity of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in a sandy-mud tidal flat on the west coast of Korea. *Frontiers in Marine Science*, **9**: 936520.
- Costa, P. M., Carreira, S., Costa, M. H., Caeiro, S. (2013) Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquatic toxicology*, **126**: 442-454.
- Farzadfar, F., Doustshenas, B., Rezaie, A., Mousavi, S. M. (2021) Salinity-induced alterations in ionic concentration of haemolymph and its effects on histopathology of gills and digestive gland in razor clam (*Solen dactylus* von Cosel, 1989; Bivalvia, Solenidae). *Molluscan Research*, **41**(2): 92-102.
- Hong, H.-K., Donaghy, L., Kang, C.-K., Kang, H.-S., Lee, H.-J., Park, H.-S., Choi, K.-S. (2016) Substantial changes in hemocyte parameters of Manila clam *Ruditapes philippinarum* two years after the Hebei Spirit oil spill off the west coast of Korea. *Marine Pollution Bulletin*, **108**: 171-179.
- Howard, D. W. (2004) Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans (Vol. 5). NOAA, National Ocean Service, National Centers for Coastal Ocean Service, Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research, Cooperative Oxford Laboratory.
- Kang, H.-S., Lee, H.-M., Kim, Itoh, Naoki, Cho, Y.-G. Choi, K.-S. (2022) Molecular and microscopic identification of *Eomarteilia granula* infection in Manila clam *Ruditapes philippinarum* off the south coast of Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*, **152**: 09-114.
- Jeung, H.-D., Lee, J.-Y., Limpanont, Y., Park, K.-I., Kang, H.-S., Kim, C.-W., Choi, K.-S. (2014) 산란기 지중해넙치 *Mytilus galloprovincialis*의 조직병리학적 변화 관찰. *Ocean Polar Research*, **34**(2): 151-163.
- Joshy, A., Sharma, S. K., Mini, K. G., Gangadharan, S., Pranav, P. (2022) Histopathological evaluation of bivalves from the southwest coast of India as an indicator of environmental quality. *Aquatic Toxicology*, **243**: 106076.
- Lee, H.-M., Park, K.I., Yang, H.-S., Choi, K.-S. (2021) Negative impacts of *Perkinsus olsenii* infection in Manila clam *Ruditapes philippinarum* observed from tidal flats in Anmyeondo Island on the west coast of Korea during post-spawning period. *Ocean Science Journal*, **56**: 307-316.
- Park, K.-I., Choi, K.-S. (2001) Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Aquaculture*, **203**(1-2): 9-22.
- Park, K.-I., Yang, Tsutsumi, H., Hong, J.-S., Choi, K.-S. (2008) Pathology survey of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* occurring on sandy tidal flat along the coast of Ariake Bay, Kyushu, Japan. *Journal of Invertebrates Pathology*, **99**: 212-219.
- Park, K.-J., Yang, H.-S., Jeung, H.-D., Choi, K.-S. (2013) Pathologic condition of the stranded Manila clam *Ruditapes philippinarum* by storm-originated sediment erosion in spring 2007 in Incheon Bay off the west coast of Korea. *Korea Journal of Malacology*, **29**(2): 147-154.
- Shaw, B. L., Battle, H. I. (1957) The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology*, **35**(3): 325-347.
- Sikdokur, E., Belivermis, M., Sezer, M., Pekmez, M.,

## Histological Methods Used in Clam Pathology Survey

- Bula, O.K., Kilic, O. (2020) Effects of microplastics and mercury on manila clam *Ruditapes philippinarum*: feeding rate, immunomodulation, histopathology and oxidative stress. *Environmental Pollution*, **262**: 114247.
- Subramaniam, T., Cho, Y.-G., Lee, H.-M., Kim, J.-H., Shin, J.-S., Kwon, M.-G., Jang, G.-I., Choi, K.-S. (2024) Spatio-temporal variation in *Perkinsus olseni* infection intensity in Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Anmyeondo and Cheonsu Bay tidal flats on the west coast of Korea. *Ocean Science Journal*, **59**: 1.
- Uddin, M.J., Yang, H.-S., Park, K.-J., Kang, C.-K., Kang, H.-S., Choi, K.-S. (2012) Annual reproductive cycle and reproductive efforts of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Incheon Bay off the west coast of Korea using a histology-ELISA combined assay. *Aquaculture*, **364-365**: 25-32.
- Yu, X.-L., Hong, H.-K., Choi, K.-S., Kim, J., Lee, B.-G. (2024) Chronic effects of waterborne silver on the physiology and reproduction of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Ocean Science Journal*, **59**: 23.
- Wester, P. W., Van Der Ven, L. T. M., Vethaak, A. D., Grinwis, G. C. M., Vos, J. G. (2002) Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental toxicology and pharmacology*, **11**(3-4): 289-295.
- Wu, F., Kong, H., Shang, Y., Zhou, Z., Gul, Y., Liu, Q., Hu, M. (2017) Histopathological alterations in triangle sail mussel (*Hyriopsis cumingii*) exposed to toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) under hypoxia. *Aquaculture*, **467**: 182-189.
- Yang, H.-S., Cho, Y.-G., Shin, J.-S., Park, H.-S., Choi, K.-S. (2021). Pathology survey of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from Hwangdo tidal flat in Cheonsu Bay on the west coast of Korea. *Ocean Polar Research*, **43**: 151-157.