

일본재첩, *Corbicula japonica* 아가미의 정상구조와 고염분 급성노출에 의한 조직병리학적 변화

박정준¹, 이정식², 이재성³

¹국립수산과학원 병리연구과, ²전남대학교 수산해양대학 수산생명의학과, ³국립수산과학원 환경연구과

Fine Structure and Histopathological Changes Exposed to Acute High Salinity of the Gill of Japanese Clam, *Corbicula japonica*

Jung Jun Park¹, Jung Sick Lee² and Jae Seong Lee³

¹Pathology Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

²Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

³Marine Environment Research Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

ABSTRACT

This study was performed to observe ultrastructure of the gill and to ascertain the effect of salinity on histopathological and ultrastructural changes in the gill of the Japanese clam, *Corbicula japonica*. Experimental period was 7 days. Experimental groups consisted of control, 5, 10, 20 psu. LC₅₀ (96 h.) by the probit was 19.55 psu. Mortality was significantly different from the control ($p < 0.05$). Inner demibranch of the gill of *C. japonica* was wider 1.37 times than outer demibranch ($p < 0.001$). The filament zone on the plica can be distinguished by the six epithelial cell; frontal ciliated epithelium (7 μ m), latero-frontal ciliated epithelium (5 μ m), postlatero-frontal epithelium (3 x 8 μ m), and lateral ciliated epithelium (5 μ m) in the frontal zone, endothelial cell in the intermediate zone, and abfrontal cell in the abfrontal zone. It had one type of secretory cell that was filled with fibrous substances of low electron density. The gill of *C. japonica* exposed to 5 psu for 7 days was observed partially disappearance of the cilia, and glycogen granule in the filament. In the 10 psu, gill appeared partially modification of epithelial cell and destruction of the glycocalyx. Gill exposed to 20 psu was extended nucleus of the ciliated epithelial cell, destruction of the organelles, and observed glycogen granules infiltration and numerous vacuoles. Moreover, more than 50% filaments were observed that come out chitinous rod from disappearance of epithelial cell in the filament. Therefore, the destruction of the cilia and epithelial cell induce physiological activity and it may be leading directly to death.

KeyWords: *Corbicula japonica*, acute salinity, gill, histopathology

서론

이매패류의 대부분은 여과식자 (filter feeder) 이다. 이러한 저서성 여과식자들은 퇴적물과 해수의 경계면에 위치하면서 해수 여과 및 퇴적층으로의 물질수송을 담당하고 있다 (Asmus and Asmus, 1993). 또한 이들은 유기물질을 구별하지 않고 여과하기 때문에 물리적으로 5 μ m 이하의 미립자

를 점액물질로 코팅하여 외투강 밖으로 배출함으로써 배출물들은 강제적으로 해양 퇴적물바닥에 침강되어진다. 이러한 물리적인 행동으로 여과식자들은 수질을 정화하는 중요한 역할도 담당하고 있다 (Foster-Smith, 1975). 또한 이러한 기능들은 주로 아가미를 통하여 이루어지고 있으며, 저서생태계에서 이들의 생태적 역할과 기능은 매우 크다고 할 수 있다. 따라서 이매패류들은 생물생태학적 중요성 때문에 많은 연구가 수행되어 왔다 (Allen, 1962; Foster-Smith, 1975; Gerdes, 1983; Griffiths, 1980; Palmer, 1980; Cranford and Grant, 1990; Schulte, 1975; Shumway *et al.*, 1985; Winter, 1978).

많은 환경 연구자들은 환경의 변화를 알아보기 위해

Received January 8, 2011; Revised January 12, 2011;
Accepted January 31, 2011

Corresponding author: Jung Jun Park

Tel: +82 (51) 720-2483 Fax: +82 (51) 720-2493

e-mail: jjpark@nfrdi.go.kr 1225-3480/24373

biomarker를 사용하고 있다. Biomarker란 실내 노출 혹은 자연환경으로부터 식물과 미세유기물을 포함하는 모든 생물들의 물리, 화학적인 스트레스에 의한 영향을 평가하기 위한 조건들을 의미하며, 일반적으로는 작은 단위의 생물학적 기본 구조를 대상으로 하고 있다. Biomarker 중에서 조직병리학적 지표들은 in vivo 상태에서 한가지 혹은 그 이상의 스트레스에 영향을 받은 특정 기관이나 세포의 변화를 관찰하는 것이다. 따라서 상대적으로 환경오염물질에 대한 영향을 확인하기 쉽고, 생물들의 건강성을 확인할 수 있으며, 자원학적으로 미래의 상황을 예상할 수 있다 (SETAC, 1992). 또한 조직병리학적 지표들은 호흡 및 먹이섭취, 생식 그리고 행동 등과 같은 생리학적인 biomarker들과 연관하여 생리학적인 장애의 원인을 규명할 수 있으며, 비정상적인 세포의 출현은 분자생물학적인 biomarker를 이용하여 그 원인을 설명할 수 있다.

어류의 조직병리학적 증상은 질병 및 오염물질에 대한 1차적인 반응이기 때문에, 국외에서 시행되고 있는 모니터링 프로그램에서는 모니터링 이후 오염원의 실내 실험을 통해서 모니터링의 결과로 얻어진 조직병리학적 증상을 질병에 의한 것인지 혹은 물리, 화학적인 스트레스에 의한 것인지를 구분한다 (NSTF, 1990; Kimbrouhg *et al.*, 2008). 또한 최근에는 환경 프로그램의 일환으로 어류와 무척추동물의 세포학적 반응을 이용하여 지중해의 생물학적 모니터링을 시행하고 있다 (UN, 1999).

해양환경에서 물리, 화학적인 스트레스는 호흡을 비롯한 다양한 생리적인 변화와 함께 기관계의 구조적 변화를 유도하여 기능적인 장애를 초래한다는 사실이 여러 연구자들에 의해 보고 되어왔다 (Rasmussen *et al.*, 1983; Sunila and Lindström, 1985; Hinch and Stephenson, 1987; Regoli and Orlando, 1994; Gauthier-Clerc *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2004). 하지만 물리적인 요인 중에서 염분 스트레스에 담수산 이미페류의 조직병리학적 연구는 전무한 실정이다.

따라서 이 연구는 염분 스트레스에 의한 섬진강 서식 재첩종인 일본재첩, *Corbicula japonica*의 아가미 변화를 조직병리학적 방법으로 관찰하여, 섬진강 하구의 환경변화에 따른 일본재첩의 영향을 규명하고, 생리학적인 요인의 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구는 일본재첩, *Corbicula japonica*을 이용하였으며, 경상남도 하동군 섬진강에서 형상에 의해 채집된 개체들 중에서 버니어캘리퍼스로 각장을 측정하여 각장 20.00-22.00 mm의 개체들만 15 L의 1차 증류수 (17°C)가 담겨있는 사각수조

(20 L)에서 일주일 동안 순치하였다.

2. 방법

1) 실험수

본 연구에서 사용된 실험수는 섬진강 현장수와 1차 증류수를 사용하였는데, 염분농도 0.01 psu인 현장수는 membrane filter (Millipore, 0.4 μm; diameter, 25 mm)를 이용하여 여과하였고, 120°C에서 멸균 후 사용하였다.

2) 노출실험

(1) 사육수조

독성시험에 사용된 사육수조는 1 L (diameter, 140 mm; height, 80 mm) 원형 유리수조로서 800 mL의 사육수에 수조의 바닥에는 섬진강의 현장 퇴적물을 2 cm 정도 깔아 주었다. 실험기간동안 수온은 온도제어장치를 이용하여 17°C로 유지하였다.

(2) 예비실험

실험구는 총 7개로써 1차 증류수 (negative control)와 섬진강 환경수 (field control)를 대조구로 정하였으며, 염분 노출구로서 5, 10, 20, 30, 40 psu의 농도구들은 천일염으로 조절하여 사용되었다. 각 수조에서 일본재첩을 20개체씩 수용하였으며, 실험기간동안에는 직사하였다. 급성독성시험의 노출 기간은 2009년 7월 29일부터 2009년 8월 1일 까지 96시간이었다.

(3) 급성실험

실험구는 총 5개로써 1차 증류수와 섬진강 환경수를 대조구로 정하였다. 천일염으로 조절한 염분 노출구는 5, 10, 20 psu가 사용되었다. 각 수조에서 일본재첩을 20개체씩 수용하였으며, 먹이는 담수산 클로렐라 (*Chlorella vulgaris*)를 매일 오전 10시에 0.25 mL씩 각 수조에 공급하였다. 2009년 9월 10일부터 2009년 9월 17일 까지 7일 동안 시행하였다.

(4) 분석

본 연구에서 생존율을 제외한 개체별 조직병리학적 분석은 실험 종료시점인 7일째에 시행하였다. 생존율을 제외한 모든 분석은 각각의 실험구들에서 무작위로 5개체씩 사용하였다. SPSS (Ver. 18)의 probit analysis를 이용하여 예비실험의 결과로 염분농도에 따른 일본재첩의 치사농도 (LC; lethal concentration)를 분석하였다. 예비실험 및 급성실험에서 생존율은 실험기간 동안 각 농도구별로 매일 오전 9시와 오후 5시에 사망개체를 확인하였다. 생존율은 농도구별 전체 실험 개체수에서 누적사망 개체수를 뺀 값을 생존율로 환산하였다.

채집된 재료는 전장과 체장을 1 mm까지 측정하고, 전중과 체중을 전자저울로 0.01 g까지 측정한 후 해부하여 아가미를 적출하였다. 전자현미경 조직표본 제작은 실험종의 아가미를 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) 로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액으로 3시간 동안 전 고정한 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) 로 20분 동안 2-3회 수세 하였다. 그 후 1% osmium tetroxide (OsO₄) (Sigama) 로 2시간 후 고정한 후, 0.1 mol phosphate buffer로 20분 동안 2-3회 세척하고, ethanol을 이용하여 70%부터 100%까지 각각 30분 동안 단계별로 탈수하였다. 투과전자현미경 TEM으로 관찰하기 위해 propylene oxide로 30분씩 2회 치환하고, 에폭시 수지로 포매 (60℃ dry oven에서 36-48시간 동안 중합) 한 1-0.5 μm 두께의 semithin section을 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. TEM 관찰 절편은 ultramicrotome (MT-X, RMC, Germany) 으로 section (70 nm) 한 다음 grid에 올려서 uranyl acetate-lead citrate으로 염색한 후 TEM (H-7500, Hitachi, Japan) 으로 관찰하였다.

SEM으로 관찰하기 위해 amyl acetate로 30분씩 2회 치환하고, CO₂ 가스로 임계건조 (critical point drying) 한 다음 1분 동안 금이온 증착 (gold ion particle coating) 하여 SEM (S-3000N, Hitachi, Japan) 으로 관찰하였다.

아가미 외부판 및 내부판 면적과 각장 (shell length) 의 상관관계는 SPSS (Ver. 18) 을 이용하여 직선식 회귀분석으로 나타내었고, 각각의 회귀식은 Student T-Test를 이용하여 유의성 검증을 시행하였다 ($p < 0.05$).

결 과

1. 치사농도

96시간 일본재첩을 염분이 함유된 수질에 노출시킨 결과 염분에 의한 일본재첩의 반수치사농도 (LC₅₀) 는 19.550 psu로 나타났다. 또한 본 결과로 볼 때 일반적인 해수 농도인 33 psu에서는 일본재첩의 사망률이 96%로 나타났다 (Table 1).

2. 생존율

급성실험에서 일본재첩들은 증류수 대조구와 환경수 대조구의 경우 실험 종료시까지 95%의 개체들이 생존하였다. 5, 10, 20 psu에 노출된 개체들은 각각 노출 3일, 1일, 3일까지는 모든 실험개체들이 생존하였지만, 실험종료시기에는 각각 80%, 35%, 10%의 개체들이 생존하였다 (Fig. 1).

3. 조직병리학적 변화

1) 대조구 아가미

일본재첩의 아가미는 좌·우 각각 한 쌍으로 각각의 아가미

Table 1. The probit of the lethal concentration of *Corbicula japonica* exposed to acute salinity (96 h.)

Probit	95% Confidence		
	Concentration (psu)	Lower	Upper
.010	1.136	-6.809	5.763
.020	3.294	-3.828	7.513
.030	4.663	-1.947	8.634
.040	5.693	-.540	9.485
.050	6.530	.600	10.182
.060	7.243	1.565	10.780
.070	7.869	2.408	11.308
.080	8.428	3.160	11.784
.090	8.937	3.840	12.220
.100	9.406	4.464	12.624
.150	11.346	7.014	14.328
.200	12.888	8.993	15.729
.250	14.211	10.650	16.974
.300	15.399	12.096	18.133
.350	16.500	13.397	19.246
.400	17.544	14.593	20.340
.450	18.555	15.712	21.437
.500	19.550	16.777	22.553
.550	20.544	17.807	23.705
.600	21.555	18.819	24.909
.650	22.600	19.832	26.186
.700	23.700	20.868	27.564
.750	24.888	21.954	29.083
.800	26.211	23.133	30.805
.850	27.753	24.473	32.846
.900	29.694	26.120	35.454
.910	30.162	26.512	36.089
.920	30.671	26.937	36.781
.930	31.231	27.401	37.543
.940	31.856	27.918	38.398
.950	32.569	28.504	39.375
.960	33.407	29.189	40.527
.970	34.437	30.026	41.948
.980	35.806	31.133	43.842
.990	37.963	32.866	46.842

는 넓은 빗모양이며, 패각과 가까운 외부판 (outer demibranch)과 내장낭과 가까운 내부판으로 나누어진다. 내부판은 외부판의 1.37배로서 외부판과 내부판의 크기는 유의적인 차이를 보였다 ($p < 0.001$, Fig. 2).

각각의 새판은 다수의 새엽다발 (plica) 이 연결된 형태이다 (Fig. 3A). 새엽다발은 다수의 새엽 (filament) 으로 구성되고 각각의 새판 가장자리에는 먹이홈 (ventral groove) 이 존재하였다 (Fig. 3D). 새엽다발을 구성하는 새엽은 긴 곤봉형으로 중앙의 키틴질 기둥 (chitinous rod) 을 상피층이 둘러싸고 있었고, 상부 (frontal zone), 중간 (intermediate zone), 하부

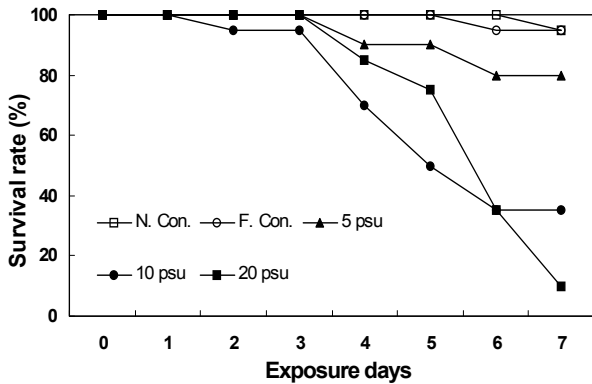


Fig. 1. Survival rate of *Corbicula japonica* exposed to acute salinity. N. Con., negative control; F. Con., field control.

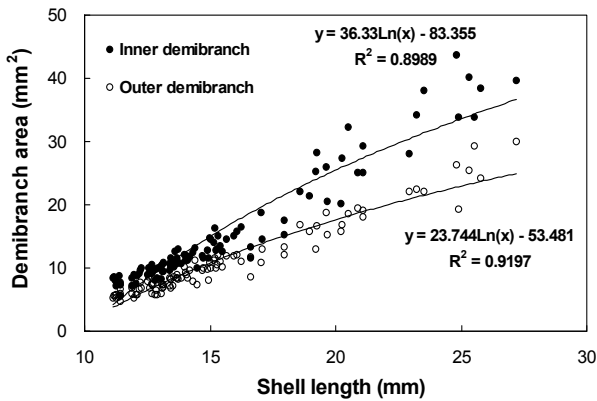


Fig. 2. Relationship between the demibranch area and shell length of *Corbicula japonica*.

(abfrontal zone) 로 나눌 수 있었다. 또한 이들 상피세포들은 그 위치에 따라 상부에는 정단 섬모상피세포 (frontal ciliated

epithelium), 정단측면섬모상피세포 (latero-frontal ciliated epithelium), 후정단측면상피세포 (postlatero-frontal epithelium), 측면섬모상피세포 (lateral ciliated epithelium) 가 존재하고 (Figs. 3A and 4D), 새엽의 중간부분에는 혈림 프동을 둘러싸고 있는 혈관상피세포 (endothelial epithelium) 가 존재하며, 하부에는 새엽하부상피세포 (abfrontal epithelium) 가 존재하였다 (Figs. 3A and 4D).

새엽에 존재하는 섬모들 또한 그 위치에 따라 정단섬모, 정단측면섬모 그리고 측면섬모로 구분되어졌다. 새엽의 정단부분에 존재하는 정단섬모는 길이가 가장 짧고, 분포정도 또한 가장 적은 섬모였다. 정단측면섬모는 정단섬모와 측면섬모 사이에 위치하며, 정단섬모를 향해 굽어 있다. 가장 길고 가장 많이 분포하는 측면섬모는 섬모대 (ciliary disc)를 형성하며, 이웃하는 섬모와 마주보고 있는 구조를 하고 있었다 (Figs. 3 and 4).

TEM 관찰 결과, 정단섬모는 높이 약 7 μm 로 정단면에서 기저부분으로 갈수록 좁아지는 긴 역삼각형이었다. 세포질의 상부에는 다수의 미토콘드리아와 크기가 다양한 공포들이 다수 존재하고 있었다. 세포의 중앙에는 타원형의 핵이 존재하며, 핵의 내부에는 전자밀도가 높은 이형염색질의 발달이 뚜렷하였다. 인접한 상피세포들은 부착띠와 부착반에 의해 연결되어 있었다 (Fig. 5A). 정단측면 상피세포는 높이 약 5 μm 의 불규칙한 원주형으로서 자유면에는 섬모와 미세융모가 잘 발달되어 있었는데, 섬모의 분포는 정단상피세포 보다 조밀하였다. 핵의 형태, 세포질과 핵의 미세구조적 특징 그리고 세포연접의 발달은 정단상피세포와 유사하였다 (Fig. 5B). 후정단측면상피세포는 높이와 너비 각각 3 μm , 8 μm 인 편평형 상피세포로서 세포질 내에는 미토콘드리아와 다수의 골지체 그리고 조면소포체가 잘 발달되어 있었다 (Fig. 5C). 측면상피세포는 새엽의 측면에 위치하며, 길이 약 5 μm 의 원주형이었다. 이들 세포의 자유면에 존재하는 섬모의 분포 정도는 새엽

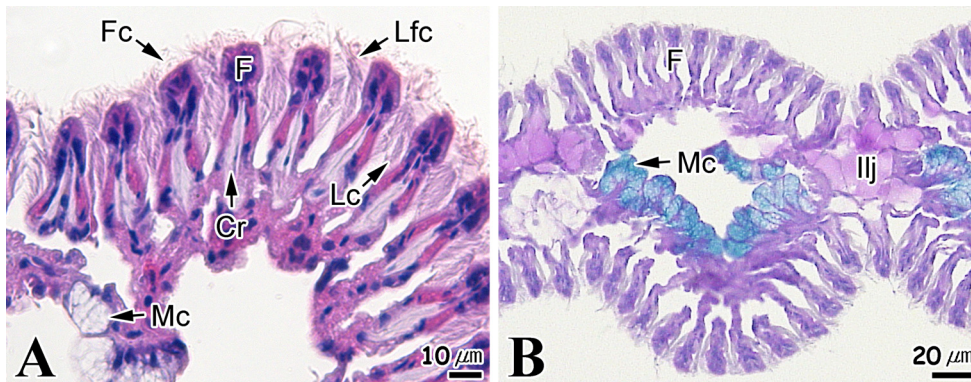


Fig. 3. Photomicrographs of the gill in *Corbicula japonica*. A: Filament (F), showing the frontal cilia (Fc), lateral cilia (Lc) and latero-frontal cilia (Lfc) in the filament. H-E stain. B: Plica, note that mucous cell (Mc) existed at the abfrontal zone of the filament. Cr, chitinous rod; Iij, inter-lamella junction.

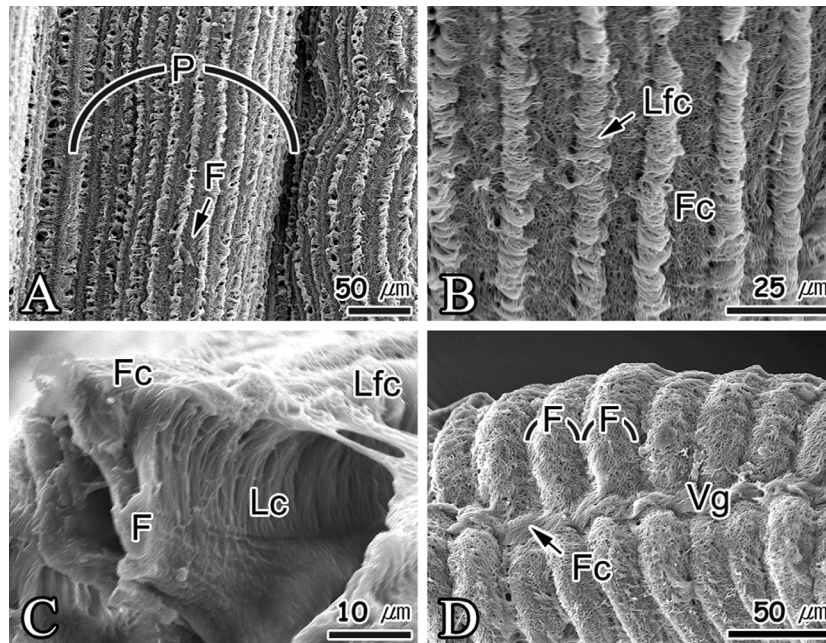


Fig. 4. Scanning electron micrographs of the gill of *Corbicula japonica*. **A:** The plica (P) on the demibranch; note the plica with numerous filaments (F). **B:** Frontal view of filament, showing the frontal cilia (Fc) and latero-frontal cilia (Lfc) on the filament. **C:** Cross section of the filament, showing the frontal cilia, latero-frontal cilia and lateral cilia. **D:** Marginal zone of the plica, showing the ventral groove (Vg) between the lamellae.

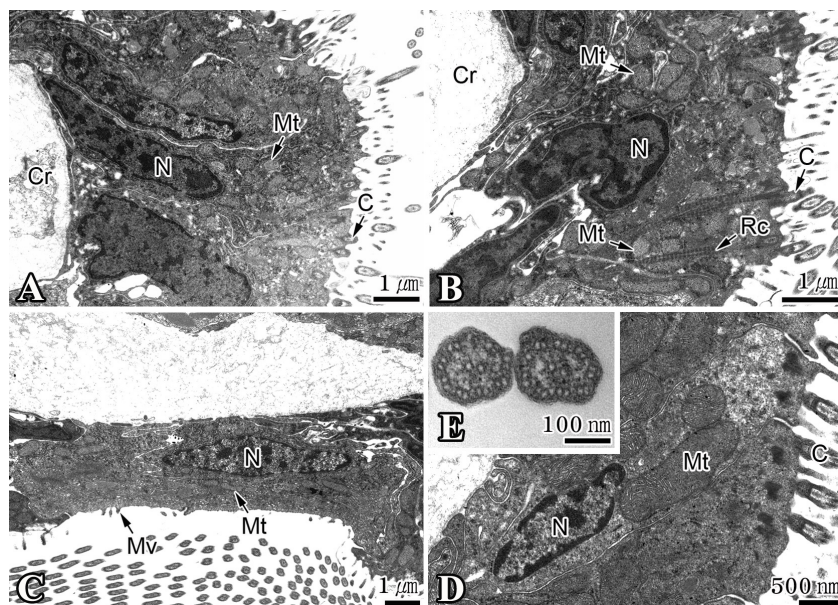


Fig. 5. Gill filament ultrastructure of *Corbicula japonica*. **A:** Section of the frontal ciliated epithelium, showing the cilia (C) on free surface. **B:** Section of the latero-frontal ciliated epithelium, showing the cilia faced frontal epithelium. **C:** Postlatero-frontal epithelium, note the squamous and non-cilia on the free surface. **D:** Lateral ciliated epithelium, showing the numerous mitochondria (Mt) in the cytoplasm. **E:** Cross section of cilia, showing the "9+2" microtubule system. Cr; chitinous rod, Mv; microvilli, N; nucleus, Rc; rootlet complex.

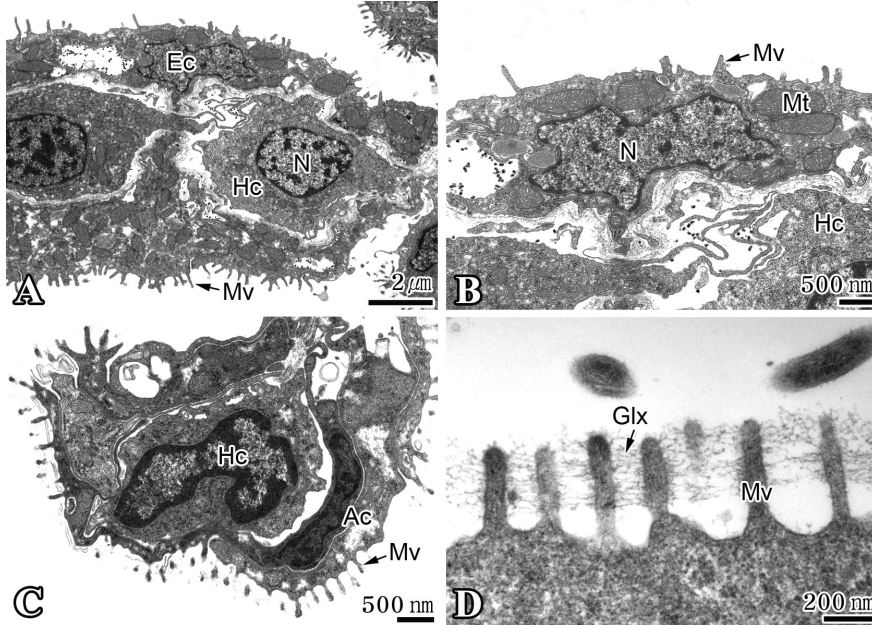


Fig. 6. Gill filament ultrastructure of *Corbicula japonica*. **A:** Intermediate zone filament, showing the hemocyte (Hc) in the hemolymph sinus surrounding endothelial cell (Ec) having microvilli (Mv). **B:** Endothelial cell, note the atypical large nucleus and numerous mitochondria (Mt). **C:** Abfrontal zone filament, showing the squamous abfrontal cell (Ac). **D:** The free surface of the abfrontal cell, note microvilli connected glycocalyx (Glx). N; nucleus.

의 섬모세포 중에서 가장 높았다. 인접한 새엽 상피세포의 자유면은 서로 마주보고 있었다 (Fig. 5D). 이들 섬모의 구조는 중심미세소관과 주변미세소관이 9+2 구조를 하고 있었다 (Fig. 5E).

중간부분에는 다수의 혈구가 존재하는 혈림프동이 관찰되었는데, 혈림프동의 주변은 혈관상피세포에 의해서 둘러싸여 있었다 (Fig. 6A). 이들은 섬모가 존재하지 않는 세포이다. 세포질에는 비정형의 거대 핵과 글리코젠 과립을 함유하는 다수의 공포들이 존재하였다. 상피세포의 자유면에는 다수의 미세용모가 관찰되었다 (Fig. 6B).

새엽의 하부에 존재하는 하부상피세포들은 편평형으로서 이들의 세포질에는 이형염색질이 잘 발달된 원형의 핵이 존재하고 있었다 (Fig. 6C). 세포의 자유면에는 섬모가 관찰되지 않았지만 길이 약 400 nm의 미세용모가 다수 존재하였다. 미세용모들은 당질층 (glycocalyx) 에 의해서 서로 연결되어 있었다 (Fig. 6D).

새엽의 중간부분에는 상피세포들을 서로 연결시켜주는 결합조직들이 존재하고 있었는데, 결합조직들은 전자밀도가 높은 근섬유와 전자밀도가 낮은 교원섬유들이 서로 엮여 있는 구조를 하고 있었다 (Fig. 7A).

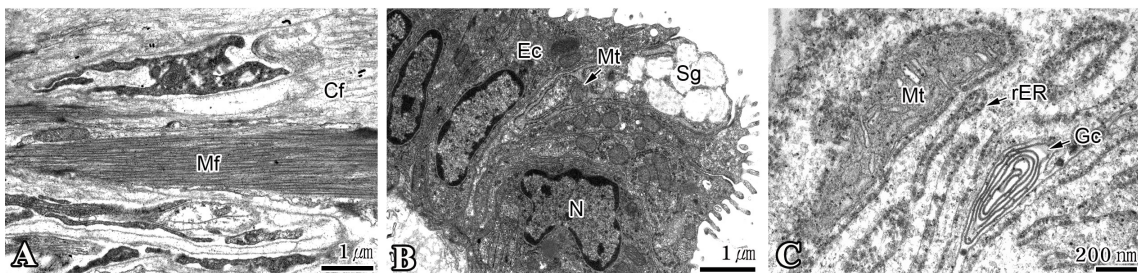


Fig. 7. Gill filament ultrastructure of *Corbicula japonica*. **A:** Longitudinal section muscular fiber (Mf) and collagen fiber (Cf); note muscular fiber of high electron density and collagen fiber of low electron density. **B:** Secretory cell, showing the secretory granule (Sg) filled with fibrous substances. **C:** Cytoplasm of the secretory cell, showing the well-developed mitochondria (Mt), rough endoplasmic reticulum (rER) and Golgi complex (Gc).

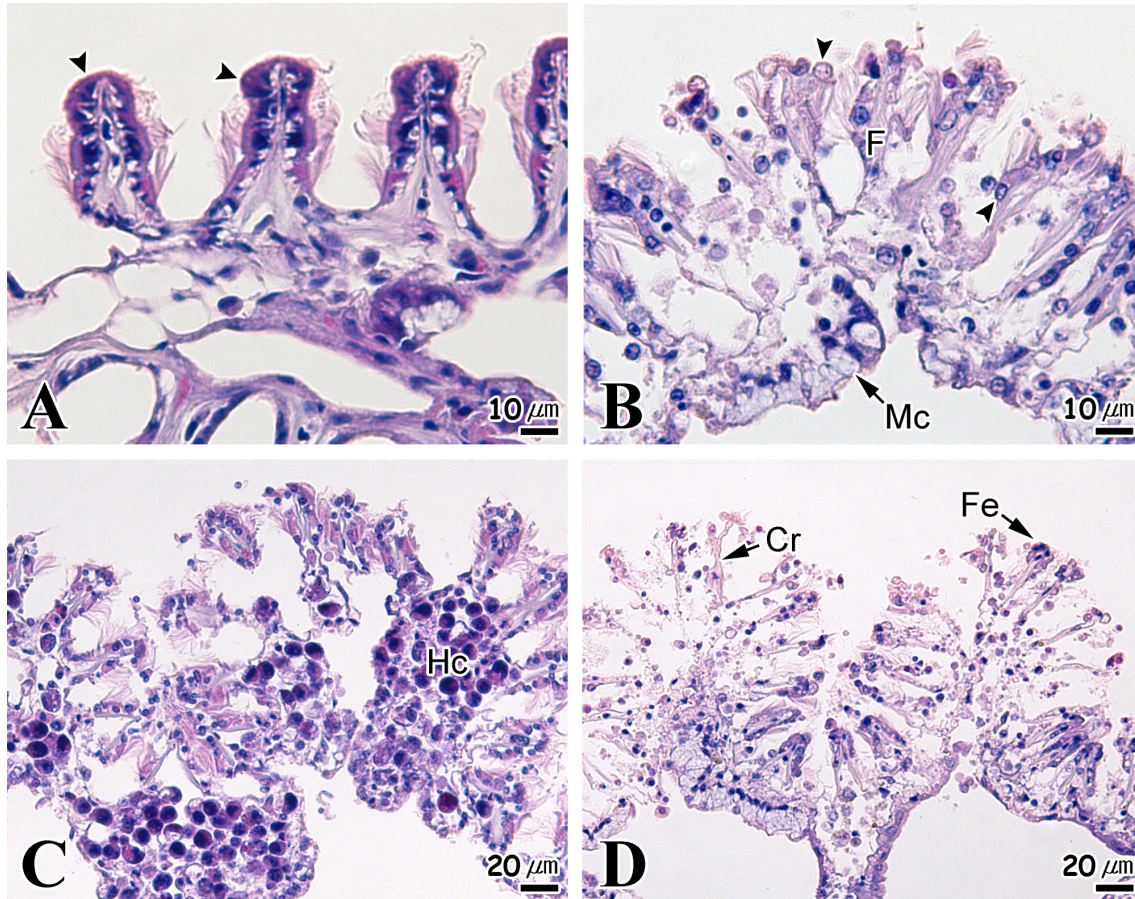


Fig. 8. Photomicrographs of the gill in *Corbicula japonica* exposed to acute salinity. **A:** 5 psu, showing the disappearance of frontal and latero-frontal cilia (arrowhead). **B:** 10 psu, note the partially destruction of the epithelial cell in the filament (F). **C:** 20 psu, showing the numerous hemocyte (Hc) in the abfrontal zone. **D:** 20 psu, note the partially destruction of the epithelial cell in the filament. Cr, chitinous rod; Mc, mucous cell; Fe, frontal epithelial cell.

새엽의 상부보다는 하단에 주로 존재하는 점액세포들은 AB-PAS (pH 2.5) 반응을 시행하였을 때 alcian blue에서 양성으로 반응하여 파란색 (659C) 로 관찰되었다 (Fig. 3B). TEM으로 관찰하였을 때 이들 분비세포는 한 종류로서 다양한 크기의 전자밀도가 낮은 섬유성의 분비과립을 함유하고 있었다 (Fig. 7B). 분비과립의 주변에는 잘 발달된 조면소포체와 골지체가 세포질의 하부에서 관찰되었다 (Fig. 7C).

2) 노출구 아가미

5 psu에 노출된 일본재첩 아가미는 SEM으로 관찰한 결과 정단섬모와 정단측면섬모의 부분적인 탈락이 나타났다 (Figs. 8A and 9A). TEM으로 관찰한 결과 아가미 새엽 상피세포들의 세포질내에 다수의 공포들이 생성되어 세포의 부종이 나타났으며, SEM에서와 마찬가지로 정단섬모와 정단측면섬모의

탈락이 나타났다 (Fig. 10A). 또한 새엽의 중간부분에 존재하는 결합조직 안에는 glycogen 과립들이 다수 관찰되었다. 결합조직안에 존재하는 섬유아세포들은 세포질내의 미토콘드리아들이 파괴되었다 (Fig. 10C). 그리고 콜라겐섬유들은 절단되어 흩어져 있는 조직상이 관찰되었다 (Fig. 10D).

10 psu에 노출된 개체들에서는 새엽상피층의 부분적인 파괴와 함께 피사된 상피세포들의 핵은 비대되었다. 또한 새엽의 하부에 다수 존재하던 점액세포들은 감소하였다 (Fig. 8B). SEM으로 관찰한 결과 새엽의 정단섬모와 정단측면섬모의 탈락과 함께 세포의 파괴가 관찰되었으며 (Fig. 9B), 측면섬모의 부분적인 소실로 인하여 섬모대의 파괴가 나타났다 (Fig. 9C). TEM으로 관찰한 아가미들은 측면섬모세포의 미토콘드리아를 포함한 세포소기관들이 파괴되었다. 또한 이들 세포의 상부에 존재하는 섬모의 기저체들이 파괴됨에 따라 섬모의 탈

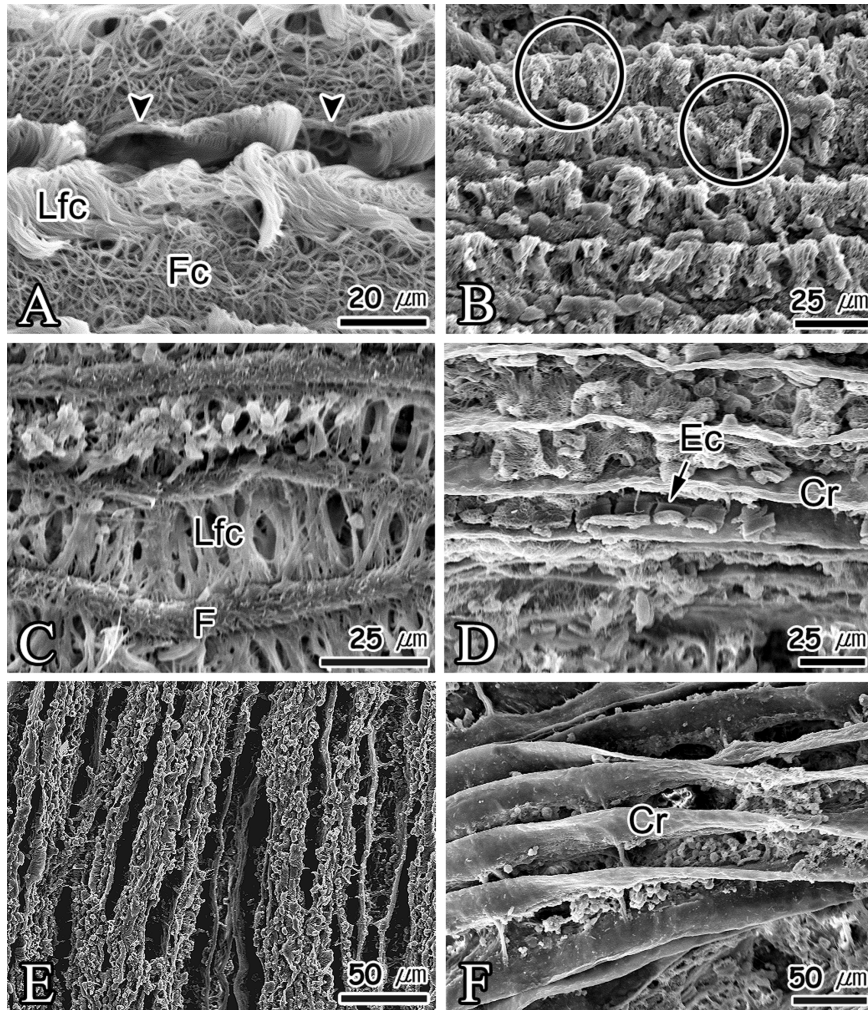


Fig. 9. Scanning electron microscopy of the gill in *Corbicula japonica* acute exposed to salinity. **A:** 5 psu, showing the partially disappearance of the frontal cilia (Fc) (arrowhead). **B:** 10 psu, showing the edema and destruction of the epithelial cell (circles). **C:** 10 psu, showing the disappearance of latero-frontal (Lfc) and lateral cilia. **D:** 20 psu, showing the destruction of the epithelial cell (Ec). **E and F:** 20 psu, showing the collapse of epithelial layer of the filaments. Cr, chitinous rod.

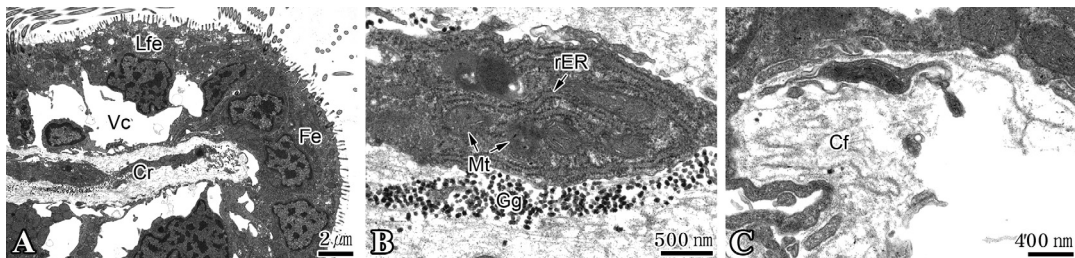


Fig. 10. Gill filament ultrastructure of *Corbicula japonica* exposed to acute 5 psu salinity. **A:** Filament, note the edema with vacuoles (Vc) of the epithelial cell. **B:** Connective tissue, note the increased of glycogen granules (Gg). **C:** Connective tissue, show the fragmentation of the collagen fibers (Cf). Cr, chitinous rod; Fc, frontal cilia; Lfc, latero-frontal cilia; rER, rough endoplasmic reticulum.

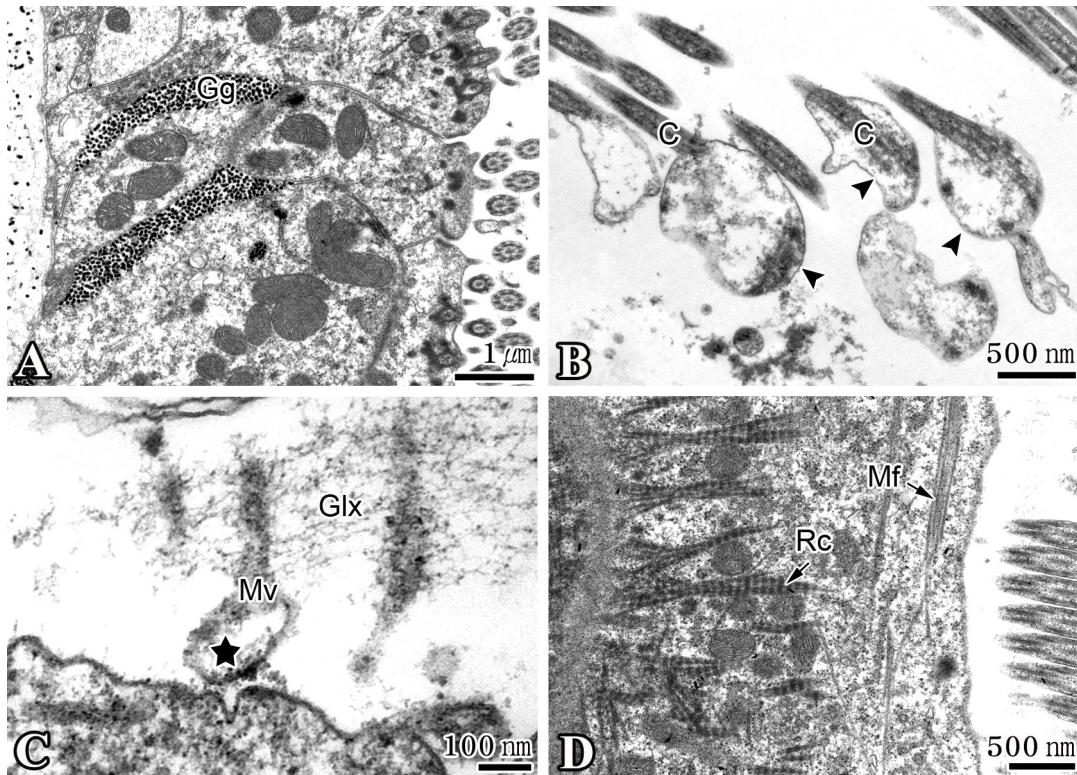


Fig. 11. Gill filament ultrastructure of *Corbicula japonica* exposed to acute 10 psu salinity. **A:** Lateral ciliated epithelial cell, showing the numerous glycogen granules (Gg) in the cytoplasm. **B:** Cilia (C), showing the extension of plasma membrane (arrowhead). **C:** Microvilli (Mv), showing the extension of plasma membrane (asterisk) and fragmentation of the glycocalyx (Glx). **D:** Lateral ciliated epithelial cell, note the disappearance of the cilia and basal body. Mf, microfilament; Rc, rootlet complex.

락이 관찰되었다. 섬모세포 사이에는 다수의 glycogen 과립들이 생성되었다 (Fig. 11A). 탈락되었던 섬모들은 원형질막이 팽창되어 있었으며, 이들 원형질막안에는 파괴된 섬모의 잔여물들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 11B). 섬모가 소실과 함께 미세융모 또한 탈락되었는데, 미세융모의 기저부분은 원형질막이 팽창되어 있었다. 더욱이 이들 미세융모를 연결시키는 당질층의 파괴도 함께 관찰되었다 (Fig. 11C). 섬모와 미세융모가 모두 소실된 세포에서는 세포의 상부에 존재하는 미토콘드리아, 기저체들이 모두 소실되었으며, rootlet complex 또한 세포의 기저부분에만 남아있었다 (Fig. 11D).

일본제척이 20 psu에 7일 동안 노출된 경우 새엽상피세포의 핵이 비대되면서 동시에 상피층의 파괴되었다. 새엽의 하부에는 다수의 혈구들이 침착되었다 (Fig. 8C). 대부분의 상피층이 파괴된 부분에서는 키틴질기둥만 남아있는 조직상이 관찰되었다 (Fig. 8D). SEM으로 관찰한 아가미들은 새엽 상피세포의 탈락으로 인하여 키틴질 기둥이 노출되었다 (Fig. 9D and E). 새엽의 상부에 존재하는 상피세포들이 모두 소실된 경우에는 SEM 상에서 새엽의 중간부분에 존재하는 파괴된 상피세포를 관찰할 수 있었다 (Fig. 9F). TEM으로 관찰된

아가미들은 새엽 상부에 존재하는 섬모상피세포들의 핵이 비대되고 (Fig. 12A), 세포질에는 glycogen 과립을 함유한 공포들이 존재하여 핵이 세포의 정단부로 이동하였다. 이들 세포의 세포질에는 조면소포와 골지체의 파괴 및 미토콘드리아의 소실이 관찰되었다 (Fig. 12B). 세포질내 다수의 공포들이 존재하는 섬모세포의 경우 세포의 형태가 변형되었으며, 미토콘드리아를 제외한 대부분의 세포소기관들이 소실되었다 (Fig. 12C). 이후 키틴질 기둥을 둘러싸고 있는 새엽 섬모상피세포들은 괴사되어 세포막이 파괴되었으며, 키틴질 기둥의 정단부도 일부 파괴되었다 (Fig. 12D).

고 찰

물리화학적 스트레스에 노출된 수서생물들은 세포내 생화학적 및 생리학적 역기능이 발생하게 되고, 이후 세포는 죽게 된다. 하지만 생화학적 적응을 하게 되는 경우 크게 두가지 경향으로 나뉘게 된다. 하나는 생화학적 적응을 통해 새로운 생리반응이 나타나게 되어 세포와 조직의 형태학적인 변형을 일으킴으로써 생물의 전체적인 변화를 야기하게 된다. 또

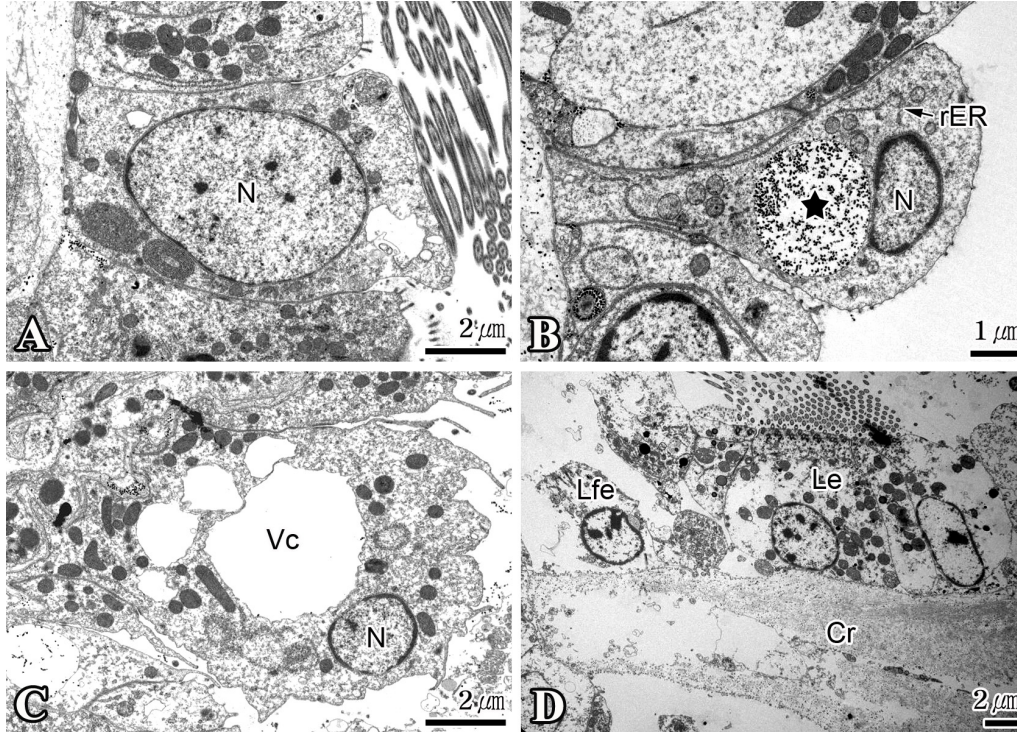


Fig. 12. Gill filament ultrastructure of *Corbicula japonica* exposed to acute 20 psu salinity. **A:** The epithelial cell of the filament, showing the hypertrophy nucleus (N). **B:** The epithelial cell of the filament, showing the vacuole with glycogen granules (asterisk). **C:** The epithelial cell of the filament, showing the numerous vacuoles (Vc) in the cytoplasm. **D:** Filament, note the destruction of the epithelial cell. rER, rough endoplasmic reticulum; Lc, lateral cilia.

다른 하나는 DNA의 변형이 생겨 종양이 생성되게 되는데, 이 경우에는 종양에 의해서 사망하거나 그 상태로 살아가기도 한다 (SETAC, 1992).

이매패류의 아가미는 호흡 뿐만 아니라 순린과 함께 여과섭식의 기능을 담당하기 때문에 이들의 기능적인 측면에 많은 연구가 보고되고 있다 (MacGinitie, 1941; Jørgensen, 1981; Beninger *et al.*, 1988; 1991; 1992, Ward *et al.*, 1993). 또한 이매패류 아가미의 구조, 점액 분비세포와 섬모운동의 특성은 환경변화 및 섭이생태와 연관하여 많은 연구가 수행되어지고 있다 (Fiala-Médioni and Métivier, 1986; Fiala-Médioni *et al.*, 1986; Axiak and George, 1987; Gregory *et al.*, 1999).

정단섬모는 아가미 쪽으로 이동된 과립들이 입으로 이동될 수 있도록 세엽의 위쪽 혹은 아래쪽으로 전달하는 역할을 한다. 정단섬모와 측면섬모의 사이에 존재하는 정단측면섬모는 과립들을 정단섬모 쪽으로 튕겨 보내는 방식으로 여과하거나, 외투강 안으로 들어온 물의 흐름을 조절한다. 그리고 세엽의 양쪽에 존재하는 측면섬모는 조밀하게 정렬되어 있으면서 입출수관을 통해 들어오고 나가는 물을 아가미 쪽으로 빨아들이고 내뿜어 과립들을 여과한다 (Morton, 1983; Moore,

1971; Owen, 1974). 일반적으로 이매패류는 직경 1 μm 크기의 과립도 여과할 수 있지만, 백합과 이매패류인 *Venerupis pullastra*는 과립의 직경이 3-4 μm 보다 큰 경우 100% 여과한다 (Møhlenberg and Riisgård, 1978). 긴 정단측면섬모를 가지는 *Mercenaria mercenaria* 모패의 경우 4 μm 이상의 과립들을 여과할 수 있고, 2 μm 정도의 과립들은 50% 정도 여과된다. 이매패류의 정단측면섬모는 과립의 여과와 밀접한 관계가 있어서 정단측면섬모의 발달이 미약한 가리비과 이매패류인 *Aequipecten irradians concentricus*는 5-6 μm 보다 큰 경우 100% 여과하고, 2 μm 정도의 과립들은 15% 정도 여과한다 (Grizzle *et al.*, 2001). 이매패류 아가미 세엽 상피층에 존재하는 점액물질의 기능은 외투강 안으로 들어온 과립물질들을 아가미의 섬모에 잘 부착하게 하여 섬모에 의한 여과 기능을 도와주는 역할을 한다 (Tammes and Dral, 1955; Dral, 1967).

대부분의 이매패류들은 광염성으로써 해양이매패류의 경우 4-5 psu의 농도에서도 적응이 가능하며, 버지니아굴, *Crassostrea virginica*의 경우에는 0.2-3.5 psu의 농도에서도 5개월 동안 생존이 가능한 것으로 알려져 있다 (Butler, 1952). 이매패류들은 급격한 환경변화에 노출되면 패각을 닫

고 무산소호흡의 상태로 존재하게 되는데 (Gosling, 2003), 이는 외부의 환경변화를 방어하기 위한 생리반응이다. 하지만 낮은 농도의 유해물질 노출과 같은 미비한 수준의 환경변화에 대해서는 오히려 심각한 수준의 세포학적 또는 생리학적인 장애가 나타나게 되는데, 24주 동안 아연에 노출된 대복, *Gomphina veneriformis*의 경우에는 가장 낮은 노출농도인 0.64 mg L^{-1} 에서 8주 만에 모든 개체가 사망하였다 (Ju *et al.*, 2009).

섬모와 미세융모의 팽창은 기능적으로 볼 때 여과율과 과립수송에 영향을 준다 (Bigas *et al.*, 2001). 그리고 섬모가 팽창되지 않았더라도 섬모 원형질막과 섬모축사를 둘러싸고 있는 기질의 비정상적인 팽창은 기능적으로 불안정한 상태를 유발할 수 있다 (Ghadially, 1997). Abel (1976) 과 Sze and Lee (2000) 는 조직병리학적인 변화는 산소소비율의 감소를 유발하게 되는 직접적인 원인이 된다. 또한 간접적으로는 먹이섭이율의 장애를 초래하게 되어 먹이섭식의 저하로 인한 생리적인 활동 에너지의 감소가 동반되게 된다. 고염분에 노출된 일본재첩의 아가미들은 섬모와 미세융모의 원형질막이 팽창되었고, 새엽 섬모상피세포들의 변형 및 섬모와 미세융모가 탈락되었다. 따라서 일본재첩의 섬모와 미세융모의 소실로 인하여 외투강 안으로 들어온 먹이들이 아가미의 먹이흡이 있는 부분으로 이동할 수 없게 되어 여수율의 감소 및 산소소비율의 장애를 초래할 것이다.

다수의 효소와 조효소를 가지고 있는 미토콘드리아는 먹이를 통해 얻어진 에너지를 이들 효소들에게 전달해 준다. ATP에 고 에너지 인산화 결합의 형태로 에너지를 저장 혹은 전달하게 되며, 세포에서 에너지가 필요할 경우 즉시 에너지를 공급한다 (Bubel, 1989). 투과전자현미경으로 관찰된 일본재첩 아가미 섬모세포의 정단부에 존재하는 미토콘드리아의 파괴 및 감소는 섬모 운동에너지 전달의 장애를 유발할 것으로 생각된다.

7일 동안 염분에 노출된 일본재첩은 고염분 일수록 폐각을 당한 개체들이 다수 관찰되었다. 이들 개체들은 스트레스에 의한 무산소호흡 상태인 것으로 보여지는데, 이매패류들은 물리·화학적인 갑작스런 환경변화에 대해서 방어기작으로 무산소호흡이 진행된다. 이러한 무산소호흡동안 개체들은 산소를 이용하지 않고 글루코스를 이용하여 ATP 작용을 통한 에너지를 전달하게 되는데 이때에는 소화, 배설, 운동 및 성장이 멈춰지게 된다 (Gosling, 2003). 따라서 이러한 생리적인 활동의 억제와 만성노출로 인하여 지속될 경우 개체들은 생화학적으로 약해지고 사망률도 높아지게 될 것이다.

본 연구의 결과 섬진강에 서식하는 일본재첩은 기수지역의 이매패류로 알려져 있지만, 고염분 하에서 지속적으로 노출될 경우 아가미 조직의 변형 및 파괴로 인하여 먹이섭이 및 산소

소비와 같은 생리적인 기능이 장애를 받을 것으로 생각되어진다. 결국 이러한 조직의 변화와 함께 생리적인 장애는 개체의 사망을 유발하게 되는 요인으로 분석된다.

요 약

96시간 동안 고염분에 노출시킨 일본재첩, *Corbicula japonica*의 LC_{50} 은 19.550 psu 였다. 0, 5, 10, 20 psu에 7일 동안 노출시킨 실험개체들은 실험종료시기에 각각 95%, 80%, 35%, 10%의 개체들이 생존하였다. 일반적인 일본재첩의 아가미는 좌우 한 쌍으로서 내부판의 면적은 외부판보다 1.37배 넓었다 ($p < 0.001$). 아가미의 새엽에는 그 위치에 따라 상부에 정단섬모상피세포 ($7 \mu\text{m}$), 정단측면섬모상피세포 ($5 \mu\text{m}$), 후정단측면섬모상피세포 ($3 \times 8 \mu\text{m}$), 측면섬모상피세포 ($5 \mu\text{m}$) 가 존재하고, 새엽의 중간부분에는 혈림프동을 둘러싸고 있는 혈관상피세포가 존재하며, 하부에는 새엽하부상피세포가 존재하고 있었다. 새엽의 하부에 주로 존재하는 분비세포들은 전자밀도가 낮은 섬유성의 분비과립을 가지고 있었다. 5 psu에 7일 동안 노출된 일본재첩의 아가미는 부분적인 섬모의 탈락과 glycogen 과립이 다수 관찰되었다. 10 psu에 노출된 개체들은 일부 새엽의 상피세포가 파괴되었으며, 미토콘드리아를 포함한 세포소기관 또한 파괴되었다. 섬모들은 원형질막이 팽창되었고 미세융모를 연결시키는 당질층의 파괴도 관찰되었다. 20 psu에 노출된 일본재첩의 아가미는 새엽섬모상피세포 핵비대, 세포소기관의 파괴, 세포질내 glycogen 과립의 침적과 공포형성이 관찰되었고, 50% 이상의 새엽은 새엽상피층의 탈락으로 인하여 키틴질 기둥이 모두 노출되었다. 따라서 이러한 섬모와 상피세포의 파괴는 생리활동의 장애를 유발시키고, 개체 사망의 직접적인 원인으로 작용할 것이다.

사 사

이 연구는 어장환경과 어장환경모니터링 사업 (RP-2011-ME-008) 으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Abel, P.D. (1976) Effects of some pollutants on the filtration rate of *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.*, **7**: 228-231.
- Allen, J.A. (1962) Preliminary experiments on the feeding and excretion of bivalves using *Phaeodactylum* labelled with ^{32}P . *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **42**: 609-623.
- Asmus, R.M. and Asmus, H. (1993) Phytoplankton-mussel bed interactions in intertidal ecosystems. *In*: Dame, R.F. (ed.), *Bivalve filter feeders in estuarine and coastal ecosystem processes*,

- pp. 57-84. NATO, A.S.I. Series, Vol. G33, Springer-Verlag, Berlin.
- Axiak, V. and George, J.J. (1987) Effects of exposure to petroleum hydrocarbons on the gill functions and ciliary activities of a marine bivalve. *Mar. Biol.*, **94**: 241-249.
- Beninger, P.G., Le Pennec, M. and Donval, A. (1991) Mode of particle ingestion in five species of suspension-feeding bivalve molluscs. *Mar. Biol.*, **108**: 225-261.
- Beninger, P.G., Le Pennec, M. and Salaün, M. (1988) New observations of the gills of *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia), and implications for nutrition. *Mar. Biol.*, **98**: 61-70.
- Beninger, P.G., Ward, J.E., MacDonald, B.A. and Thompson, R.J. (1992) Gill function and particle transport in *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia) as revealed using video endoscopy. *Mar. Biol.*, **114**: 281-288.
- Bigas, M., Durfort, M. and Poquet, M. (2001) Cytological effects of experimental exposure to Hg on the gill epithelium of the european flat oyster *Ostrea edulis*: ultrastructural and quantitative changes related to bioaccumulation. *Tissue Cell*, **33**: 178-188.
- Bubel, A. (1989) Microstructure and function of cells; Electron micrographs of cell ultrastructure. pp. 1-271. Ellis Horwood Limited, Chichester.
- Butler, P.A. (1952) Growth and mortality rate in sibling and unrelated oyster populations. *Proc. Culf Carib. Fish. Inst.*, **4**: 71.
- Cranford, P.J. and Grant, J. (1990) Particle clearance and absorption of phytoplankton and detritus by the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **137**: 105-121.
- Dral, A.D.G. (1967) The movements of the latero-frontal cilia and the mechanism of particle retention in the mussel. *Neth. J. Sea Res.*, **3**: 391-422.
- Fiala-Médioni, A. and Métivier, C. (1986) Ultrastructure of the gill of the hydrothermal vent bivalve *Calyplogena magnifica*, with a discussion of its nutrition. *Mar. Biol.*, **90**: 215-222.
- Fiala-Médioni, A., Métivier, C., Herry, A. and Le Penec, M. (1986) Ultrastructure of the gill of the hydrothermal-vent mytilid *Bathymodiolus* sp. *Mar. Biol.*, **92**: 65-72.
- Foster-Smith, R.L. (1975) The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production on *Mytilus edulis* (L.), *Cerastoderma edule* (L.) and *Venerupis pullastra* (Montagu). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **17**: 1-22.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin J., Blaise C. and Gagné, F. (2002) Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comp. Biochem. Physiol. C*, **131**: 457-467.
- Gerdes, D. (1983) The Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Part I. Feeding behaviour of larvae and adults. *Aquaculture*, **31**: 195-219.
- Ghadially, F.N. (1997) Ultrastructural pathology of the cell and matrix (4th edition). pp. 1-1414. A Hoder Arnold Publication, Boston.
- Gosling, E.M. (2003) Circulation, respiration, excretion and osmoregulation. *In*: Bivalve Molluscs; biology, ecology and culture. pp. 201-224. Blackwell Publishing, Oxford.
- 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 filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Mar. Pollut. Bull.*, **39**: 116-121.
- Griffiths, R.J. (1980) Filtration, oxygen consumption and assimilation in the black mussel *Choromytilus meridionalis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **3**: 63-70.
- Grizzle, R.E., Bricelj, V.M. and Shumway, S.E. (2001) Physiological ecology of *Mercenaria mercenaria* *In*: Kraeuter, J.N. and Castagna, M. (eds.), Biology of the hard clam. pp. 305-382. Elsevier, New York.
- Hinch, S.G. and Stephenson, L.A. (1987) Size-and age-specific patterns of trace metal concentrations on fresh water clams from an acid-sensitive and a circumneutral lake. *Can. J. Zool.*, **65**: 2436-2442.
- Jørgensen, C.B. (1981) A hydromechanical principle for particle retention in *Mytilus edulis* and other ciliary suspension feeders. *Mar. Biol.*, **61**: 277-282.
- Ju, S.M., Park, J.J. and Lee, J.S. (2009) Induction of intersex and masculinization of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae) by zinc. *Animal Cell. Sys.*, **13**: 339-344.
- Kimbrough, K.L., Johnson, W.E., Lauenstein, G.G., Christensen, J.D. and Apeti, D.A. (2008) An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation's Coastal Zone. Silver Spring, MD. pp. 1-105. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 74.
- MacGinitie, G.E. (1941) On the method of feeding of four pelecypods. *Biol. Bull. Woods Hole.*, **80**: 18-25.
- Møhlenberg, F. and Riisgård, H.U. (1978) Efficiency of particle retention in 13 species of suspension feeding bivalves. *Ophelia*, **17**: 239-246.
- Moore, H.J. (1971) The structure of the latero-frontal cirri on the gills of certain lamellibranch molluscs and their role in suspension feeding. *Mar. Biol.*, **54**: 1473-147.
- Morton, B.S. (1983) The biology and functional morphology of the weisted ark *Trisidos semitorta* (Bivalvia: Arcacea) with a discussion on shell "torsion" in the genus. *Malacologia*, **23**: 375-396.
- NSTF (1990). North Sea Task Force Monitoring Master Plan. North Sea Environment report No 3. North Sea Task Force/Oslo and Paris Commissions/ICES, London
- Owen, G. (1974) Studies on the gill of *Mytilus edulis*: the eu-latero-frontal cilia. *Proc. R. Soc. London Ser. B*, **187**: 83-91.
- Palmer, R.E. (1980) Behavioral and rhythmic aspects of

- filtration in the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus* (Say), and the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **45**: 273-295.
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J. and Mothersill, C. (2004) The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat. Toxicol.*, **66**: 279-292.
- Rasmussen, L.P.D., Hage, E. and Karlog, O. (1983) Light and electron microscopic studies of the acute and chronic toxic effects of N-nitroso compounds on the marine mussel, *Mytilus edulis* (L). II. N-methyl-N-nitro-N-nitrodoguanidine. *Aquat. Toxicol.*, **3**: 01-311.
- Regoli, F. and Orlando, E. (1994.) Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment. *Mar. Pollut. Bull.*, **28(10)**: 592-600.
- Schulte, E.H. (1975) Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **30**: 331-341.
- SETAC. (1992) Biomarkers: biochemical physiological and histological markers of anthropogenic stress. *In*: Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (eds.), pp. 1-347. SETAC Special Publication Series. Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Shumway, S.E., Cucci, T.L., Newell, R.C. and Yentsch, C.M. (1985) Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **91**: 77-92.
- Sunila, I. and Lindström, R. (1985) Survival, Growth and shell deformities of copper-and cadmium-exposed mussels (*Mytilus edulis* L.) in Brackish water. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **21**: 555-565.
- Sze, P.W.C. and Lee, S.Y. (2000) Effects of chronic copper exposure on the green mussel *Perna viridis*. *Mar. Biol.*, **137**: 379-392.
- Tammes, P.N.L. and Dral, A.D.G. (1955) Observations on the straining of suspensions by mussels. *Arch. Neerl. Zool.*, **11**: 87-112.
- UN (1999). United Nations environment programme. Report of the fifth meeting of the conference of the parties to the basel, 6-10 December, pp. 1-111.
- Ward, J.E., MacDonald, B.A., Thompson, R.J. and Beninger, P.G. (1993) Mechanisms of suspension feeding in bivalves: resolution of current controversies by means of endoscopy. *Limnol. Oceanogr.*, **38**: 265-272.
- Winter, J.E. (1978) A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture*, **13**: 1-33.