

Original article

UV와 O₃ 노출에 따른 깔따구류의 생물학적 반응 및 열충격 단백질 70 발현

김지훈¹ · 김원석¹ · 박재원¹ · 고봉순¹ · 박기연² · 곽인실^{1,2,*}

¹전남대학교 해양융합과학과, ²전남대학교 수산과학연구소

Comparison of Biological Responses and Heat Shock Protein 70 Expression in Chironomidae by Exposure UV and O₃. Ji-Hoon Kim¹ (0000-0002-1157-9308), Won-Seok Kim¹ (0000-0003-3368-3891), Jae-Won Park¹ (0000-0002-4067-7089), Bong-Soon Ko¹ (0000-0003-2761-0231), Kiyun Park² (0000-0003-2965-6970) and Inh-Sil Kwak^{1,2,*} (0000-0002-1010-3965) (¹Department of Ocean Integrated Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; ²Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea)

Abstract UV and O₃ are materials used in the water treatment process, and many studies have been reported to remove organic matters, contaminants, and microorganisms. In this study, we were investigated effects of Chironomidae (*Chironomus flaviplumus*, *Chironomus riparius*), which are contamination indicator species to exposure UV and O₃ for the survival rate, body color change and gene expression response. The survival rate of *C. flaviplumus* exposed to UV decreased to about 70% after 24 hours, and *C. riparius* about 50%. There was no change in the survival rate of *C. flaviplumus* exposed to O₃, and *C. riparius* decreased to 95% after 10 minutes of exposure, but there was no change during the subsequent exposure time. In addition, UV and O₃ exposure to the two species in body color faded in a time-dependent. In the HSP70 gene expression, *C. riparius* showed an increase in expression after UV exposure compared to the control group, and a significant difference was shown 12 hours after exposure ($P < 0.05$). *C. flaviplumus* exposed to O₃ showed a relatively low expression compared to the control group, and showed a significant difference at 10 minutes and 1 hour after exposure ($P < 0.05$). These results reported the ecotoxicological effects on Chironomidae according to UV and O₃ exposure. Therefore, the results of this study can be used as basic data to understand the effects of UV and O₃, which are disinfectants used in water treatment plants, on Chironomidae entering plants.

Key words: *Chironomus flaviplumus*, *Chironomus riparius*, UV, O₃, acute toxicity, survival rate, mRNA expression, HSP70

서론

정수장은 수자원 관리와 함께 정수처리 공정을 통해 깨끗한 물을 인간에게 공급하고 있다. 하천 내 물을 원수로 사용하여 다양한 소독 및 방제공정을 통해 원수에 존재하는 유기물 및 오염물질을 제거한다. 그중, 정수장 내 살균 소독 목적으로 사용되는 UV와 O₃가 대표적인 물질로서 이용되고 있다(Lee *et al.*, 2003). UV(Ultraviolet)는 오존층을 지나 지상까지 도달하는 가시광선보다 짧은 파장을 갖고 있으며 파장에 따라 UV-A (320~400 nm), UV-B

정수장은 수자원 관리와 함께 정수처리 공정을 통해 깨끗한 물을 인간에게 공급하고 있다. 하천 내 물을 원수로 사용하여 다양한 소독 및 방제공정을 통해 원수에 존재하는 유기물 및 오염물질을 제거한다. 그중, 정수장 내 살균 소독 목적으로 사용되는 UV와 O₃가 대표적인 물질로서 이용되고 있다(Lee *et al.*, 2003). UV(Ultraviolet)는 오존층을 지나 지상까지 도달하는 가시광선보다 짧은 파장을 갖고 있으며 파장에 따라 UV-A (320~400 nm), UV-B

Manuscript received 2 December 2023, revised 29 December 2023, revision accepted 29 December 2023

* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148, Fax: +82-61-659-7149
E-mail: inkwak@hotmail.com / iskwak@chonnam.ac.kr

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

(280~320 nm), UV-C (200~280 nm)으로 나뉜다. 정수처리 공정에서 살균효과가 높은 UV-C 254 nm의 영역을 이용하고 있으며 소독 원리는 UV의 에너지에 의해 미생물의 DNA 변형 또는 세포벽이 파괴되는 원리로 이용된다. 245~290 nm 영역은 DNA에 대한 흡수가 높으며 염기서열 중 티민(T), 사이토신(C) 결합에 영향을 주어 돌연변이를 생성한다(Tornaletti and Pfeifer, 1996; Matsumura and Ananthaswamy, 2004). UV를 이용한 소독 공정은 1998년 이전까지 미생물의 활성을 막기 위해 세포벽을 파괴해야만 한다고 알려져 있었으나, DNA 변형 유도만으로 미생물의 감염성이 제거된다는 발견 이후 사용이 증가하였다(Clancy *et al.*, 1998). O₃는 염소를 이용한 소독 공정에 발생하는 부산물을 제거하기 위한 추가 공정인 고도정수처리에 주로 이용된다. O₃는 미량 유기 오염 물질을 제거하는 데 효과적이며(Pisarenko *et al.*, 2012), 이 외에 미세여과(microfiltration), 한외여과(ultrafiltration) 및 RO(Reverse Osmosis) 멤브레인의 오염을 제거하는 데 이용된다고 보고되었다(You *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2010; Stanford *et al.*, 2011). 또한, 최근 인천에서 발생한 수돗물 유충 유출사건으로 정수처리공정에서 화학적 처리는 이루어지고 있으나, 생물학적 처리에 대한 관리는 이루어지지 않았음이 확인되었다(Kwak *et al.*, 2020). 특히, UV와 O₃는 정수시설에서 이용하는 대표적인 소독물질로 이용하며 외부에서 유래되는 유기물 및 미생물 방제를 위해 활용되고 있다. 따라서, 최근 정수시설에서 출현한 갈따구류에 대한 적정 방제물질 및 농도에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

mRNA 유전자는 DNA에 담긴 유전정보를 전달하는 역할을 하는 RNA로, DNA의 전사(Transcription) 과정을 통해 DNA 내에 유전정보를 전달하여 단백질 합성에 관여한다. 이러한 특징으로 생물 체내 세포나 기관에 대한 독성 물질의 영향을 파악하는 분자 분석기술로 활용되고 있다. 이 중, 외부 물질 독성영향에 따라 생물 체내에 지표성을 보이는 유전자들을 스트레스 지표 유전자라 하며, 대표적으로 Heat Shock Protein 유전자가 존재한다. HSPs 유전자는 정상 범위 이상의 온도상승에 반응하여 발현하는 유전자로, 열 충격 이외에 환경 및 병리적 스트레스에도 발현이 변화하는 유전자로 알려져 있다. 분자량에 따라 HSP40, HSP60, HSP70 등으로 구분되며, 각 유전자마다 서로 다른 기능으로 단백질 분해를 방지하는 역할을 한다(Kregel, 2002; Martín-Folgar and Martínez-Guitarte, 2017). metformin에 노출된 홍합의 생식선 내 HSP70 유전자 발현이 대조군에 비해 5배 증가하였으며, 중금속인 납 노출에 따라 민꽃게(*Charybdis japonica*)의 간체장에서 HSP70

유전자 발현이 대조군에 비해 증가하는 등 다양한 연구가 이루어졌다(Xu, 2019; Koagouw *et al.*, 2021).

파리목(Diptera) 갈따구과(Chironomidae)에 속하는 *Chironomus flaviplumus*와 *Chironomus riparius*는 성충을 제외한 모든 생활사를 저서에서 서식하여 수생태계 건강성을 파악하는 오염지표종으로 다양한 연구에 이용되고 있다. 기존 연구로는 중금속(Cr, Cu, Mn, Zn)에 대한 *C. riparius*의 분자지표 유전자 발현이 보고되었다(Kim *et al.*, 2020b). 또한, 4-nonylphenol이 *C. flaviplumus*에 미치는 영향을 HSP70 단백질 발현 변화를 관찰하였다(Kim and Han, 2010). 이외에 *C. riparius*를 이용하여 환경교란물질(Tebufenozide) 노출 영향, 염분 노출에 따른 성장 변화, 미세플라스틱 노출에 따른 독성영향 평가 등 대부분 생태독성학적 연구가 이루어지고 있다(Kwak and Lee, 2004; Kim *et al.*, 2017; Scherer *et al.*, 2020). 최근 도시관류를 통해 가정으로 유입된 유충이 발견되었으며, 해당 유충은 갈따구로 추정되었다. 지속적인 수돗물 유충 발생 사례가 보고되며 유충 발생으로 인한 식수원 오염 문제가 사회적 관심을 유발하였다. 이는 국내 갈따구 분류학적 자료의 미비와 정수 시설의 취약점으로 인해 유발되었으며, 이에 대한 기초 자료 필요성이 대두되고 있다(Kwak *et al.*, 2020).

따라서, 본 연구는 국내 정수장 내 정수처리공정에 사용되는 소독제인 UV 및 O₃을 실내 사육중인 *C. riparius*와 국내 분포종인 *C. flaviplumus*를 노출시켜 생태독성학적 반응을 관찰하였다. 또한 유전자 발현을 통해 소독제에 의한 스트레스 반응을 살펴보고자 하였다. 개체 단위로 UV 및 O₃ 노출에 대한 생존율, 체색 변화를 관찰하였으며 HSP70 유전자 발현을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험생물

국내 야외서식종인 *C. flaviplumus*는 전라남도 여수시 연등천에서 채집하였으며, 국외 서식종인 *C. riparius*는 인천대학교에서 분양받아 사육하였다. 이후, OECD 표준 사육방법에 따라 전남대학교에서 계대 사육중인 개체를 독성실험에 이용하였다. 사육은 항온기 내부 온도 25±1°C, 습도 60%, 광도 500lx, 광주기 16:8 조건으로 진행하였으며 사육수는 M4 배지를 이용하였다(Elendt, 1990). 하상은 모래(<63 μm)를 투입하였으며 먹이는 Tetramin(Tetra-Werke, Melle, Germany)을 갈아 매일 유충 1개체 당 0.5 mg day⁻¹씩 공급하였다.

- 4 instar larvae	- 4 instar larvae
- N=20, 3 replicate	- N=20, 3 replicate
- Test duration: 24hr (0, 12hr, 24hr)	- Test duration: 1hr (0, 10min, 30min, 1hr)
- UV wavelength: 250 ~ 280nm	- O ₃ concentration: 0.5 ppm
- End point: Survival rate, Body color intensity, mRNA expression	- End point: Survival rate, Body color intensity, mRNA expression

*These experiments were conducted according to OECD Test Guideline No. 233.

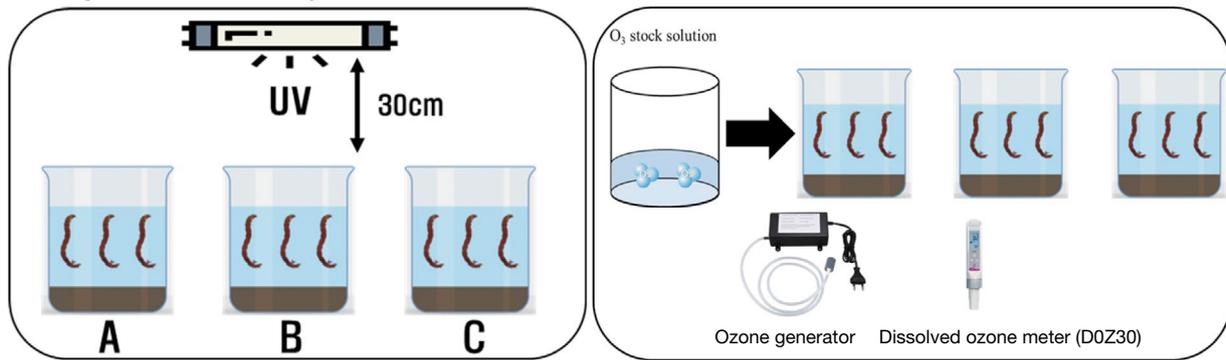


Fig. 1. Summary to acute exposure experiments using UV of O₃ in Chironomids.

2. 급성 독성노출 실험 조건

실험 전 4령기 유충을 선별하여 300 mL 유리비커당 20 개체씩 3반복구로 투입하였으며, 24시간 항온기 내에서 순치시켰다. 실험군은 파장 250~280 nm의 UV 형광등 (G15T8-AN, SANKYO, Japan)을 비커 상단 30 cm에 부착한 후, 실험생물에 노출시켰다. 4령기 유충을 선별하여 300 mL 유리 비커당 20개체씩 3반복으로 24시간 동안 진행하였으며, 먹이는 공급하지 않았다.

O₃ 노출 실험군은 수조용 오존발생기를 이용하여 오존 가스를 증류수에 주입한 후, 용존오존측정기 (DOZ30)를 이용하여 0.5 ppm으로 제조하였다. 노출 실험 조건은 사육 조건과 동일하며, 생존율은 체색의 변화와 스포이드를 이용하여 자극에 대한 반응이 없는 개체를 치사로 판단하여 관찰하였다 (Fig. 1).

3. 체색 변화

*C. riparius*와 *C. flaviplumus*를 UV 및 오존 노출에 따라 변화하는 실체현미경 (SBAP0, Leica, Germany)을 이용하여 관찰 및 촬영하였다. 독성 노출에 따라 변화된 체색은 Image J 프로그램을 이용하여 정량화하여, 대조군과 상대 비교를 진행하였다.

4. HSP70 유전자 발현

Total RNA 추출은 RNA isoplus (Takara, Japan)을 이용하

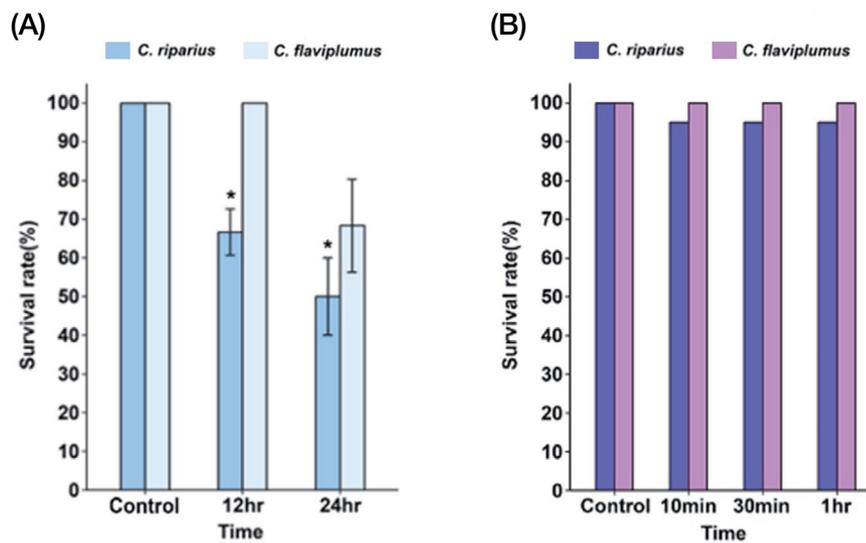
였으며, DNase I (Takara, Japan)을 이용하여 genomic DNA를 제거하였다. 이후, 추출한 RNA의 순도와 정량을 측정하기 위해 1.5% agarose gel과 microplate reader (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 이용하였다. cDNA 합성은 0.5 µg total RNA를 이용하여 PrimerScript 1st strand cDNA synthesis kit (Takara, Japan)로 진행하였다. HSP70 유전자 발현을 위해 내부적 대조군 (Internal control)은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 이용하였으며, 유전자의 온도에 따른 효율성 (90~120%) 검증 후 실험을 진행하였다. GAPDH와 HSP70 유전자는 NCBI (National Center for Biotechnology Information) nucleotide DB에 등록된 정보를 바탕으로 실험에 이용하였다 (Table 1). 유전자 발현량 측정은 CFX ConnectTM Real-time PCR System (Bio-Rad, CA, USA)과 SYBR green master mix (Bioneer, Korea)를 이용하여 95°C에서 20초, 55°C에서 40초로 40회 실시하였다. 이후 2^{-ΔΔCt} 방법을 이용하여 HSP70 발현을 상대적으로 비교하였다. 또한, UV와 O₃ 노출에 따른 HSP70의 상대적 발현량을 Heatmap을 이용하여 시각화하였다 (Fig. 5).

5. 통계 분석

UV와 O₃ 노출에 따른 생물의 반응 결과와 HSP70 유전자 발현 결과에 대한 유의성을 통계적으로 판단하기 위해 R version 4.2.2 프로그램을 이용하여 ANOVA test와 t-test로 분석하였다. 생존율과 체색 변화는 종 내 각 시간별 통

Table 1. Primer information used to amplify in this study.

Gene	Primer Sequence (5'-3')	Accession number
GAPDH	F: GGTATTTCATTGAATGATCACTTTG R: TAATCCTTGGATTGCATGTACTTG	EU999991
HSP70_Cr	F: CATGTGAACGAGCCAAGAGA R: TCGAGTTGATCCACCAACAA	HM769899
HSP70_Cf	F: TGGGAAACAGAACAACACCA R: TTTGAATGGCCAATGTTTCA	AB162946

**Fig. 2.** Cumulative survival rate (%) of *C. riparius* and *C. flaviplumus* exposed to different substances. Bars indicate the standard deviation of the mean. Statistically significant differences are represented by asterisks as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ (A: Chironomids exposed to UV for 24 hours; B: Chironomids exposed to O₃ for 1 hour).

계적 유의성을 확인하였으며, 유전자 발현은 대조군과 노출대상 간 통계적 유의성을 확인하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 UV와 O₃ 노출에 따른 *C. flaviplumus*와 *C. riparius*의 생물학적 변화(생존율 및 체색 변화)와 분자마커(HSP70)를 이용한 생물 스트레스를 분석하였다. UV에 노출된 *C. flaviplumus*와 *C. riparius*의 생존율은 시간 의존적으로 감소하는 경향이 관찰되었으며, *C. riparius*는 통계적 유의성이 관찰되었다(ANOVA $P < 0.05$). *C. flaviplumus*는 UV 노출 12시간 후 생존율의 변화가 나타나지 않았으나, 노출 24시간 후 70%로 나타났다. 또한,

*C. riparius*는 노출 12시간 후 67%, 24시간 후 50%로 상대적으로 낮은 생존율을 보였다(Fig. 2A). O₃에 노출된 *C. flaviplumus*는 노출 1시간 후 생존율 변화가 나타나지 않았다. *C. riparius*의 경우 노출 10분 후 생존율이 95%로 감소 후 유지되었으며, 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 2B). UV가 생물에 미치는 영향은 갈따구 이외에 양서류, 물벼룩 등을 대상으로 하는 연구가 진행되었다(Licht and Grant, 1997; Rozas *et al.*, 2016, Table 2). UV filter에 노출된 *C. riparius*에서 해독에 관여하는 Cytochrome P450, Glutathione S-transferase, Multidrug resistance protein 1 유전자의 발현 변화가 나타났으며(Martínez-Guitarte, 2018), 대표적 UV-filter인 Benzophenone-3 독성에 대한 다세대 노출 실험에서 우화율이 농도 의존적으로 감소하였다(Campos *et al.*, 2019). 기

Table 2. UV and O₃ toxicity test reference used other study.

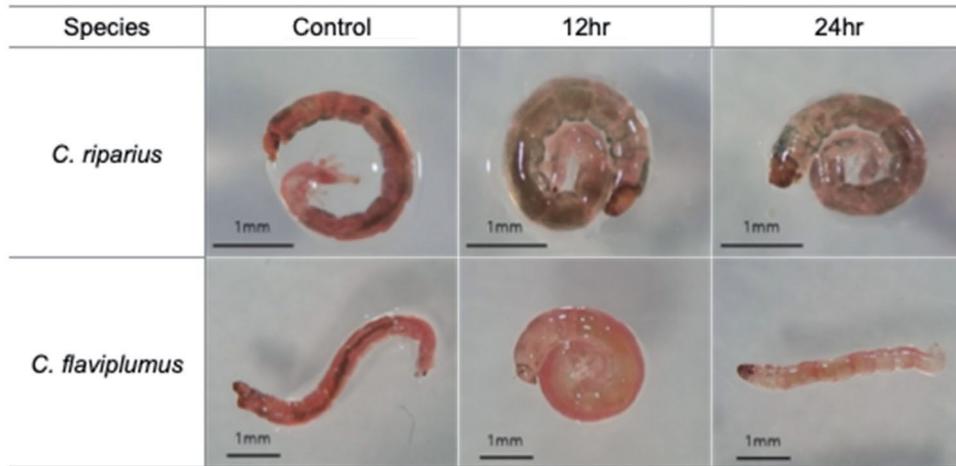
Substance	Type	Concentration	Duration	Species	Reference
UV		100, 300, 900 mJ cm ⁻²	48 hr	<i>Daphnia ephippia</i> <i>Daphnia magna</i>	Nevalainen <i>et al.</i> , 2016 Rozas <i>et al.</i> , 2016
UV filter	Benzophenone-3 3-(4-methylbenzylidene) camphor Benzophenone-3 Octocrylene Octyldimethyl-p-aminobenzoate 3-(4-methylbenzylidene) camphor 4-methylbenzylidene camphor Polytetrafluoroethylene 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone Avobenzone Ethylhexyl methoxycinnamate Octocrylene 2,4,4'-trihydroxybenzophenone 3-(4-methylbenzylidene) camphor 4,4'-dihydroxybenzophenone	0.1, 1 mg L ⁻¹ 2, 4, 8 mg kg ⁻¹ 0.1, 1, 10, 100 mg L ⁻¹ 0.1, 1, 10 mg L ⁻¹ 0.01, 0.1, 1, 10 mg L ⁻¹ 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 mg L ⁻¹ 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg L ⁻¹ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg L ⁻¹ 5, 10, 15, 20, 25 mg L ⁻¹	24 hr 28 days 96 hr 24 hr 96 hr 48 hr 48 hr	<i>Chironomus riparius</i> <i>Chironomus riparius</i> <i>Chironomus riparius</i> <i>Chironomus riparius</i> <i>Chironomus riparius</i> <i>Chironomus riparius</i> <i>Daphnia magna</i> <i>Daphnia magna</i> <i>Daphnia magna</i>	Martínez-Guitarte, 2018 Campos <i>et al.</i> , 2019 Ozáez <i>et al.</i> , 2016 Muñiz-González <i>et al.</i> , 2018 Muñiz-González <i>et al.</i> , 2020 Park <i>et al.</i> , 2017 Han <i>et al.</i> , 2021
O ₃		10, 30, 50 ppm 25 ppm 0.25, 1 ppm 0.2, 0.5, 1, 5 ppm	10 days 20 min 13 weeks 30 min	<i>Hordeum vulgare</i> L. <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus spizizenii</i> <i>Clostridium difficile</i> MRSA <i>Escherichia coli</i> <i>Rattus</i> sp. <i>Glyptotendipes tokunagai</i>	Maltok <i>et al.</i> , 2022 Sharma <i>et al.</i> , 2008 Miller <i>et al.</i> , 2016 Kim <i>et al.</i> , 2020a

존 연구에서 O₃에 노출된 *Glyptotendipes tokunagai*는 시간 의존적인 사망률 증가가 관찰되었으며 (Kim *et al.*, 2020a), 보리 (*Hordeum vulgare* L.)는 항산화 반응에 관여하는 유전자인 Catalase, Superoxide dismutase, Guaiacol peroxidase의 발현이 증가하며 세포 내 독성 영향을 주었다 (Matlok *et al.*, 2022). 이외에 세균류, 쥐 등 다양한 생물을 이용한 연구가 진행되었으나 (Table 2), UV와 O₃ 노출의 갈따구와 같은 저서생물에 대한 연구는 미비하다. 갈따구과는 UV와 O₃ 외에도 내분비계 교란물질, 중금속, 살충제, 염분 변화, 온도 변화 등에 대한 생태독성학 연구가 집중적으로 보고되었다 (Park *et al.*, 2010; Park and Kwak, 2010; Park and Kwak, 2014; Kim *et al.*, 2017; Arambourou *et al.*, 2020).

UV와 O₃에 노출된 *C. flaviplumus*와 *C. riparius*의 체색 변화는 시간 의존적으로 두 종의 체색이 얼어지는 것을 확

인하였다 (Fig. 3). UV와 O₃ 노출 후 체색 변화를 정량화한 결과, UV에 노출된 *C. flaviplumus*와 *C. riparius*는 시간이 지남에 따라 대조군에 비해 상대적으로 낮은 값을 보였으며, 통계적 유의성이 관찰되었다 (ANOVA $P < 0.05$; *C. riparius* - 12 hr: $P < 0.01$). O₃ 노출 후 *C. flaviplumus*와 *C. riparius*는 대조군에 비해 상대적으로 더 낮은 값을 보였으며, 통계적 유의성이 관찰되었다 (ANOVA $P < 0.05$). 갈따구는 체내에 헤모글로빈이 존재하여 붉은색을 띠며 산소운반 및 저장이 뛰어나 저산소층인 환경 내 쉽게 적응할 수 있는 생물이다 (Panis *et al.*, 1996). 본 연구에서 관찰된 갈따구 2종의 체색 변화는 굴을 파고 생활하는 갈따구가 호흡을 위해 퇴적물 표층으로 이동하며 UV와 O₃의 직접적인 노출로 인해 영향을 받은 것으로 판단된다. 벤조피렌, 클로르피리포스, 중크롬산칼륨과 같은 외부 화학물질에 노

(A)



(B)



(C)

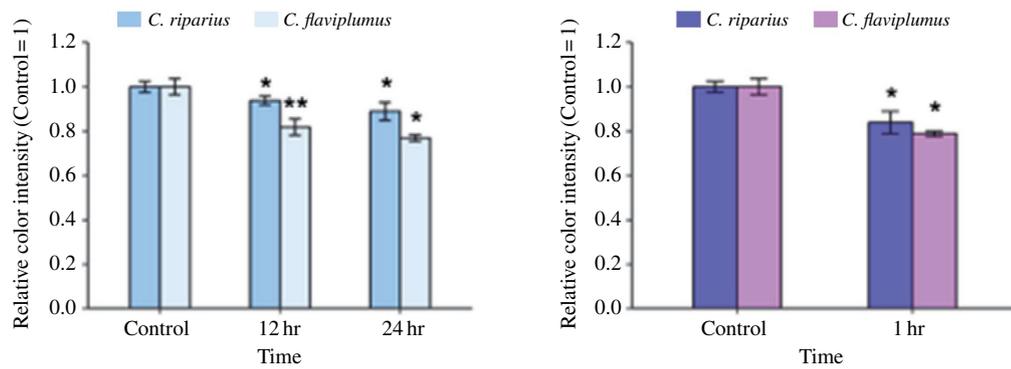


Fig. 3. Change of body color on *C. riparius* and *C. flaviplumus* after experiment. Bars indicate the standard deviation of the mean. Statistically significant differences are represented by asterisks as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ (A: Chironomids exposed to UV for 24 hours; B: Chironomids exposed to O₃ for 1 hour; C: Image processing analysis of animal coloration).

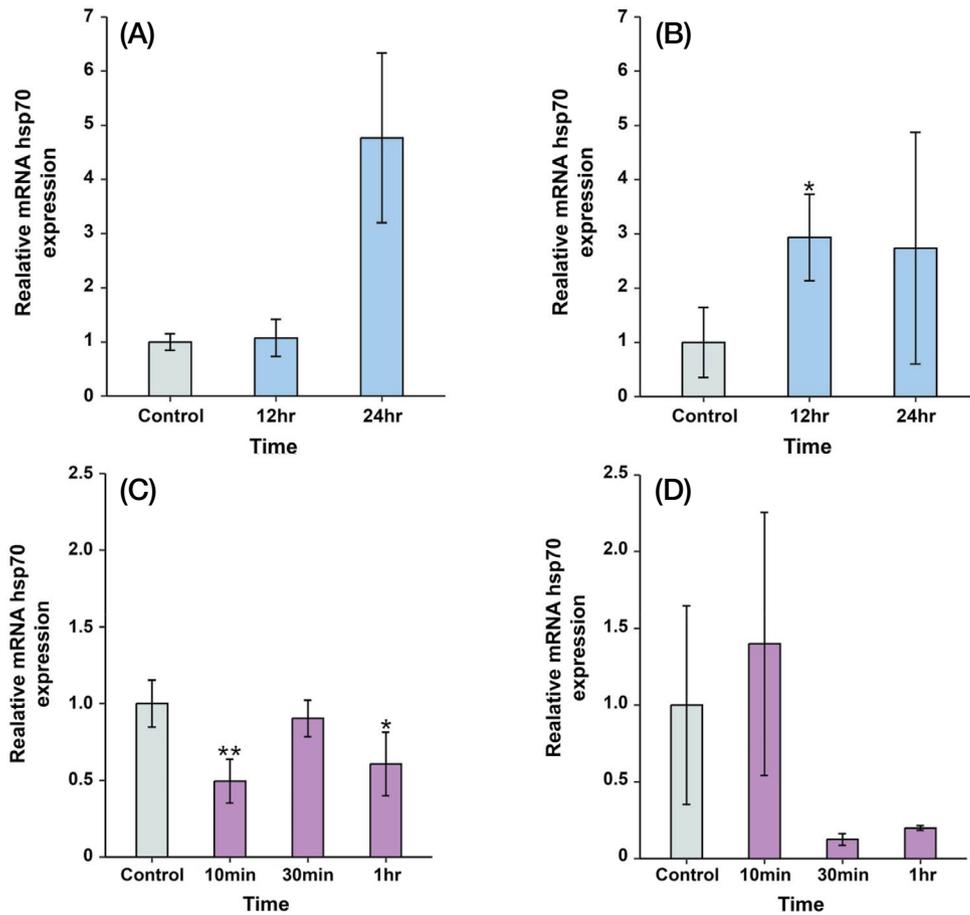


Fig. 4. mRNA expression HSP70 gene in Chironomids larvae exposed to different substances. Values were normalized against β -actin. Bars indicate the standard deviation of the mean. Statistically significant differences are represented by asterisks as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, compared to controls (control ratio value = 1) (A: *C. flaviplumus*, B: *C. riparius* exposed to UV; C: *C. flaviplumus*, D: *C. riparius* exposed to O_3).

출된 *Chironomus tentans*는 hemoglobin 유전자의 발현이 대조군에 비해 감소하였으며, 이는 체내 헤모글로빈 단백질의 감소를 유발할 수 있음에 대해 보고되었다(Lee *et al.*, 2006; Ha and Choi, 2008). 이는, UV와 O_3 에 노출이 깔따구 체내 헤모글로빈에 독성 영향을 주었음을 나타내며, 이로 인해 체내 색 변화가 유도됨을 보였다. 또한 UV와 O_3 의 독성 영향은 깔따구 생존과 밀접한 관련성을 나타내며, 정수장 내 생물 방제 물질로서 영향성을 확인하였다.

UV에 노출된 *C. flaviplumus*와 *C. riparius*의 스트레스 반응을 관찰하기 위해 HSP70 유전자의 상대적 발현을 측정된 결과, *C. flaviplumus*는 노출 24시간 후에 대조군보다 상대적으로 높은 발현을 보였으나, 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4A). *C. riparius*는 노출 12시간 후 대조군에 비해 높은 발현이 관찰되었으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$, Fig. 4B). O_3 에 노출된 *C.*

*flaviplumus*는 실험군이 대조군에 비해 낮은 발현을 보였으며 노출 10분과 1시간 후에는 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$, Fig. 4C). 반면에 *C. riparius*는 노출 10분 후 HSP70 발현이 대조군에 비해 높게 나타났으나 노출 30분, 1시간 후에는 상대적으로 낮은 발현을 보였으며 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4D). 기존에 깔따구를 이용한 HSP70 연구에서 Bisphenol A에 노출된 *C. riparius*의 HSP70 유전자 발현이 상향되었으며(Planelló *et al.*, 2008), 살균제인 Triclosan 노출로 인해 *C. riparius*의 HSP70 유전자 발현이 대조군에 비해 2배 상향된 연구가 보고되었다(Martínez-Paz *et al.*, 2017). 이처럼 HSP 유전자는 열 충격뿐만 아니라 오염물질에 대한 스트레스 반응을 탐지하는 지표 유전자로서 유전자 발현에 영향을 주며 세포 보호에 중요한 역할을 한다(Song *et al.*, 2006; Martín-Folgar and Martínez-Guitarte, 2017).

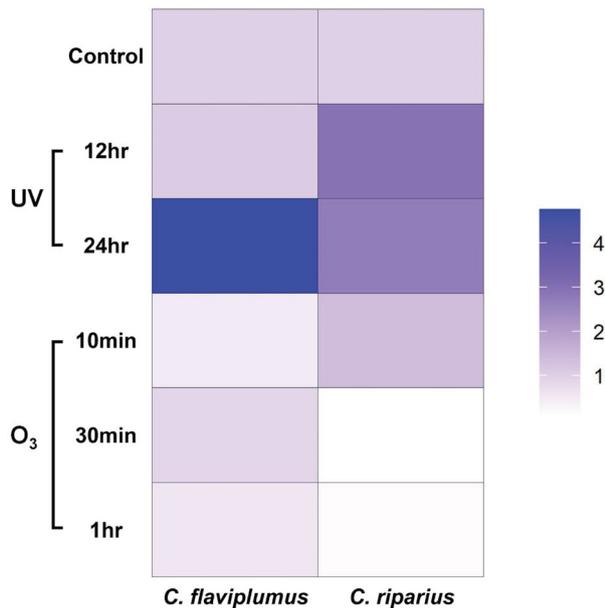


Fig. 5. Heatmap of relative mRNA expression of HSP70 in *C. riparius* and *C. flaviplumus* exposed to UV and O₃.

정수처리장에서 사용되는 대표적인 소독물질 중 UV 노출로 인한 수생생물에 대한 영향 연구는 미비하다. 또한, O₃에 노출된 보리 (*Hordeum vulgare* L.)의 항산화 유전자 발현 변화 (Matlok *et al.*, 2022), O₃의 항균제 효과 연구 (Sharma and Hudson, 2008) 등이 선행되었으나, 박테리아나 병원체 같은 미생물 제거를 위한 연구가 주로 이루어졌으며 수생생물에 대한 영향 연구는 미비한 실정이다. 본 연구에서는 정수처리과정 내 유입될 수 있는 미생물과 수생생물을 방제하는 물질로 이용되고 있는 UV와 O₃를 이용하여 최근 국내 정수처리장 내 발생한 갈따귀를 대상으로 나타날 수 있는 분자생물학적 영향을 파악하고자 하였다. UV노출은 *C. riparius*와 *C. flaviplumus*의 생존율 감소와 HSP70 유전자 발현 증가에 대한 영향성을 보였다 (Fig. 5). 따라서, 본 연구에서는 정수처리장에서 소독 목적으로 사용되는 UV와 O₃가 갈따귀 중별 급성독성에 따른 영향을 확인하였다.

적 요

UV와 O₃는 정수처리 공정에 이용되는 물질로 유기물, 오염물질 및 미생물을 제거하는 것으로 많은 연구가 보고되어 있다. 본 연구에서는 저서성 대형무척추동물 중 오염지표 생물이며 실내 사육 중인 갈따귀 (*C. flaviplumus*, *C. riparius*)를 이용하여 UV와 O₃ 노출에 따른 생존율, 체

색 변화 및 열충격 단백질 (Heat Shock Protein 70) 발현 변화를 관찰하였다. UV에 노출된 *C. flaviplumus*의 생존율은 24시간 후 70% 감소하였으며, *C. riparius*는 50%로 감소하였다. O₃에 노출된 *C. flaviplumus*는 생존율의 변화가 없었으며 *C. riparius*는 노출 10분 후 95%로 감소하였으나, 이후 노출 시간 동안 변화가 없었다. 또한, 체색 변화에서 두 종에 대한 UV와 O₃ 노출은 시간 의존적으로 붉은색의 체색이 열어지는 현상을 관찰하였다. HSP70 유전자 발현에서 *C. riparius*는 UV 노출 후 대조군에 비해 발현이 증가하였으며, 노출 12시간 후에서 유의한 차이를 보였다 ($P < 0.05$). O₃에 노출된 *C. flaviplumus*는 대조군에 비해 상대적으로 낮은 발현이 관찰되었으며, 노출 10분과 1시간 후에서 유의한 차이를 보였다 ($P < 0.05$). 이와 같은 결과는 UV와 O₃ 노출에 따른 갈따귀에 대한 생태독성학적 영향을 보고하였다. 따라서 본 연구 결과는 정수장에서 이용되는 소독물질인 UV와 O₃가 정수장 내로 유입되는 갈따귀에 주는 영향을 파악할 수 있는 기초자료로서 활용될 수 있을 것이다.

저자정보 광인실 (전남대학교 해양융합과학과 교수), 김지훈 (전남대학교 해양융합과학과 석사과정), 김원석 (전남대학교 해양융합과학과 박사과정), 박재원 (전남대학교 해양융합과학과 박사과정), 고봉순 (전남대학교 해양융합과학과 석사과정), 박기연 (전남대학교 수산과학연구소 학술연구교수),

저자기여도 개념설정: 광인실, 방법론: 광인실, 과제관리: 광인실, 연구비 수주: 광인실, 분석: 김지훈 & 김원석 & 박재원 & 고봉순, 자료제공: 광인실 & 박기연, 자료관리: 김지훈 & 김원석 & 박재원 & 고봉순, 원고 초안작성: 김지훈 & 김원석, 원고 교정: 광인실, 박기연, 김지훈, 원고 편집 및 검토: 광인실, 박기연, 김원석, 김지훈. 모든 저자는 논문의 결과에 동의하였고, 출판될 최종본을 검토하고 동의하였습니다.

이해관계 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

연구비 이 논문은 한국연구재단의 지원 (NRF-2018-R1A6A1A-03024314), 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원 수생태계 건강성 확보 기술개발사업의 지원 (202103050001)과 국립생물자원관 의 지원 (20210505793-00)을 받아 수행된 연구임.

REFERENCES

Arambourou, H., L. Llorente, I. Moreno-Ocio, Ó. Herrero, C.

- Barata, I. Fuertes, N. Delorme, L. Méndez-Fernández and R. Planelló. 2020. Exposure to heavy metal-contaminated sediments disrupts gene expression, lipid profile, and life history traits in the midge *Chironomus riparius*. *Water Research* **168**: 115165.
- Campos, D., A.R.R. Silva, S. Loureiro, K. Grabicová, A.V. Staňová, A.M.V.M. Soares and J.L.T. Pestana. 2019. Two-generational effects of Benzophenone-3 on the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment* **669**: 983-990.
- Clancy, J.L., T.M. Hargy., M.M. Marshall and J.E. Dyksen. 1998. UV light inactivation *Cryptosporidium* oocysts. *Journal-American Water Works Association* **90**(9): 92-102.
- Elendt, B.P. 1990. Selenium deficiency in Crustacea: An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protozoology* **154**: 25-33.
- Ha, M.H. and J. Choi. 2008. Chemical-induced alteration of hemoglobin expression in the 4th instar larvae of *Chironomus tentans* Mg. (Diptera: Chironomidae). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **25**(3): 393-398.
- Han, J., Z. Qin, J. Zhang, W. Wang, J. Wu., Y. Lu and L. Sun. 2021. Acute toxicity and ecological risk assessment of 4, 4'-dihydroxybenzophenone and 4-MBC in ultraviolet (UV)-filters. *PLoS One* **16**(4): e0249915.
- Kim, M.C. and S.S. Han. 2010. Two-dimensional gel analysis of stress proteins identified in *Chironomus flaviplumus* (Diptera: Chironomidae) exposed to 4-nonylphenol. *Entomological Research* **40**(3): 164-170.
- Kim, W.S., B.H. Im, C. Hong, S.W. Choi, K.Y. Park and I.S. Kwak. 2017. Gene expression of *Chironomus riparius* Heat Shock Protein 70 and developmental retardation exposure so salinity. *Korea Journal of Ecology and Environment* **50**(3): 305-313.
- Kim, W.S., B.H. Choi, M.K. Kim, S.H. Chae and I.S. Kwak. 2020a. Expression of Heat Shock Protein 70 gene and body color changes in non-biting midge larvae (*Glyptotendipes tokunagai*) effected by O₃ treatment. *Korea Journal of Ecology and Environment* **53**(4): 324-330.
- Kim, W.S., K.Y. Park and I.S. Kwak. 2020b. Stress evaluation to heavy metal exposure using molecular marker in *Chironomus riparius*. *Korea Journal of Ecology and Environment* **53**(2): 165-172.
- Koagouw, W., R.J. Hazell and C. Ciocan. 2021. Induction of apoptosis in the gonads of *Mytilus edulis* by metformin and increased temperature, via regulation of HSP70, CASP8, BCL2 and FAS. *Marine Pollution Bulletin* **173**: 113011.
- Kregel, K.C. 2002. Invited review: heat shock protein: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* **92**: 2177-2186.
- Kwak, I.S. and W.C. Lee. 2004. Effects of the ecdysteroid agonist tebufenozide on freshwater chironomids. *Korea Journal of Ecology and Environment* **37**(1): 96-101.
- Kwak, I.S., J.W. Park, W.S. Kim and K.Y. Park. 2020. Morphological and genetic species identification in the *Chironomus* larvae (Diptera: Chironomidae) found in domestic tap water purification plants. *Korea Journal of Ecology and Environment* **53**(3): 286-294.
- Lee, G.C., T.K. Yoon, B.I. Noh and B.H. Moon. 2003. Performance of ozonation in advanced water treatment process. *Theories and Applications of Chemical Engineering* **9**(2): 2252-2255.
- Lee, S.M., S.B. Lee, C.H. Park and J. Choi. 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* **65**(6): 1074-1081.
- Licht, L.E. and K.P. Grant. 1997. The effects of ultraviolet radiation on the biology of amphibians. *American Zoologist* **37**(2): 137-145.
- Matlok, N., T. Piechowiak, I. Kapusta, K. Królikowski and M. Balawejder. 2022. Induction of Biosynthesis Antioxidant Molecules in Young Barley Plants by Trioxigen. *Molecules* **27**(21): 7195.
- Martín-Folgar, R. and J.L. Martínez-Guitarte. 2017. Cadmium alters the expression of small heat shock protein genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Chemosphere* **169**: 485-492.
- Martínez-Guitarte, J.L. 2018. Transcriptional activity of detoxification genes is altered by ultraviolet filters in *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **149**: 64-71.
- Martínez-Paz, P., M. Morales, J. Urien, G. Morcillo and J.L. Martínez-Guitarte. 2017. Endocrine-related genes are altered by antibacterial agent triclosan in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **140**: 185-190.
- Matsumura, Y. and H.N. Ananthaswamy. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology* **195**(3): 298-308.
- Miller, D.B., S.J. Snow, A. Henriquez, M.C. Schladweiler, A.D. Ledbetter, J.E. Richards, D.L. Andrews and U.P. Kodavanti. 2016. Systemic metabolic derangement, pulmonary effects, and insulin insufficiency following subchronic ozone exposure in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **306**: 47-57.
- Muñiz-González, A.B. and J.L. Martínez-Guitarte. 2018. Effects of single exposure and binary mixtures of ultraviolet filters octocrylene and 2-ethylhexyl 4-(dimethylamino) benzoate on gene expression in the freshwater insect *Chironomus riparius*. *Environmental Science and Pollution Research* **25**: 35501-35514.
- Muñiz-González, A.B. and J.L. Martínez-Guitarte. 2020. Combined effects of benzophenone-3 and temperature on gene

- expression and enzymatic activity in the aquatic larvae *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment* **698**: 134292.
- Nevalainen, L., M.V. Rantala, T.P. Luoto, A.E.K. Ojala and M. Rautio. 2016. Long-term changes in pigmentation of arctic *Daphnia* provide potential for reconstructing aquatic UV exposure. *Quaternary Science Reviews* **144**: 44-50.
- Ozáez, I., G. Morcillo and J.L. Martínez-Guitarte. 2016. Ultraviolet filters differentially impact the expression of key endocrine and stress genes in embryos and larvae of *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment* **557**: 240-247.
- Panis, L.I., B. Goddeeris and R. Verheyen. 1996. On the relationship between vertical microdistribution and adaptations to oxygen stress in littoral Chironomidae (Diptera). *Hydrobiologia* **318**: 61-67.
- Park, C.B., J.Y. Jang, S.H. Kim and Y.J. Kim. 2017. Single- and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzone on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **137**: 57-63.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2010. Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* **79**(9): 934-941.
- Park, K.Y., J.G. Park, J.K. Kim and I.S. Kwak. 2010. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **151**(4): 439-446.
- Park, K.Y. and I.S. Kwak. 2014. The effect of temperature gradients on endocrine signaling and antioxidant gene expression during *Chironomus riparius* development. *Science of the Total Environment* **470**: 1003-1011.
- Pisarenko, A.N., B.D. Stanford, D. Yan, D. Gerrity and S.A. Snyder. 2012. Effects of ozone and ozone/peroxide on trace organic contaminants and NDMA in drinking water and water reuse applications. *Water Research* **46**(2): 316-326.
- Planelló, R., J.L. Martínez-Guitarte and G. Morcillo. 2008. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* **71**(10): 1870-1876.
- Rozas, O., C. Vidal, C. Baeza, W.F. Jardim, A. Rossner and H.D. Mansilla. 2016. Organic micropollutants (OMPs) in natural waters: Oxidation by UV/H₂O₂ treatment and toxicity assessment. *Water Research* **98**: 109-118.
- Scherer, C., R. Wolf, J. Völker, F. Stock, N. Brennhold, G. Reifferscheid and M. Wagner. 2020. Toxicity of microplastics and natural particles in the freshwater dipteran *Chironomus riparius*: Same same but different?. *Science of the Total Environment* **711**: 134604.
- Sharma, M. and J.B. Hudson. 2008. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. *American Journal of Infection Control* **36**(8): 559-563.
- Song, L., L. Wu, D. Ni, Y. Chang, W. Xu and K. Xing. 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish & Shellfish Immunology* **21**(4): 335-345.
- Stanford, B.D., A.N. Pisarenko, R.D. Holbrook and S.A. Snyder. 2011. Preozonation effects on the reduction of reverse osmosis membrane fouling in water reuse. *Ozone: Science & Engineering* **33**(5): 379-388.
- Tornaletti, S. and G.P. Pfeifer. 1996. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays* **18**(3): 221-228.
- Xu, X.H. 2019. Immune response, MT and HSP70 gene expression, and bioaccumulation induced by lead exposure of the marine crab, *Charybdis japonica*. *Aquatic Toxicology* **210**: 98-105.
- You, S.H., D.H. Tseng and W.C. Hsu. 2007. Effect and mechanism of ultrafiltration membrane fouling removal by ozonation. *Desalination* **202**(1-3): 224-230.
- Zhu, H., X. Wen and X. Huang. 2010. Membrane organic fouling and the effect of pre-ozonation in microfiltration of secondary effluent organic matter. *Journal of Membrane Science* **352**(1-2): 213-221.