

Original article

오존(O₃) 노출에 의한 조각갈따구(*Glyptotendipes tokunagai*)의 체색 변화 및 heat shock protein 70 발현 변화

김원석¹ · 최보형² · 김문경³ · 채선하⁴ · 곽인실^{1,2,*}

¹전남대학교 해양융합과학과, ²전남대학교 수산과학연구소, ³서울대학교 보건환경연구소, ⁴K-water 연구원 물이용연구소

Expression of Heat Shock Protein 70 Gene and Body Color Changes in Non-biting Midge Larvae (*Glyptotendipes tokunagai*) Effected by O₃ Treatment. Won-Seok Kim¹ (0000-0003-3368-3891), Bohyung Choi² (0000-0001-6998-400X), Moon-Kyung Kim³ (0000-0002-5081-418x), Seon Ha Chae⁴ (0000-0003-2326-102x) 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; ³Institute of Health & Environment, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea; ⁴K-water Research Institute, Korea Water Resources Corporation, Daejeon, Republic of Korea)

Abstract Ozone (O₃) is a general disinfectant to remove micro-pollutants in water treatment system. Previous studies have reported effect of ozone to bacteria and pathogens removal, but its effect to the relatively large organisms has little known. In this study, we investigated potential effects of ozone toxicity to the non-bite midge larvae (*Glyptotendipes tokunagai*) with accumulate mortality, coloration change and expression of heat shock protein 70 (HSP70). The accumulate mortality rate of *G. tokunagai* increased in a dose-time dependent manner and the highest mortality rate was observed to 75% at 30 minute of exposure duration with 2.0 ppm of ozone concentration. Exposure to ozone was a factor increasing body color of the larvae. The tendency of HSP70 mRNA expression showed up-regulation in ozone exposure at 20 minute. After that time, the expression of HSP70 in exposed group decreased to a similar level of control group. Our results clearly showed that ozone toxicity affects physical and molecular activity of *G. tokunagai*, implying the potential hazardous of ozone in the aquatic ecosystem including macroinvertebrates.

Key words: ozone, *Glyptotendipes tokunagai*, heat shock protein 70, body color, gene expression

서론

인구 증가와 고도화된 산업화는 환경 중으로 배출되는 오

염원을 증가시켜 수생태계 교란을 유도한다. 이로 인한 유해성은 수생태계 내 서식 생물뿐 아니라 상수를 통해 물을 공급받는 인간에게도 잠재적 유해성을 가진다(WHO, 2006; Englert *et al.*, 2013). 정수장은 하천, 호수, 지하수 등의 자연 수로부터 공급된 원수 내 존재하는 중금속, 유기물질 및 박테리아를 제거하는 정수과정을 거쳐 인간이 생활하는 데 사용 가능한 상수로 전환시키는 시설이다. 정수처리 중 소독은

Manuscript received 11 September 2020, revised 7 December 2020, revision accepted 8 December 2020
* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148,
E-mail: inkwak@hotmail.com, iskwak@chonnam.ac.kr

일반적으로 수인성 질병 매개체인 병원성 미생물이 억제하고, 원수에 잔류하는 플랑크톤 및 무척추동물 제거하기 위한 수처리 공정 방법이다. 대표적인 화학적 소독처리 과정에 사용되는 물질인 UV, 염소, 이산화염소, 오존(O₃) 등을 사용하여 잔존 생물을 제거하고 있다. 특히, 오존은 미세오염물질 분해 및 변형을 유발시키며 병원성 박테리아를 제거하는 특성으로 인해 현대 사회에서 가장 활발히 이용되는 소독 물질로, 물 속에 존재하는 박테리아 세포벽을 파괴하여 세포 내 구성 성분을 노출시킴으로써 핵산에 손상을 주어 소독작용을 하게 된다(Hollender *et al.*, 2009).

한편, 소독과정에 이용되는 화학물질들은 폐수에 존재하는 에스트로겐성 유기오염 물질과 반응하여 산화제로 전환되어 인간에게 유해한 영향을 미칠 수 있다(Stalter *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011). 따라서 정수장에서 사용하는 소독제의 농도는 처리 효율뿐 아니라 잔여물질이 인간에게 미치는 영향까지 고려하여 선정되어야 한다. 특히 정수 처리에 사용되는 소독제가 미생물에 미치는 영향은 잘 알려진 반면, 갈따구 등과 같은 대형무척추동물에 미치는 영향에 대한 연구는 아직까지 미비한 실정이다.

열충격단백질(Heat shock proteins, HSPs)은 생물 체내 세포 성장과 접합, 사멸 등과 같은 세포 항상성에 관여하는 중요한 역할을 담당한다. HSPs는 분자량에 따라 HSP26, 40, 70, 100과 small HSPs로 구분된다(Kregel, 2002). 외부 스트레스 정도에 따라 방어기작을 하는 특징으로 최근 생물 스트레스에 대한 지표유전자로 척추동물과 무척추동물을 대상으로 많은 연구가 진행되고 있다. 최근에는 저산소 환경에 노출된 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)에게 서로 다른 먹이 공급에 따라 항산화, 면역 관여 유전자와 함께 HSP70 (Heat shock protein 70) 유전자 발현 양상이 달라짐을 보고하였다(Delaney and Klesius, 2004). 또한 *Chironomus riparius*를 대상으로 중금속 노출에 따라 분자표지 유전자(HSP40, HSP70, HSP90, Glutathione S-transferase 등) 발현 경향에 차이를 보였다(Kim *et al.*, 2020). 항생제 fenbendazole 노출로 인해 *C. riparius* HSP 유전자 발현이 증가하는 경향이 확인되기도 하였다(Park *et al.*, 2009).

*Glyptotendipes tokunagai*는 파리목 갈따구과에 속하며 동아시아 전역에 걸쳐 분포하는 생물로 주로 유기물이 많은 도심하천에서 서식하는 것으로 알려져 있으며, 유충시기를 하천 저서에서 서식하는 생물적 특성으로 수환경을 반영하는 지표 생물이다(Lee *et al.*, 2009). 기존 연구로는 서로 다른 온도 구간 노출에 따른 *G. tokunagai* 성장 차이에 대한 비교가 보고되었다(Baek *et al.*, 2012) 또한, 같은 갈따구과에 속하는 *Chironomus* 종을 대상으로 야외 중금속 노출을 통한 heat

shock proteins (HSPs), cytochrome P-450 (CYP-450) 등의 분자표지 유전자 발현을 관찰하였으며, 최근에는 카드뮴 노출로 인한 성장 저하와 함께 serine-type endopeptidase 발현 변화에 대해 보고하는 등 분자생물학 기술을 통한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim *et al.*, 2015; Park and Kwak, 2020).

본 연구에는 정수장 내 소독제로 이용되는 오존을 실내 사육 갈따구종인 *G. tokunagai*에 노출시켜 나타나는 반응을 개체단위에서 관찰하고, 나아가 HSP70 발현 분석을 통해 대상 생물이 오존 노출에 의해 받는 스트레스를 유전자 수준에서 반응을 살펴보고자 하였다. 이를 위해, *G. tokunagai*를 대상으로 서로 다른 오존 농도(0.2, 0.5, 1.0, 2.0 ppm) 노출에 따라 관찰되는 외부적인 체색의 변화와 함께 HSP70 유전자 발현 분석을 통해 생물반응을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험생물

OECD 표준 사육방법에 따라 실험 대상종인 *G. tokunagai*를 실내 사육하였다. 사육 조건은 항온기 내부온도 20±1°C, 습도 60%, 광도 500 lx, 광주기 암기와 명기를 16:8시간으로 설정하였다. 사육수는 M4 배지로 하상은 모래(<63 μm)를 투입하였다. 먹이로는 Tetramin (Tetra-Werke, Melle, Germany)를 곱게 갈아 매일 유충당 0.5 mg day⁻¹씩 공급하였다.

2. 오존 처리 농도와 실험생물 투입 방법

오존이 포함된 산소가스를 오존 생성기(PC-57, Ozone Tech, Korea)를 이용하여 증류수에 주입하여 최종농도 30 mgL⁻¹의 오존원액을 제조한 후, 이를 이용하여 0.2, 0.5, 1, 5 ppm 오존수를 제작하여 노출실험에 사용하였다. 오존수는 오존 원액을 증류수가 담긴 테프론 반응기에 주사기를 통해 주입하여 증류수로 희석하였으며, 각 농도별 오존수의 총 부피는 200 mL로 맞추었다.

4령기의 *G. tokunagai* 20개체를 농도별 오존수가 담긴 반응기에 각각 투입한 후 약 10분간 반응시킨 후 각 반응기에서 갈따구 5개체와 오존수 5 mL를 추출하였다. 이후 오존 원수를 다시 충전하여 동일한 농도의 오존수로 제조하여 20분 노출하여 각 노출 농도당 각각 5마리를 추출하였다. 동일한 방법으로 30분간 노출하여 각 농도당 각각 5마리를 채집하여, 노출 시간과 오존 농도에 따른 생물시료를 확보하였다.

채집된 시료는 RNA Isoplus (Takara, Japan) 500 μL가 담긴 1.5 mL 튜브에 옮겨 담은 후, 분석 전까지 -80°C에 냉동 보

관하였다. 반응 후 오존수는 염색시약이 담긴 튜브에 옮겨 담아 잔여 오존량을 측정하였다. 잔여 오존 농도는 von Sonntag and von Gunten (2012)에 의해 제시된 흡광도법을 따랐으며, 이때 흡광도 계수(ϵ)는 260 nm의 파장에서 $3200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 계산하였다.

3. 체색 변화 관찰 및 HSP 유전자 발현

오존에 노출된 붉은 체색을 지닌 *G. tokunagai*는 각 시간과 농도에 노출 후 표면을 육안 관찰 후, 카메라로 촬영하였다. 이후 체색 변화관찰을 위해 Image J 프로그램을 이용하여 색 변화에 대해 상대적 비교를 진행하였다(Schneider *et al.*, 2012).

HSP70 유전자발현 실험을 위해 RNA 추출은 RNA isoplus (Takara, Japan)을 이용하였으며, genomic DNA를 제거하기 위해 DNase I (Takara, Japan)을 이용하여 진행하였다. 추출한 RNA 순도와 정량을 측정하기 위해 1.2% agarose gel 전기영동장치와 microplate reader (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 이용하였다. cDNA 합성은 PrimerScript 1st strand cDNA synthesis kit (Takara, Japan)를 이용하여 합성을 진행하였다. 유전자 발현을 위한 내부적 대조군(internal control)은 GAPDH를 이용하였으며, 각 유전자들의 온도별 효율성을 검증 후 실험을 진행하였다. 유전자 발현 측정은 CFX Connect™ Real-Time PCR System (Bio-Rad, CA, USA)과 SYBR green master mix (Bioneer, Korea)을 이용하여 95°C에서 5분 후, 95°C에서 20초, 58°C에서 15초로 40회 진행 후, melting curve 분석을 진행하였다. 발현된 Ct 값은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 상대적 발현을 비교하였다.

4. 통계적 자료 분석

오존노출에 따른 *G. tokunagai*의 생물반응에 대한 결과와 각 HSP 유전자 발현에 대한 유의적 차이를 통계적으로 비교하기 위해 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Tukey's test와 분산분석(ANOVA, $\alpha=0.05$)을 실시하고, 모든 데이터는 평균±분산 값으로 표시하였다.

결과 및 고찰

오존을 이용한 소독 작용은 노출 생물, 소독 시간과 농도에 따라 효율성이 달라지며 최근 수생 및 육상 생물을 대상으로 오존 농도에 따른 독성 효과에 대한 연구가 보고되었다(Michael *et al.*, 2013; Ternes *et al.*, 2015). Alexander *et al.* (2016)은 오존 처리에 따라 달라지는 박테리아 군집을 16S rRNA amplicon sequencing을 통해 관찰한 결과, 처리 전 1021 operational taxonomic units (OTU)을 보였으나, 처리 후 482 OTU로 감소함을 보였다. 오존 노출로 생물이 받는 영향에 대한 연구는 대부분 박테리아나 병원체 제거를 목표로 하고 있으며, 그 외의 수생 생물을 제거하기 위한 용도로 적용되고 있지는 않아 연구가 희소한 상태이다.

오존에 노출된 *G. tokunagai*의 붉은 체색이 얼어지거나 탈색하여 희미해지는 변화가 관찰되었으며, 오존의 노출 농도와 노출 시간이 올라가면 체색의 탈색이 증가되는 농도 의존적인 경향이 관찰되었다(Fig. 1A-D). Image J 프로그램을 사용하여 체색의 변화를 분석한 결과, 대조군은 선명한 붉은 체색을 보였으며, 오존에 노출된 개체들에서는 체색의 변화가 노출 정도에 따라 붉은색이 체절 마디에 따라 부분적으로 탈색되고 또한 체절이 경직되어 가는 양상이 오존 노출 농도가 증가됨에 따라 분명하게 나타났다(Fig. 1F). 일반적으로 헤모글로빈을 지녀 붉은 체색을 띠는 깔따구는 산소운반 및 저장과 같은 생리적 역할을 수행하는 능력이 다른 저서생물에 비해 뛰어난 적응능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, 실험종인 *G. tokunagai*도 붉은색을 지녀 생리적으로 저산소층에 적응하는 능력을 갖추고 있는 종이다(Panis *et al.*, 1996). 수돗물 정수장에서 세균과 바이러스 제거를 위해 사용되는 오존의 살균작용은 매우 강력하여, 저농도 30분 이하 노출에서 무척추동물 중 적응력이 뛰어난 깔따구에 처리 시에 생존에 필수적인 생리적인 항상성 유지에 필요한 헤모글로빈의 탈색을 초래하여 체절을 경직되게 하는 현상을 보여주었다.

또한, 다양한오존 농도에노출된 *G. tokunagai*의 치사율을 산출한 결과, 시간-농도 의존적으로 치사율이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2). 상대적으로 저농도인 오존 0.2 ppm 30분

Table 1. Primers used to amplify specific gene.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Efficiency (%)	Accession number
HSP70	F: TGGGAAACAGAACAACACCA R: TTTGAATGGCCAATGTTTCA	182	93.4	AB162946
GAPDH	F: GGTATTTTCATTGAATGATCACTTTG R: TAATCCTTGGATTGCATGTACTTG	110	94.8	EU999991

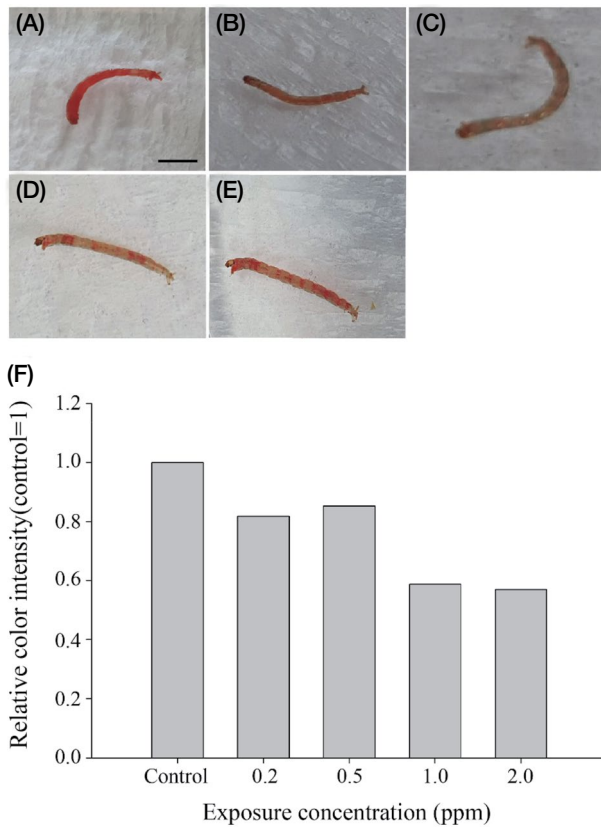


Fig. 1. Change of body color on *G. tokunagai* after ozone exposure on 30 minute. (A-E) Animal coloration change taken with the camera, scale bar = 2.5 mm (A: control, B: 0.2 ppm, C: 0.5 ppm, D: 1.0 ppm, E: 2.0 ppm). (F) Image processing analysis of animal coloration.

노출 시 10%로 가장 낮은 치사율을 보였으며, 0.5 ppm 20분 동안 노출 시 치사율의 변화가 나타나지 않았으나, 30분 노출에서 15%의 치사율이 관찰되었다. 1.0 ppm 오존 노출된 *G. tokunagai*는 시간이 지남에 따라 치사율이 증가하는 경향을 나타내며 30분간 노출 이후에는 45% 치사율을 보였다. 가장 고농도인 2.0 ppm 20분간 노출하였을 때 치사율 25%를 보인 후, 30분 노출에는 75%의 치사율이 나타내었다.

오존 노출 후 잔여량을 확인한 결과, 노출 10분 후 측정 한 오존의 잔여 농도가 0.2~0.5 ppm에서 0 ppm으로 검출되지 않았으나, 1.0~2.0 ppm에서는 잔여 농도가 확인되었다 (Table 2). 1.0 ppm 오존 노출 잔여 농도는 10분 후 0.49 ppm으로 절반 정도 감소하였으며, 시간이 지남에 따라 감소하여 30분 후 0.25 ppm 수준을 보였다. 또한, 2.0 ppm 오존에서도 노출 10분 후 잔여 농도는 0.96 ppm으로 절반 수준을 보였으며 점차 잔여 농도가 감소하는 경향을 나타냈다. 높은 농도의 오존 처리는 강한 소독 효과로 *G. tokunagai*의 높은 치사율

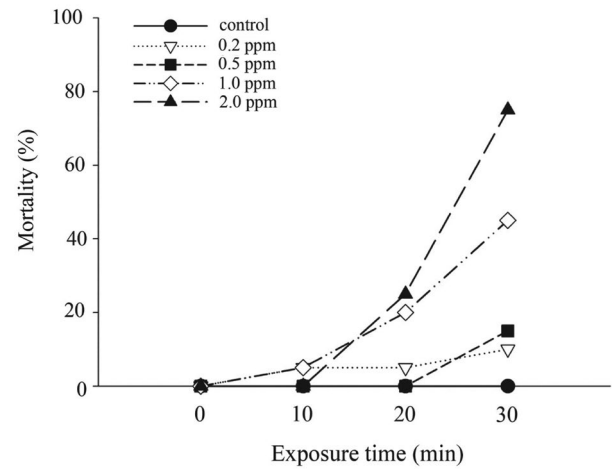


Fig. 2. Cumulative mortality percentage (%) of *Glyptotendipes tokunagai* that had been exposed at different ozone level of control, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 ppm up to 30 minute.

Table 2. Measurement of residual concentration after ozone exposure.

Exposure concentration (ppm)	Exposure time (minute)	Residual concentration (ppm)
0.2	10	0.0
	20	0.0
	30	0.0
0.5	10	0.0
	20	0.0
	30	0.0
1.0	10	0.49
	20	0.11
	30	0.25
2.0	10	0.96
	20	0.74
	30	0.64

을 나타내었으며, 고농도 오존처리는 잔여 농도도 상대적으로 높게 나타나 안전한 상수도 관리를 위해서는 잔여농도에 대한 지침도 필요함을 시사한다.

오존에 노출된 *G. tokunagai*의 생리적인 스트레스 반응을 반영하는 HSP70 유전자 발현을 측정 한 결과, 오존 노출 10분 중 1.0 ppm을 제외한 노출군과 20분 동안 노출된 그룹에서 대조군보다 높은 HSP70 발현을 보였다. 상대적 저농도인 0.2~0.5 ppm에서 초기 노출 10분과 20분에 대한 HSP70 발현량이 통계적으로 유의한 수준으로 높게 나타났

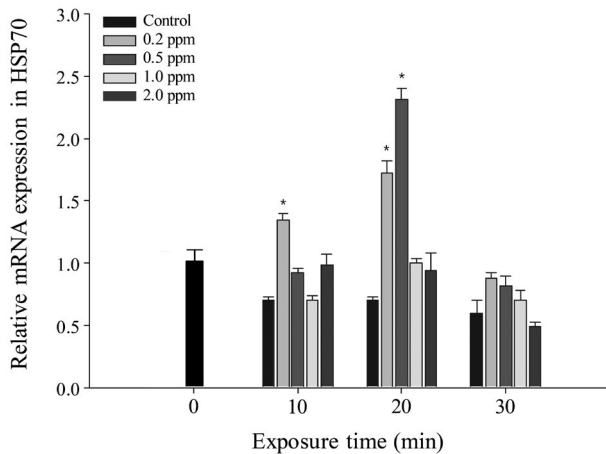


Fig. 3. mRNA expression of HSP70 gene in *G. tokunagai* larvae exposed to different concentration of ozone.

으나 ($P < 0.05$), 30분 노출 후에는 발현량이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 오존 노출 시간 30분에는 HSP70 발현량이 급격하게 감소하였으며, 2.0 ppm에서는 대조군보다 낮은 HSP70 발현량을 보였다.

HSPs는 세포 성장과 항상성 유지에 관여하는 유전자로 그중, HSP70는 환경 변화나 외부 요인에 따른 스트레스 반응에 민감한 특징으로 인해 스트레스 분자지표 유전자로서 보고되고 있다(Park and Kwak, 2008; Kim *et al.*, 2017). HSP70은 세포 내에서 유전자 접합과 전사 작용 등을 통해 생물의 생리 및 신진대사뿐 아니라 면역 활동을 유지하는 데 기여한다(Park *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). 본 연구에서 *G. tokunagai* HSP70 발현이 오존 노출군에서 대조군에 비해 높게 나타남에 따라 오존 노출이 생물의 세포 내 생리기작에 관련된 유전자에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 외부 기원의 스트레스 요인은 활성산소와 apoptosis 증가를 유도하여 세포들의 정상적인 활동을 저해함으로써 생물 체내 항상성에 불균형을 유도한다고 알려져 있다(Garrido *et al.*, 2003). 따라서, 외부의 스트레스 유입으로 인한 생리적 항상성의 불균형 초기에는 이에 대한 대응을 하기 위해 HSP70을 포함한 다양한 유전자들이 반응을 하게 된다. 그러나, 지속된 스트레스 노출은 생리작용과 항상성 유지를 위한 생물 체내 에너지 고갈을 유도하여 성장, 번식 및 생존에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Somero, 2002). 이는 오존 노출로 인한 치사율이 시간-농도 의존적으로 증가됨을 보여준 것과 같은 경향을 보여주었다. 기존 연구 중 쥐의 피부조직에서 HSP70과 nitric oxide synthase (iNOS) 유전자 발현이 8 ppm 오존에 12시간 동안 노출된 실험군에서 증가하였으며 이는 오존 노출이 세포 내 활성산소 증가를 유도하여 HSP70 발현에 영향을

준 것으로 보고하였다(Valacchi *et al.*, 2002). 또한, 갈따구를 대상으로 염분, 살충제, 자외선 등 다양한 외부 스트레스원에 따른 HSP70 유전자 발현 증가되었음이 알려져 있다(Park *et al.*, 2009, 2010; Oraez *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017). 이와 같은 연구 결과들은 본 연구에서 관찰한 서로 다른 농도의 오존 노출이 *G. tokunagai*에 스트레스 원인으로 작용하여 생리, 독성학적으로 영향을 주어 치사율과 HSP70 발현에 반영된 것으로 볼 수 있다.

적 요

오존은 수돗물 정수장에서 이용되는 소독 물질로 미세오염 물질들을 비롯해서 박테리아나 병원성 미생물체를 효과적으로 제거하는 것으로 많은 연구가 보고되어 있다. 본 연구에서는 실내 사육 중인 붉은 체색을 지닌 *Glyptotendipes tokunagai*를 대상으로 서로 다른 농도의 오존 노출에 따른 영향을 파악하기 위해 치사율, 체색 변화와 heat shock protein 70 (HSP70) 유전자 발현을 측정하였다. 오존에 노출된 *G. tokunagai*에서 농도-시간 의존적으로 치사율 증가가 관찰되었다. 또한 체색 변화는 오존 농도에 따라 붉은색의 체색이 체절마다 옅어지며 탈색되고 경직되는 현상이 보였다. HSP70 유전자 발현은 저농도인 0.2~0.5 ppm에서 노출 10분과 20분에 유의한 수준으로 높게 나타났으나($P < 0.05$), 30분 노출 후에는 발현량이 감소하는 경향을 보였다. 생리적으로 저산소충에 대해 적응능력이 뛰어난 갈따구 경우에도 오존은 매우 강력한 치사 효과를 유발하여 30분 노출 후 경직과 헤모글로빈 파괴로 인한 탈색이 유발되는 것을 보여주었다. 따라서 본 결과는 수돗물 정수장에서 병원성 미생물을 제거하는 데 사용되는 오존이 수생물에 주는 영향성을 파악하는 기초자료로서 활용될 수 있을 것이다.

저자정보 김원석(전남대학교 해양융합과학과 대학원생), 최보형(전남대학교 수산과학연구소 학술연구교수), 곽인실(전남대학교 해양융합과학과 교수), 김문경(서울대학교 보건환경연구소 연구원), 채선하(K-water 연구원 물이용연구소 연구원)

저자기여도 개념설정: 곽인실, 방법론: 곽인실, 김문경, 분석: 곽인실, 김원석, 김문경, 자료제공: 곽인실, 자료관리: 곽인실, 최보형, 김원석, 원고 초안작성: 곽인실, 김원석, 원고 교정: 곽인실, 최보형, 채선하, 김원석, 원고 편집 및 검토: 곽인실, 김원석, 과제관리: 곽인실, 연구비 수주: 곽인실

이해관계 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

연구비 본 연구는 한국연구재단 [NRF-2018-R1A6A1A-03024314]와 [NRF-2020-R1A2C1013936]의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Alexander, J., G. Knopp, A. Dötsch, A. Wieland and T. Schwartz. 2016. Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Science of The Total Environment* **559**: 103-112.
- Baek, M.J., T.J. Yoon and Y.J. Bae. 2012. Development of *Glyptotendipes tokunagai* (Diptera: Chironomidae) under different temperature conditions. *Environmental Entomology* **41**: 950-958.
- Delaney, M.A. and P.H. Klesius. 2004. Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* **236**: 633-644.
- Englert, D., J.P. Zubrod, R. Schulz and M. Bundschuh. 2013. Effects of municipal wastewater on aquatic ecosystem structure and function in the receiving stream. *Science of the Total Environment* **454-455**: 401-410.
- Garrido, C., E. Schmitt, C. Candé, N. Vahsen, A. Parcellier and G. Kroemer. 2003. HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* **2**(6): 578-583.
- Hollender, J., S.G. Zimmermann, S. Koepke, M.M. Krauss, C.S. McArdell, C. Ort, H. Singer, U.V. Gunten and H. Siegrist. 2009. Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. *Environmental Science & Technology* **43**: 7862-7869.
- Kim, W.S., B.H. Im, C. Hong, S.W. Choi, K. Park and I.S. Kwak. 2017. Gene expression of *Chironomus riparius* heat shock protein 70 and developmental retardation exposure to salinity. *Korean Journal of Ecology and Environment* **50**: 305-313.
- Kim, W.S., R. Kim, K. Park, N. Chamilani and I.S. Kwak. 2015. The molecular biomarker genes expressions of rearing species *Chironomus riparius* and field species *Chironomus plumosus* exposure to heavy metals. *Korean Journal of Ecology and Environment* **48**: 86-94.
- Kim, W.S., K. Park and I.S. Kwak. 2020. Stress evaluation to heavy metal exposure using marker in *Chironomus riparius*. *Korean Journal of Ecology and Environment* **53**(2): 165-172.
- Kregel, K.C. 2002. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* **92**: 2177-2186.
- Lee, J.H., S.H. Lee, Y.J. Bae, K.J. Cho, K.S. Ryoo, Y. Kim and M.P. Jung. 2009. Assessment techniques for ecological effects on heavy metal pollution using invertebrate biomarkers. Jeonghaengsa, Seoul, Korea.
- Michael, I., L. Rizzo, C.S. McArdell, C.M. Manaia, C. Merlin, T. Schwartz, C. Dagot and D. Fatta-Kassinos. 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Research* **47**: 957-995.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2008. Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di (2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere* **74**: 89-95.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2020. Cadmium-induced developmental alteration and upregulation of serine-type endopeptidase transcripts in wild freshwater populations of *Chironomus plumosus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **192**: 110240.
- Park, K., H.W. Bang, J. Park and I.S. Kwak. 2009. Ecotoxicological multilevel-evolution of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere* **77**(3): 359-367.
- Park, K., J. Park 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.
- Panis, L.I., B. Goddeeris and R. Berheym. 1996. On the relationship between vertical microdistribution and adaptations to oxygen stress in littoral Chironomidae. *Hydrobiologia* **318**: 61-67.
- Pereira, R.D.O., M.L.D. Alda, J. Joglar, L.A. Daniel and D. Barcelo. 2011. Identification of new ozonation disinfection byproducts of 17 β -estradiol and estrone in water. *Chemosphere* **84**(11): 1535-1541.
- Schneider, C.A., W.S. Rasband and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**: 671-675.
- Somero, G.N. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits and costs of living. *Integrative and Comparative Biology* **42**(4): 780-789.
- Stalter, D., A. Magdeburg, M. Weil, T. Knacker and J. Oehlmann. 2010. Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. *Water Research* **44**(2): 439-448.
- Ternes, T., A. Joss and J. Oehlmann. 2015. Occurrence, fate, removal and assessment of emerging contaminants in water in the water cycle (from wastewater to drinking water). *Water Research* **72**: 1-2.
- Valacchi, G., A.V.D. Vliet, B.C. Schock, T. Okamoto, U. Obermuller-Jevic, C.E. Cross and L. Packer. 2002. Ozone exposure activates oxidative stress response in murine skin. *Toxicology* **179**: 163-170.
- Von Sonntag, C. and U. Von Gunten. 2012. Chemistry of ozone

in water and wastewater treatment: from basic principles to applications. IWA Publishing, London.

World Health Organization. 2006. Expert Consultation for 2nd Addendum to the 3rd Edition of the Guidelines for Drinking-water Quality: Geneva, 15-19, May 2006. WHO/SDE/WSH/06.05. World Health Organization.

Zhou, J., W.N. Wang, W.Y. He, Y. Zheng, L. Wang, Y. Xin, Y. Liu and A.L. Wang. 2010. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. *Journal of Invertebrate Pathology* **130**(3): 170-178.