

## 기수산 물벼룩에서 수온과 polystyrene beads의 복합 독성

이윤하, 박종석, 박채린, 조상현, 유제원, 이영미\*

상명대학교 융합공과대학 생명공학전공

## Combined toxic effects of water temperature and polystyrene beads in the brackish water flea

Youn-Ha Lee, Jong-Seok Park, Chaerin Park, Sang-Hyun Cho, Je-Won Yoo and Young-Mi Lee\*

Department of Biotechnology, College of Convergence Engineering, Sangmyung University, Seoul 03016, Republic of Korea

### Contribution to Environmental Biology

- Increased water temperature enhanced PS beads toxic effects on reproduction and ecdysteroid pathway-related gene expression of *D. celebensis*.
- This study provides a better understanding of the complex toxic interaction between water temperature and microplastics for marine zooplankton.

### \*Corresponding author

Young-Mi Lee

Tel. 02-2287-5448

E-mail. ymlee70@smu.ac.kr

Received: 8 August 2023

First revised: 21 September 2023

Second revised: 4 October 2023

Revision accepted: 8 November 2023

**Abstract:** Microplastics and nanoplastics (NMPs) are considered one of hazardous contaminants in marine ecosystems due to their toxic effects, such as reproduction disorder and oxidative stress, on marine organisms. Although water temperature is rising due to global climate change, little information on the toxicological interaction between NMPs and temperature is available. Therefore, in this study, we confirmed the toxicity of NMPs (polystyrene [PS] beads; 0.05- and 6- $\mu\text{m}$ ) on brackish water fleas (*Diaphanosoma celebensis*) depending on increased temperature (30°C and 35°C) at individual and molecular levels. In the chronic toxicity test, the group exposed to high temperatures showed an earlier first reproduction time compared to the normal temperatures group, but it was delayed by co-exposure to NMPs at 35°C. Notably, the total reproduction decreased significantly only after 0.05- $\mu\text{m}$  PS beads exposure at 30°C. Interaction analysis showed that first reproduction time, modulation of the antioxidant-related gene (*GSTS1*), heat shock gene (*Hsp70*), and ecdysteroid pathway-related genes (*EcR\_A*, *EcR\_B*, and *CYP314A1*) were closely related to temperature and PS beads size. These results indicate that microplastics have size-dependent toxicity, and their toxicity can be enhanced at high temperatures. In addition, higher temperatures and PS beads exposure may have negative effects on reproduction. This study suggests that various factors such as water temperature should be considered when evaluating the toxicity of microplastics in marine ecosystems, and provides an understanding of the complex toxic interaction between water temperature and microplastics for marine zooplankton.

**Keywords:** marine organisms, temperature, microplastics, nanoplastics, interaction effect

## 1. 서 론

플라스틱은 기계, 건설, 식품, 의료 등 다양한 분야에서 이용되고 있으며 플라스틱의 산업적 필요성이 부각됨에 따라 전 세계적인 생산량 또한 계속적으로 증가하고 있다 (Geyer *et al.* 2017). 하지만 이들의 부적절한 관리로 인해 많은 양의 플라스틱이 환경으로 배출되고 있으며, 특히 해양환경은 다양한 오염물질이 최종적으로 유입되는 종착지로서 해양 플라스틱 오염에 대한 관심이 꾸준히 증가하고 있다 (Cózar *et al.* 2014). 플라스틱은 전체 해양 폐기물의 80%에 달하는 것으로 알려져 있으며 (Jambeck *et al.* 2015), 해양환경의 플라스틱은 파도와 모래 등에 의한 풍화, 자외선에 의한 광산화, 생물학적 분해 등을 거쳐 작은 미세플라스틱 (Microplastics, MPs; < 5 mm) 또는 나노플라스틱 (Nanoplastics, NPs; < 1 µm)으로 분해될 수 있다 (Zbyszewski *et al.* 2014; Frias and Nash 2019). 미세플라스틱과 나노플라스틱은 그 작은 크기로 인해 소형 해양생물에 의해서도 섭취될 수 있어 더 큰 크기를 갖는 플라스틱 폐기물에 비해 다양한 종류의 해양생물에 영향을 끼칠 수 있는 오염물질로 간주되며, 이들의 섭취는 생식능력 저하, 먹이 섭취 감소, 대사활동 변화, 산화적 스트레스 등을 유발할 수 있음이 보고된 바 있다 (Cole *et al.* 2015; Jeong *et al.* 2016; Lu *et al.* 2016).

지구온난화는 산업혁명 이후 지속적으로 증가한 온실가스가 원인이 되어 발생한 세계적인 기후문제이다 (Xie *et al.* 2010). 선행 연구들은 수온의 상승이 해양생물에서 호흡률 및 에너지 대사율의 증가 (Jang *et al.* 2022; Kim *et al.* 2022), 행동 장애 (Yoon and Park 2022), 치사 (Park and Park 2010) 등 부정적 영향을 야기할 수 있으며, 나아가 중금속 및 유기오염물질을 포함한 수계 오염물질의 독성 영향이 높은 수온에서 강화될 수 있음을 보고하였다 (Patra *et al.* 2015; Haque *et al.* 2020). 최근 사육 온도가 높아지면 미세플라스틱에 의한 독성 영향이 강화된다는 결과가 담수 물벼룩과 담수 어류 등에서 보고된 바 있다 (Jaikumar *et al.* 2018; Kumar *et al.* 2020; Serra *et al.* 2020; Hasan *et al.* 2023). 그럼에도 불구하고 해양생물에서 미세플라스틱 영향과 수온 상승의 복합 영향에 대한 연구는 매우 미흡한 상황이며, 해양환경의 플라스틱 오염과 수온의 상승을 고려할 때 이들의 상호작용이 해양생물에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다.

지각목에 속하는 기수산 물벼룩 *Diaphanosoma cele-*

*bensis*는 열대 아시아 지역에서 주로 서식하며 넓은 염분 농도 및 온도 범위에서도 생존이 가능한 소형 갑각류이다. 이들은 해양생태계 내에서 생산자와 상위 포식자 간의 영양 단계를 연결하는 역할을 수행하는 일차 소비자로서, 14일 정도의 짧은 생애 주기와 작은 크기 (adult: 413~1,112 µm), 단성 생식을 통한 높은 유전적 동일성 등 해양 생태 독성 연구에 적합한 특성을 가지고 있다 (Marcial and Hagiwara 2007; Yoo *et al.* 2021). *D. celebensis*는 여과 섭식자로서 미세플라스틱 및 나노플라스틱을 섭취할 수 있으며, 선행 연구들을 통해 플라스틱 입자의 생물 독성 영향을 평가하기 위한 시험생물종으로서 활용되어 왔다 (Yoo *et al.* 2021; Cho *et al.* 2022). 또한, 20~35°C의 넓은 온도 범위에서 생존할 수 있어 (Park and Park 2010) 미세플라스틱과 높은 수온의 독성 상호작용을 연구하기에 적합할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 미세플라스틱과 나노플라스틱의 영향이 고온 조건하에서 어떻게 변화할 수 있는지 확인하기 위해 기수산 물벼룩 *D. celebensis*를 시험생물로 이용하여 개체 수준에서 생식에 미치는 영향을 확인하였으며, 분자적 수준의 영향을 확인하기 위해 생식 (ecdysteroid 경로) 및 스트레스 관련 유전자 (항산화 효소 및 열충격 단백질)의 발현 변화를 조사하였다. 이는 기후변화로 인한 수온변화가 해양생물에 대한 미세플라스틱 및 나노플라스틱의 독성에 미치는 영향을 이해하는 데 도움이 될 것이다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시험생물

시험생물은 상명대학교 분자독성학연구실에서 배양하고 있는 기수산 물벼룩 *D. celebensis*를 이용하였다. 기수산 물벼룩의 배양을 위한 인공 해수 (15 psu, pH 7.8 ± 0.5, D.O. 8.0 ± 0.5 mg L<sup>-1</sup>)는 인공 해수염 Instant Ocean (Aquarium system, France)을 이용하여 제조하였다. 1.6 L의 인공해수가 채워진 2 L 유리 비커에 기수산 물벼룩을 약 400개체 배치한 뒤, 온도 25 ± 1°C와 광주기 dark : light = 12-h : 12-h 조건의 배양기 (Plant Growth Chamber, JS Research, Gongju, Korea)에서 배양하였으며 해양 녹조류인 *Tetraselmis suecica* (1.0~3.0 × 10<sup>7</sup> cells L<sup>-1</sup>)를 먹이생물로 매일 공급하였다.

## 2.2. 시험용액 제조

모든 시험 용액은 0.05- $\mu\text{m}$ 와 6- $\mu\text{m}$  크기의 polystyrene beads (PS beads; Polyscience, Warrington, PA, USA) 표준 용액 (25 g L<sup>-1</sup>)을 인공 해수에 희석하여 제조하였으며, 플라스틱의 분산을 위해 분산제인 Tween 20 (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)를 첨가하고 10분간 초음파 처리 (20 kHz, 90% amp.)하였다. 만성 독성시험을 위한 PS beads 농도는 Cho *et al.* (2022)에 따라 0.8 mg L<sup>-1</sup>로 선정하였고, 유전자 발현 분석을 위한 노출 시험에서는 0.1, 1, 10 mg L<sup>-1</sup>의 농도가 되도록 시험용액을 제조하였으며, 분산제 농도는 시험용액의 0.001% (v/v) 이하가 되도록 하였다.

## 2.3. 노출시험

수온 상승에 따른 미세플라스틱의 영향 변화를 확인하기 위해 각각 다른 온도 (25, 30, 35°C)로 설정된 배양기를 이용하였다. 만성 노출시험은 Cho *et al.* (2022)의 방법에 따라 실시하였으며 생식지표 변화(첫 산란 시점 및 총 산란 수)와 개체군 성장률을 확인하기 위해 두 종류의 시험을 14일간 실시하였다. 첫 산란 시점과 총 산란 수의 확인은 제조한 PS beads 시험용액 (0.8 mg L<sup>-1</sup>)을 12-well plate에 3 mL 채우고, 태어난 지 24시간 미만의 기수산 물벼룩 유생을 well당 1개체씩 노출하여 총 12반복으로 진행하였다. 개체군 성장률 확인을 위해 50 mL 비커에 시험용액을 40 mL 채우고, 태어난 지 24시간 미만의 기수산 물벼룩 유생을 비커당 5개체씩 노출하여 4반복으로 진행하였다. 생식지표와 개체군 성장률 확인을 위한 노출시험은 *T. suecica* (1.0 × 10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup>)를 매일 공급하여 진행하였고, 배지는 2일마다 새로운 배지로 전량 교체하였다. 유전자 발현 변화 확인을 위한 노출시험에서는 농도별 시험용액 (0.1, 1, 10 mg L<sup>-1</sup>)을 250 mL 비커에 200 mL 채우고, 태어난 지 4일 된 기수산 물벼룩 200개체를 48시간 동안 노출하였으며 노출 기간 중 먹이 공급 및 환수는 실시하지 않았다. 만성 독성 영향 및 유전자 발현 변화 확인을 위한 모든 그룹의 노출시험은 다른 온도 조건 (25, 30, 35°C)에서 각각 동일하게 수행되었다.

## 2.4. 생식지표 및 개체군 성장률 관찰

첫 산란 시점을 측정하기 위하여 기수산 물벼룩의 첫 산란이 시작될 것으로 예상되는 노출 4일차부터 12시간마다

신생 개체를 확인하였으며, 첫 신생 개체가 관찰된 이후에는 24시간마다 확인하고 제거하였다. 총 산란 수는 노출 기간인 14일간 노출된 기수산 물벼룩 개체가 낳은 신생 개체의 수를 모두 합하여 계산하였다. 개체군 성장률은 각 온도에서 PS beads에 노출한 후 14일간 격일로 폐사한 개체를 제외한 모든 기수산 물벼룩 개체 수를 세어 기록하였으며, Eq. 1에 따라 개체군 성장률을 측정하였다(Rico-Martinez and Dodson 1992).

$$r = \ln [(D_t/D_0)] / t \quad (\text{Eq. 1})$$

$r$  = 개체군 성장률,  $D_t$  = 최종 개체군 밀도,  
 $D_0$  = 초기 개체군 밀도,  $t$  = 총 관찰 기간

## 2.5. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

유전자 발현 변화 확인을 위해 48시간 동안 PS beads 시험용액에 노출된 기수산 물벼룩은 모두 포집하여 1.5 mL microtube에 옮긴 뒤 TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 균질화 하고 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA는 NanoReady touch (Life Real Inc., Hangzhou, Zhejiang, China)를 이용하여 농도를 확인하였으며, 500 ng의 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA의 합성은 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용해 수행했으며, 합성된 cDNA는 TE buffer로 10배 희석한 뒤 유전자 분석에 이용하였다.

## 2.6. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

PS bead 노출에 따른 항산화, 스트레스 관련 유전자 및 생식 관련 유전자의 발현 양상에 대한 온도 상승의 영향을 알아보기 위하여 *D. celebensis*의 항산화 효소 유전자 5종 [Copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD), Manganese superoxide dismutase (MnSOD), Catalase (CAT), Glutathione S-transferase Sigma1 (GST-S1), Glutathione peroxidase (GPx)]과 탈피호르몬 경로 관련 유전자 3종 [Ecdysone receptor A (EcR\_A), Ecdysone receptor B (EcR\_B), Cytochrome P450 314A1 (CYP314A1)]을 선별하였다(Yoo *et al.* 2021; Cho *et al.* 2022). 열충격 단백질 유전자 3종

[*Heat shock protein 70 (Hsp70)*, *Heat shock protein 90b (Hsp90b)*, *Heat shock cognate 70 (Hsc70)*]은 *D. celebensis* 전사체 데이터베이스로부터 확보하였고, 각각의 primer는 유전자별로 [*Hsp70* (F: 5'-CACCATCACCAACGACAAG-3', R: 5'-AAGCAGTAAGATTCCAAACTATTC-3'), *Hsp90b* (F: 5'-GAAGAAGTGAAGACCACATTTG-3', R: 5'-TGCTTATTACCGCTCTGCTG-3'), 그리고 *Hsc70* (F: 5'-TTCAGGGTGGTGTGTTGGC-3', R: 5'-AATGGTCGTGTTGCGTTGG-3')] 제작하여 사용하였다. 타겟 유전자 증폭을 위해 primer set을 각각 10 pmole씩, cDNA, 그리고 SYBR Master Mix (KAPA Bioassay System, Wilmington, MA, USA)를 혼합한 후 CFX Connect Thermal Cycler (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)에서 qRT-PCR을 진행하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 변성 단계를 거친 후 95°C에서 15초간 변성, 60°C에서 1분간 프라이머 결합 단계를 35회 순환하도록 하였다. Reference gene은 *elongation factor-1beta (EF-1b)*를 이용하였으며, 측정된 C(t) 값을 바탕으로  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법(Livak and Schmittgen 2001)을 이용하여 상대적 유전자 발현을 계산하였다. 각 시료는 3반복으로 분석하였다.

## 2.7. 통계분석

모든 시험 결과 값은 Sigmaplot version 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) 프로그램을 사용하여 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation) 값을 구하고 추가 분석에 사용하였다. 온도 및 PS beads 노출에 따른 생식지표의 변화 및 온도 변화에 따른 유전자 발현의 결과는 GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) 프로그램을 이용하여 그래프를 작성하였다. PS beads의 노출에 따른 유전자의 발현의 변화는 각 온도 조건에서 PS beads가 노출되지 않은 그룹을 기준으로 PS beads 노출군의 상대적 유전자 발현을 계산하였으며, MeV software (version 4.9; Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA)를 이용해 heat map을 제작하였다. 각 실험 결과들의 통계적 분석은 SPSS version 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 진행하였다. 기수산 물벼룩의 생식지표의 및 유전자 발현의 변화에 미치는 온도 또는 PS beads 등 단일 변수의 영향은 정규성 검사(Shapiro-Wilk test,  $p > 0.05$ ) 후 일원배치 분산분석(one-way ANOVA) 방법으로 분석하였으며, 각 지표에 미

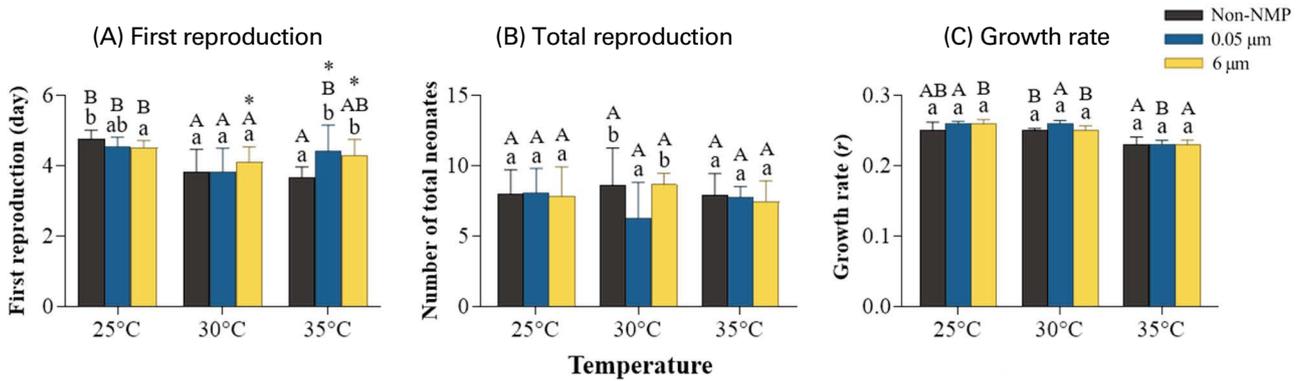
치는 온도 또는 PS beads의 상호작용 영향은 일원배치 분산분석(two-way ANOVA) 방법으로 분석하였다. 그룹 간 유의한 차이가 있는 경우 Tukey 방법에 따라 사후검증을 진행하였다. 분산분석 결과 온도와 PS beads의 상호작용이 있다고 판단된 경우, 유의한 상호작용이 나타난 조건을 확인하기 위해 온도 및 PS beads의 조합에 따라 추가로 two-way ANOVA를 진행하였다. 모든 통계분석은  $p$  값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 온도와 PS beads의 만성 노출이 생식지표와 개체군 성장률에 미치는 영향

본 연구에서 기수산 물벼룩의 첫 산란 시점은 높은 온도(30 및 35°C) 조건에 노출된 그룹에서 일반 온도 조건(25°C)에 노출된 경우보다 각각 0.95, 1.11일 유의하게 빨라지는 것을 확인하였으며(Fig. 1A), 비록 통계적으로 유의하지는 않지만 30°C에 노출된 그룹에서 총 산란 수의 증가가 관찰되었다(Fig. 1B). 그러나 수온 증가에 따른 성장률 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1C). Park and Park (2010)에 따르면 본 연구의 결과와 마찬가지로 30 및 35°C에서 배양된 *D. celebensis*의 경우 25°C 배양 그룹과 비교해 빨라진 첫 산란 시점을 보고하였으며, 특히 30°C에서 배양된 그룹에서 가장 높은 총 자손 생산율이 나타남을 보고하였다. 선행 연구들은 수온의 상승이 수생생물의 호흡률(Khan and Khan 2008) 및 에너지 대사(Khan and Khan 2008; Jang *et al.* 2022)를 증가시킬 수 있음을 보고하였으며, Luo *et al.* (2017)의 연구에 따르면 일반 배양 조건(24°C)보다 상대적으로 높은 온도(27°C)에 노출된 담수어류, *Gobiocypris rarus*에서 증가된 알 생성 및 산란율을 나타냈다. 이를 고려할 때 높은 온도 조건에 노출된 *D. celebensis*의 빨라진 첫 산란 시점 및 총 산란 수의 증가는 온도 상승으로 인해 증가된 호흡 및 에너지 대사의 영향일 수 있다.

미세플라스틱은 난분해성 물질로써 수생생물의 장에 축적되어 먹이 섭취의 감소 및 산화 스트레스의 증가를 야기할 수 있으며 이에 따라 개체의 생존을 위한 에너지의 할당을 증가시키고 생식에 필요한 에너지의 할당을 감소시켜 생식 독성을 나타낼 수 있는 것으로 알려져 있다(Cole



**Fig. 1.** First reproduction time, total reproduction, and growth rate in *Diaphanosoma celebensis* exposed to polystyrene beads (0.05- and 6-µm; 0.8 mg L<sup>-1</sup>) under different temperature conditions (25°C, 30°C, and 35°C) for 14 days. The asterisk indicates the significant interaction between temperature and the size of PS beads (two-way ANOVA and Tukey's post hoc test). Different lowercase letters indicate significant differences between groups exposed to different NMPs at the same temperature, and uppercase letters indicate significant differences between groups exposed to the same NMPs at different temperatures (one-way ANOVA and Tukey's post hoc test).

et al. 2015; Sussarellu et al. 2016; Yoo et al. 2022; Jeon et al. 2023). 반면 미세플라스틱에 노출된 담수산 물벼룩 *Daphnia magna* (Huang et al. 2022), 요각류 *Tigriopus japonicus* (Lee et al. 2013) 등 소형 동물성 플랑크톤에서 유의한 생식 저해 영향을 보고한 선행 연구들의 결과들과는 달리, 본 연구에서 25°C의 조건에서 PS beads의 노출은 *D. celebensis*의 첫 산란 시점을 지연시키지 않았다 (Fig. 1A). 그러나 35°C의 조건에서는 *D. celebensis*의 첫 생식 시점을 각 0.77일(0.05-µm PS beads)과 0.65일(6-µm PS beads) 지연시켰고, 30°C 조건에서 0.05-µm PS에 노출된 개체군에서 PS beads에 노출 되지 않은 그룹과 비교해 총 산란 수가 2.33마리 유의하게 감소되었다(one-way ANOVA,  $p < 0.05$ ) (Fig. 1A, B). 이는 미세플라스틱을 포함한 환경 오염물질의 독성이 높은 온도 조건에서 증가할 수 있다는 선행 연구들의 결과와 일치한다(Haque et al. 2020; Hasan et al. 2023).

Hasan et al. (2023)은 높은 온도 조건에 노출된 담수 어류 *Oreochromis niloticus*에서 polyamide (PA) 입자의 섭취가 증가될 수 있으며, 이에 따라 PA 입자로 인한 면역 독성 및 조직 손상이 증가함을 보고하였다. 또한 Serra et al. (2020)은 *D. magna*에 대한 PS beads의 독성이 높은 온도에서 증가될 수 있음을 보고하였으며 이는 높은 온도로 인해 증가한 대사 요구도 및 먹이 섭취율이 오염물질의 섭취를 강화하는 요인이 될 수 있다고 추정하였다. 선행 연구들의 결과를 고려할 때 높은 온도 조건에서 증가된 PS beads의 생식 독성 영향은 고온 환경에서 *D. celebensis*의 에너지

대사 및 호흡률이 증가하고, 이로 인해 PS beads의 섭취가 증가하였기 때문일 수 있다. 하지만 높은 온도에서 증가된 PS beads의 생식 독성 영향을 PS beads의 섭취 양상과 연결지어 해석하기 위해서는 각 온도 조건에서 *D. celebensis*의 호흡률, 여과율 및 PS beads 축적 등의 변화에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

### 3.2. 온도 및 PS beads의 급성 노출이 항산화 효소, 스트레스, 생식 경로 관련 유전자 발현에 미치는 영향

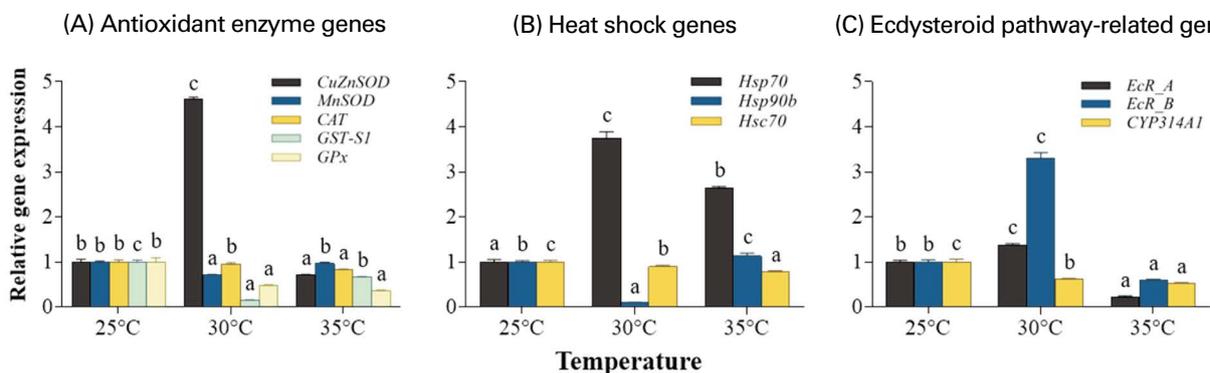
환경 유래 물질이 생물체에 유입되는 경우, 대부분의 오염물질은 생물체에 의해 대사되어 체외로 배출될 수 있다. 하지만 이들의 대사과정에서 높은 반응성을 가지는 활성 산소종이 생산될 수 있으며, 과도한 활성산소종은 단백질을 포함한 다양한 생체 고분자물질을 손상시킬 수 있다(Magnani and Mattevi 2019; Mailloux 2020; Juan et al. 2021). 항산화 효소는 이러한 활성산소종을 제거하고 불안정한 상태의 분자를 안정한 상태로 변화시키는 역할을 수행하며, 열충격 단백질(heat shock protein, Hsp)은 열, 자외선, 생체 이물 등 다양한 스트레스에 대응하여 생체 고분자물질의 구조를 유지하고 기능을 올바르게 수행할 수 있도록 돕는 것으로 알려져 있다(Wong and Do 2017). 탈피호르몬인 ecdysteroid는 내분비 호르몬의 일종으로 갑각류(Crustacean)의 탈피 과정을 조절하여 성장, 생식, 발생 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Lafont and Mathieu 2007). CYP314A1은 ecdysone을 활성 형태

인 20-hydroxyecdysone (20E)으로 변환하는 역할을 수행하고, 이렇게 변환된 20E는 ecdysone receptor (EcR)에 결합하여 하위 호르몬 경로를 활성화함으로써 절지동물의 성장 및 생식을 조절할 수 있다(Zhu *et al.* 2006; Niwa and Niwa 2016). 따라서 이들 효소의 활성 및 유전자 발현 변화는 오염물질 노출에 따른 스트레스 영향 및 생식 독성 영향을 평가하기 위한 유용한 생체지표로 활용되어 왔다(Trestrail *et al.* 2020; Cho *et al.* 2022; Yu *et al.* 2022). 특히 온도 스트레스는 생물의 에너지 대사를 변화시키고 면역, 항산화 경로 등 체내 다양한 방어기작 경로의 변화를 야기할 수 있으며(Park and Kwak 2014; Xu *et al.* 2018), 고온 환경에 노출된 생물은 체내 항상성을 유지하기 위해 다양한 항산화 효소 및 열충격 단백질의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Park and Kwak 2014; Han *et al.* 2018; Rahman and Rahman 2021).

온도 변화에 따른 기수산 물벼룩의 항산화 효소 및 열충격 단백질 유전자의 발현 변화를 확인한 결과 25°C 대비 30°C 온도 조건에서 CuZnSOD 및 Hsp70의 발현이 각각 4.62-, 및 3.74-fold만큼 유의하게 증가하였다(Fig. 2A, B). 본 연구의 결과와 유사하게 선행 연구들은 높은 온도 조건에 노출된 요각류 *Tigriopus kingsejongensis* (Han *et al.* 2018), 흰다리새우 *Litopenaeus vannamei* (Zhou *et al.* 2010), 수생 곤충 *Chironomus riparius* (Park and Kwak 2014)에서 증가된 활성산소종, 항산화 유전자의 발현 및 항산화 효소 활성을 보고하였으며, 동부 굴 *Crassostrea virginica*의 Hsp 유전자의 발현이 높은 온도에 노출된 경우 증가될 수 있음을 보고하였다(Rahman and Rahman 2021). 고온 조건은 산화 스트레스의 생성과 밀접한 관련

이 있는 것으로 알려져 있다(Oghbaei *et al.* 2021). 높은 온도는 잘못된 단백질의 접힘을 유도하며 이들의 축적은 소포체 스트레스(endoplasmic reticulum stress, ER stress)를 야기할 수 있다(Cao and Kaufman 2014). 이 과정에서 단백질의 티올기(thiol, -SH)의 산화성 결합으로 인해 글루타치온(glutathione, GSH)과 같은 항산화제 및 항산화 단백질의 기능을 감소시키고 생체 내 활성산소종의 축적을 야기할 수 있다. 따라서 30°C 온도 조건에서 증가된 CuZnSOD의 발현은 높은 온도 조건이 *D. celebensis*에 산화적 스트레스를 유도하였음을 보여주며, 이와 함께 증가된 Hsp70 유전자의 발현은 높은 온도에서 나타난 산화적 스트레스의 영향이 소포체 스트레스로부터 유도되었을 가능성을 시사한다.

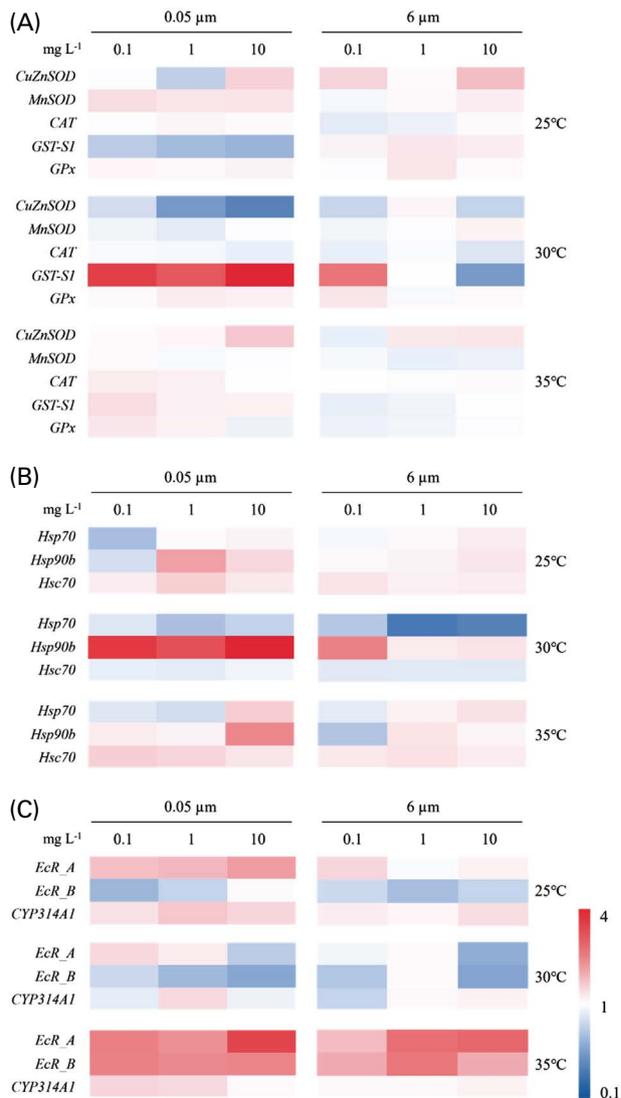
반면 온도의 변화는 생물체의 방어기작에 영향을 줄 뿐만 아니라 특히 절지동물에서 체내 호르몬의 조절에 중요한 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서 30°C 온도 조건에 노출된 *D. celebensis*의 EcR\_A 및 EcR\_B의 발현이 각각 1.37- 및 3.29-fold 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 2C). 본 연구의 결과와 유사하게 Park and Kwak (2014)은 고온 조건에 노출된 *C. riparius*의 증가된 항산화 유전자(SOD, CAT, peroxidase; Px 및 glutathione peroxidase; GPx) 및 효소(SOD 및 GPx) 활성과 함께 생식 관련 유전자 EcR, estrogen related receptor (ERR), 및 ultraspiracle (USP) 발현의 증가와 빨라진 개체의 발달을 보고하였으며, 이를 높아진 온도 조건에서 나타난 내분비 시스템의 교란의 결과로 제시하였다. 따라서 30°C 온도 조건에서 증가된 EcR 유전자의 발현은 높은 온도 조건에서 *D. celebensis*의 내분비계가 손상될 수 있음을 의미하며, 이



**Fig. 2.** Relative gene expression in *Diaphanosoma celebensis* exposed to different temperatures (25°C, 30°C, and 35°C) for 48 h. Different lowercase letters indicate significant differences among the temperatures (one-way ANOVA and Tukey's post hoc test).

는 고온 조건에서 첫 생식의 시기가 빨라진 만성 독성시험의 결과를 뒷받침한다. 반면 35°C의 조건에서 *Hsp70*을 제외한 대부분의 스트레스 및 생식 유전자의 발현이 감소하였으며, 이는 과도하게 높은 온도 조건에서 세포 방어기작 및 내분비계 조절 기능이 손상되어 항산화 및 내분비 경로 유전자의 조절에 장애가 나타났기 때문일 수 있다.

미세플라스틱은 수생생물에 의해 섭취되어 다양한 독성 영향을 나타낼 수 있으며 산화 스트레스 및 생식 독성은 미세플라스틱의 대표적인 생물 독성 영향으로 알려져 있다 (Jeong *et al.* 2016; Cho *et al.* 2022). 선행 연구들은 미세플라스틱에 노출된 해양 로티퍼 *Brachionus koreanus*, 기수 산 물벼룩 *D. celebensis*, 흰다리 새우 *L. vannamei* 및 어류 *Danio rerio* 및 *Hypophthalmichthys molitrix*에서 활성산소종의 증가, 항산화 효소 활성 및 유전자 발현의 증가, 및 생식 관련 유전자의 변화 등 스트레스 및 생식 독성과 관련한 분자 및 개체 수준의 영향을 보고하였다 (Jeong *et al.* 2016; Liu *et al.* 2018; Yoo *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2021; Cho *et al.* 2022; Pandi *et al.* 2022). 본 연구에서 PS beads의 급성 독성 노출은 스트레스 및 생식 관련 유전자의 발현을 변화시켰으며, 이들 유전자 발현에 미치는 PS beads의 영향은 각각의 온도 조건에서 서로 다른 패턴을 나타냈다 (Fig. 3). Yoo *et al.* (2021)의 연구에 따르면 *D. celebensis*에서 GST 효소의 활성 및 *GST-S1* 유전자의 발현이 PS beads 노출에 의해 민감하게 조절되는 생체지표였으며, 따라서 *GST-S1*의 발현은 PS beads의 독성 영향을 예측하기 위한 중요한 지표로 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구에서 *GST-S1*의 발현은 30°C의 조건에서 0.05- $\mu$ m PS beads 노출된 경우 가장 크게 증가하는 양상을 보였으며 (3.13- to 4.15-fold, compared to non-NMP exposed group at 30°C; Fig. 3A), 이와 유사하게 0.05- $\mu$ m PS beads 노출에 의한 *Hsp90b*의 발현 조절은 30°C에서 가장 높게 나타났다 (3.23- to 10.93-fold, compared to non-NMP exposed group at 30°C; Fig. 3B). 이와 유사하게 높은 온도 조건과 오염물질 노출이 스트레스 유전자 및 효소 활성 변화에 미치는 상승적 독성작용은 다양한 수생생물을 이용한 연구를 통해 보고되어왔다. Bae *et al.* (2016)은 *D. magna*에서 구리(Cu)로 인한 활성산소종 및 지질과산화물의 생산이 높은 온도 조건에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였으며, Park and Kwak (2014)은 diethylhexyl phthalate (DEHP)에 노출된 *C. riparius*에서 나타난 항산화 효소의



**Fig. 3.** Heat maps of relative mRNA expression of (A) antioxidant enzyme genes, (B) heat shock protein genes, and (C) ecdysteroid pathway-related genes in *Diaphanosoma celebensis* exposed to PS beads (0.05- and 6- $\mu$ m) and different temperatures (25°C, 30°C, and 35°C) for 48 h.

유전자 발현 및 효소 활성이 높은 온도 조건에서 유의하게 증가될 수 있음을 보여주었다. 선행 연구들의 결과를 미루어 볼 때 30°C 조건에서 0.05- $\mu$ m PS beads 노출에 따른 *D. celebensis*의 *GST-S1* 및 *Hsp90b*의 상승적 발현 조절은 높은 온도(30°C)가 PS beads로 인한 산화적 스트레스 작용을 강화할 수 있음을 의미하며, 특히 작은 크기의 PS beads (0.05- $\mu$ m)에서 상승적 독성작용이 강하게 나타날 수 있음을 시사한다.

Hsp90은 잘못 접힌 단백질이 다시 접힐 수 있도록 돕는 샤페론 단백질로 Hsp70 등의 다른 샤페론과 함께 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Mayer and Bukau 2005). Hsc70 또한 열 스트레스하에 발생한 Hsp70에 결합하여 복합체를 형성하고 분자 샤페론으로 작동하는 것으로 알려져 있다(Liu *et al.* 2012), Hsp90의 발현이 증가할 경우 Hsp70과 Hsc70의 발현도 증가하여 함께 역할을 수행할 것이라 추측할 수 있다. 일반 온도 조건(25°C)에서는 PS beads 노출에 따른 Hsp90b, Hsp70, 및 Hsc70 유전자 발현 양상이 대체로 함께 상향 및 하향조절되는 것을 확인할 수 있었으나, 30°C 조건에서 PS beads 노출에 따른 Hsp90b 발현은 Hsp70 및 Hsc70의 발현과는 상반되는 경향을 나타냈다. 이러한 상반된 유전자 발현의 구체적인 원인은 알 수 없으나, 상승한 온도가 PS beads로 인한 Hsp70과 Hsc70의 합성 능력 방해 효과를 강화했거나 Hsp90b의 발현이 빠르게 증가하면서 다른 열충격 단백질과의 발현 시점에 차이가 발생했을 가능성이 존재하며, 이를 확인하기 위해서는 높은 온도 조건에서 실제 HSP 단백질의 합성과 관련한 추가적인 연구가 필요하다.

반면 스트레스 관련 유전자들의 발현과는 달리, PS beads 노출에 따른 생식 관련 유전자(*EcR\_A* 및 *EcR\_B*)들의 발현은 35°C 조건에서 가장 유의하게 증가하였으며, 30°C 조건에 10 mg L<sup>-1</sup>의 PS beads (0.05- 및 6- $\mu$ m)의 노출은 *EcR* 유전자들의 발현을 유의하게 감소시켰다(Fig. 3C). 고온 조건에서 PS beads 노출에 따른 스트레스 관련 유전자의 발현 변화가 특히 0.05- $\mu$ m 노출군에서 독성 영향이 상승적으로 나타난 것과는 달리 생식 관련 유전자의 발현은 동일한 온도 조건에서 PS beads의 크기에 따른 패턴 차이는 관찰되지 않았다. 이는 높은 온도와 PS beads의 노출이 *D. celebensis*의 생식 관련 유전자의 발현에 상호작용을 나타낼 수 있지만, PS beads의 크기에 비해 온도의 변화가 이들의 상호작용에 더 유의한 영향을 나타내는 요인으로 해석될 수 있다. 그럼에도 불구하고 ecdysteroid 경로가 절지동물의 생식과 밀접한 관계가 있다는 것을 고려할 때, 35°C 조건 PS beads (0.05- 및 6- $\mu$ m) 노출에 따른 *EcR* 유전자의 발현의 급격한 증가 및 30°C 조건에서 PS beads 노출에 의해 유의하게 감소된 *EcR* 유전자의 발현은 PS beads 노출에 따른 생식 독성 영향이 높은 온도 조건(30 및 35°C)에서 강화될 수 있음을 의미한다. 또한 이러한 비정상적인 탈피 관련 유전자 발현의 조절이 만성 독성시험에

서 나타난 고온 조건과 PS beads의 상승적 독성작용의 원인이 될 수 있을 것으로 보인다.

### 3.3. 생식지표, 성장률, 유전자 발현과 온도 및 PS beads 크기 사이의 상호작용 효과

생식지표(첫 생식 시점, 총 산란 수), 성장률(*r*) 및 각 유전자 발현에 대한 온도와 PS beads 크기에 대한 two-way ANOVA 분석 결과, 생식지표 중 첫 산란 시점에 유의한 상호작용 영향을 나타낼 수 있는 것으로 나타났으나, 총 산란 수 및 개체군 성장률에 미치는 유의한 상호작용은 관찰되지 않았다(Table 1). 선행 연구들을 통해 PS beads의 크기가 작을수록 독성이 높게 나타난다고 알려져 있음에도 불구하고 본 연구에서는 30°C의 조건에 노출된 경우 6- $\mu$ m PS beads 노출 그룹만이 첫 생식 시점에 대해 유의한 상호작용을 나타냈다. 비록 선행 연구에서 해양생물에 미치는 PS beads의 산화 스트레스의 독성 영향이 미세플라스틱의 크기가 작을수록 증가된다는 것을 보고하였으나(Jeong *et al.* 2016; Yoo *et al.* 2021), Jeon *et al.* (2023)의 연구에 따르면 세포 독성 영향과는 달리 기수산 물벼룩의 에너지 대사에 미치는 PS beads의 영향은 미세플라스틱의 크기 특이적으로 나타날 수 있음을 보여주었다. 저자들은 PS beads가 *D. celebensis*의 에너지 대사에 미치는 영향은 PS beads의 크기에 따른 소화기관 내 축적 양상에 의해 영향을 받을 수 있을 것이라 제시하였다. 6- $\mu$ m PS beads의 경우 *D. celebensis*의 먹이생물과 유사한 크기로 0.05- $\mu$ m PS beads에 비해 소화기관 내에 더 높은 축적을 나타내는 점을 고려할 때(Yoo *et al.* 2021), 6- $\mu$ m PS beads로 인해 낮아진 먹이의 섭취가 30°C 조건에서 첫 생식 시점에 대해 6- $\mu$ m PS beads 특이적 상호작용이 나타난 결과의 원인일 수 있다.

한편 유전자 발현 변화의 경우, 스트레스 관련 유전자의 발현은 30°C에서 0.05- $\mu$ m PS beads 노출에서 총 7개의 유전자(*CuZnSOD*, *MnSOD*, *CAT*, *GST-S1*, *Hsp70*, *Hsp90b*, *Hsc70*)가 상호작용 영향을 나타냈으며, 6- $\mu$ m PS beads 노출에 의해 영향을 받은 유전자는 4개(*CuZnSOD*, *CAT*, *GST-S1*, *Hsp70*)로 나타났다(Table 2). 이러한 경향은 35°C 온도 조건에서도 나타났으나 온도가 상승함에 따라 PS beads의 크기에 따른 상호작용 효과를 보인 유전자는 더 적게 나타났다[0.05- $\mu$ m, 5개(*MnSOD*, *GST-S1*, *GPx*, *Hsp70*, *Hsp90b*); 6- $\mu$ m, 5개(*CuZnSOD*, *MnSOD*, *GST-S1*, *Hsp70*, *Hsp90b*)]. 이는 PS beads 노출에 따른 산화 스트레

**Table 1.** Results of two-way ANOVA with the influence of temperatures (25°C, 30°C, and 35°C) and size of PS beads (0.05- and 6-µm; 0.8 mg L<sup>-1</sup>) on first reproduction, total reproduction, and growth rate of *Diaphanosoma celebensis*

	First reproduction					Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	df	SS	MS	F	p	
Temperature	2	9.27	4.63	19.7	<0.0001	30°C + 6-µm
Size	2	1.08	0.54	2.3	0.1057	35°C + 0.05-µm
Interaction	4	4.00	1.00	4.3	0.0032	35°C + 6-µm
	Total reproduction					Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	df	SS	MS	F	p	
Temperature	2	1.45	0.72	0.2	0.8071	-
Size	2	12.62	6.31	1.9	0.1587	-
Interaction	4	32.85	8.21	2.4	0.0519	-
	Growth rate ( <i>r</i> )					Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	df	SS	MS	F	p	
Temperature	2	0.83	0.41	43.0	<0.0001	-
Size	2	0.00	0.00	0.4	0.7026	-
Interaction	4	0.06	0.01	1.5	0.2328	-

스의 영향이 높은 온도에 의해 변화할 수 있으며, 극심한 고온 조건(35°C)의 경우 플라스틱의 크기에 상관 없이 PS beads에 의한 산화적 스트레스의 영향을 증가시킬 수 있음을 의미한다. 그럼에도 불구하고 상대적으로 낮은 온도 증가 조건(30°C)에서 0.05-µm PS beads가 더욱 많은 유전자들과의 상호작용을 나타냈으며, 이는 해당 조건에서 미세 플라스틱의 크기는 상승적 독성 영향에 중요한 요인으로 작용하며 플라스틱의 크기가 작을수록 더욱 높은 독성 영향이 나타날 수 있음을 보여준다.

생식 관련 유전자인 *EcR\_A*, *EcR\_B* 및 *CYP314A1*의 발현 조절은 모두 고온과 PS beads의 동시 노출에 상호작용이 높은 것으로 나타났으며, 30°C와 35°C에서 모든 크기의 PS beads에 대한 상호작용 영향이 관찰되었다. 이는 *D. celebensis*의 생식이 높은 온도 및 PS beads 노출에 민감하게 변화할 수 있으며, 이들의 상호작용 영향을 평가하기에 민감한 지표로 활용될 수 있음을 의미한다. 그럼에도 불구하고 PS beads의 크기와 관계 없이 각 온도 조건에서 나타난 유전자 발현 패턴의 유사성을 미루어 볼 때(Fig. 3C), 온도의 변화는 *D. celebensis*의 생식에 대해 PS beads의 독성 영향을 변화시키는 주요 요인으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 PS beads의 독성이 높은 온도 조건에서 강화될 가능성이 있는지 개체 및 유전자 수준에서 확인하였다. 연구 결과 높아진 온도에서 PS beads에 노출된 기수 산 물벼룩의 항산화, 스트레스 관련 및 ecdysteroid 경로 관련 유전자의 발현을 조절함으로써 생식 및 개체군 성장에 대한 독성 영향이 더 강화될 수 있음을 확인하였다. 특히 온도 및 PS beads 노출에 따른 높은 상관관계를 보이는 5개 유전자들(*MnSOD*, *GSTSI*, *EcR\_A*, *EcR\_B*, 그리고 *CYP314A*)은 변화하는 수 환경에서 생물의 건강성을 예측하기 위한 분자지표로써 활용 가능성이 높다. 본 연구는 미세플라스틱에 대한 독성을 평가하고자 할 때 미세플라스틱이 존재하는 수 환경의 수온을 포함하는 다양한 물리화학적 요소가 고려되어야 할 필요가 있음을 제시하였다. 그러나 미세플라스틱과 온도의 복합 영향을 충분히 이해하기 위해서는 다양한 독성 발현 경로(adverse outcome pathway)에 대한 다각적인 연구가 필요할 것이다. 본 연구는 기후변화에 따라 변화하는 수 환경에서 미세플라스틱이 해양동물 플랑크톤에 미치는 복합적인 독성 영향을 이해하는 데 도움이 될 것이다.

**Table 2.** Results of two-way ANOVA with the influence of temperatures (25°C, 30°C, and 35°C) and size of PS beads (0.05- and 6-µm; 10 mg L<sup>-1</sup>) on antioxidant (*CuZnSOD*, *MnSOD*, *CAT*, *GST-S1*, and *GPx*), heat shock protein (*Hsp70*, *Hsp90b*, and *Hsc70*), and ecdysteroid pathway-related genes (*EcR\_A*, *EcR\_B*, and *CYP314A1*) of *Diaphanosoma celebensis*

<i>CuZnSOD</i>						Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	30.47	15.24	1838.0	<b>&lt; 0.0001</b>	30°C + 0.05-µm
Size	2	2.13	1.07	128.4	<b>&lt; 0.0001</b>	30°C + 6-µm
Interaction	4	11.67	2.92	352.1	<b>&lt; 0.0001</b>	35°C + 6-µm
<i>MnSOD</i>						Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	1.01	0.50	425.9	<b>&lt; 0.0001</b>	30°C + 0.05-µm
Size	2	0.09	0.04	36.3	<b>&lt; 0.0001</b>	35°C + 0.05-µm
Interaction	4	0.20	0.05	42.2	<b>&lt; 0.0001</b>	35°C + 6-µm
<i>CAT</i>						Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	0.22	0.11	60.1	<b>&lt; 0.0001</b>	30°C + 0.05-µm
Size	2	0.00	0.00	0.1	0.9156	30°C + 6-µm
Interaction	4	0.04	0.01	5.5	<b>0.0034</b>	
<i>GST-S1</i>						Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	2.32	1.16	1129.0	<b>&lt; 0.0001</b>	30°C + 0.05-µm
Size	2	0.03	0.02	17.0	<b>&lt; 0.0001</b>	35°C + 0.05-µm
Interaction	4	1.01	0.25	246.0	<b>&lt; 0.0001</b>	30°C + 6-µm 35°C + 6-µm
<i>GPx</i>						Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	2.98	1.50	550.0	<b>&lt; 0.0001</b>	
Size	2	0.03	0.02	6.4	<b>0.0068</b>	35°C + 0.05-µm
Interaction	4	0.03	0.01	3.0	<b>0.0425</b>	
<i>Hsp70</i>						Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	29.18	14.59	2052.0	<b>&lt; 0.0001</b>	30°C + 0.05-µm
Size	2	2.08	1.04	146.2	<b>&lt; 0.0001</b>	35°C + 0.05-µm
Interaction	4	9.98	2.50	351.0	<b>&lt; 0.0001</b>	30°C + 6-µm 35°C + 6-µm
<i>Hsp90b</i>						Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	7.79	3.89	604.0	<b>&lt; 0.0001</b>	30°C + 0.05-µm
Size	2	5.73	2.86	444.0	<b>&lt; 0.0001</b>	35°C + 0.05-µm
Interaction	4	1.60	0.40	61.9	<b>&lt; 0.0001</b>	35°C + 6-µm

Table 2. Continued

	<i>Hsc70</i>					Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	0.57	0.29	26.8	<0.0001	
Size	2	0.13	0.07	6.1	0.0083	30°C + 0.05- $\mu$ m
Interaction	4	0.13	0.03	3.1	0.0359	
	<i>EcR_A</i>					Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	4.25	2.12	301.7	<0.0001	30°C + 0.05- $\mu$ m
Size	2	1.24	0.62	88.3	<0.0001	35°C + 0.05- $\mu$ m
Interaction	4	2.20	0.55	78.2	<0.0001	30°C + 6- $\mu$ m 35°C + 6- $\mu$ m
	<i>EcR_B</i>					Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	11.78	5.89	846.8	<0.0001	30°C + 0.05- $\mu$ m
Size	2	0.56	0.28	40.5	<0.0001	35°C + 0.05- $\mu$ m
Interaction	4	4.50	1.13	161.8	<0.0001	30°C + 6- $\mu$ m 35°C + 6- $\mu$ m
	<i>CYP314A1</i>					Significant interaction combination ( $p < 0.05$ )
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	
Temperature	2	3.36	1.68	300.5	<0.0001	30°C + 0.05- $\mu$ m
Size	2	0.26	0.13	23.5	<0.0001	35°C + 0.05- $\mu$ m
Interaction	4	0.32	0.08	14.4	<0.0001	30°C + 6- $\mu$ m 35°C + 6- $\mu$ m

## 적 요

미세플라스틱과 나노플라스틱 (NMPs)은 해양생물에 대한 생식 방해, 산화적 스트레스 등의 부정적 영향을 줄 수 있어 해양생태계의 유해오염물질 중 하나로 간주된다. 전 지구적 기후변화로 해수 온도가 상승하고 있음에도 불구하고 미세플라스틱과 온도변화 간의 독성학적 상호 작용에 대한 연구는 제한적이다. 따라서, 본 연구에서는 기수산 물벼룩 *Diaphanosoma celebensis*에 대한 NMPs (polystyrene beads; 0.05-, 6- $\mu$ m)의 온도 상승에 따른 독성을 개체 및 유전자 수준에서 확인하였다. 개체 수준에서의 첫 생식 시점은 온도 상승에 의해 빨라지는 양상을 보였으나 35°C 온도 조건에서 PS beads에 노출된 경우 유의하게 지연되었다. 총 산란 수는 30°C, 0.05- $\mu$ m PS beads에 노출된 경우에서만 유의하게 감소하였다. 상호작용 분석

결과 첫번째 생식 시점과 향산화 및 열충격 단백질 유전자 (*GSTS1* 및 *Hsp70*) 및 ecdysteroid 경로 관련 유전자 (*EcR\_A*, *EcR\_B*, 및 *CYP314A1*)가 온도 및 PS 입자 크기에 주로 영향을 받는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 미세플라스틱이 크기 의존적인 독성을 가지고 있음을 보여줌과 동시에 온도 증가로 인해 독성이 강화될 수 있음을 의미한다. 본 연구는 미세플라스틱의 독성을 평가할 때 수온 등 다양한 요소 또한 고려되어야 한다는 점을 제시하였으며, 해양 동물 플랑크톤에 대한 수온과 미세플라스틱의 복합적 독성 상호작용에 대한 이해를 제공할 수 있을 것이다.

## CRedit authorship contribution statement

**YH Lee:** Methodology, Data curation, Formal analysis, Writing-Original draft, Writing-Review & editing. **JS Park:**

Methodology, Gene expression test. **C Park:** Methodology, Maintenance. **SH Cho:** Methodology, Maintenance. **JW Yoo:** Data curation, Interaction analysis, Writing-Review. **YM Lee:** Conceptualization, Supervision, Writing-Review & editing.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Bae E, P Samanta, J Yoo and J Jung. 2016. Effects of multigenerational exposure to elevated temperature on reproduction, oxidative stress, and Cu toxicity in *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe.* 132:366–371. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.034>
- Cao SS and RJ Kaufman. 2014. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid. Redox Signal.* 21:396–413. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5851>
- Cho H, CB Jeong and YM Lee. 2022. Modulation of ecdysteroid and juvenile hormone signaling pathways by bisphenol analogues and polystyrene beads in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 262:109462. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109462>
- Cole M, P Lindeque, E Fileman, C Halsband and TS Galloway. 2015. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ. Sci. Technol.* 49:1130–1137. <https://doi.org/10.1021/es504525u>
- Cózar A, F Echevarría, JI González-Gordillo, X Irigoien, B Úbeda, S Hernández-León, ÁT Palma, S Navarro, J García-de-Lomas, A Ruiz, ML Fernández-de-Puelles and CM Duarte. 2014. Plastic debris in the open ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:10239–10244. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314705111>
- Frias JPGL and R Nash. 2019. Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Mar. Pollut. Bull.* 138:145–147. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.022>
- Geyer R, JR Jambeck and KL Law. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3:e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Han J, CB Jeong, E Byeon and JS Lee. 2018. Effects of temperature changes on the generation of reactive oxygen species and the expression and activity of glutathione-S transferases in two congeneric copepods *Tigriopus japonicus* and *Tigriopus kingsejongensis*. *Fish. Sci.* 84:815–823. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1224-3>
- Haque MN, SE Nam, BM Kim, K Kim and JS Rhee. 2020. Temperature elevation stage-specifically increases metal toxicity through bioconcentration and impairment of antioxidant defense systems in juvenile and adult marine mysids. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 237:108831. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108831>
- Hasan J, MA Siddik, AK Ghosh, SB Mesbah, MA Sadat and M Shahjahan. 2023. Increase in temperature increases ingestion and toxicity of polyamide microplastics in Nile tilapia. *Chemosphere* 327:138502. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138502>
- Huang CH, TW Chu, CH Kuo, MC Hong, YY Chen and B Chen. 2022. Effects of microplastics on reproduction and growth of freshwater live feeds *Daphnia magna*. *Fishes* 7:181. <https://doi.org/10.3390/fishes7040181>
- Jaikumar G, J Baas, NR Brun, MG Vijver and T Bosker. 2018. Acute sensitivity of three Cladoceran species to different types of microplastics in combination with thermal stress. *Environ. Pollut.* 239:733–740. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.069>
- Jambeck JR, R Geyer, C Wilcox, TR Siegler, M Perryman, A Andrady, R Narayan and KL Law. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347:768–771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>
- Jang SW, HS Kang, DY Kang and KS Cho. 2022. Effect of rearing water temperature on growth and physiological response of juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Korean J. Environ. Biol.* 40:651–659. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2022.40.4.651>
- Jeon MJ, JW Yoo, KW Lee, EJ Won and YM Lee. 2023. Microplastics disrupt energy metabolism in the brackish water flea *Diaphanosoma celebensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 271:109680. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109680>
- Jeong CB, EJ Won, HM Kang, MC Lee, DS Hwang, UK Hwang, B Zhou, S Souissi, SJ Lee and JS Lee. 2016. Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-p38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). *Environ. Sci. Technol.* 50:8849–8857. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01441>
- Juan CA, JM Pérez de la Lastra, FJ Plou and E Pérez-Lebeña. 2021. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 22:4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Khan Q and M Khan. 2008. Effect of temperature on waterflea *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera). *Nat. Prec.* <https://doi.org/10.1038/npre.2008.1909.1>

- Kim H, JH Kim, SH Kim, Z Suonan and KS Lee. 2022. Photosynthetic and respiratory responses of the surfgrass, *Phyllospadix japonicus*, to the rising water temperature. Korean J. Environ. Biol. 40:352–362. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2022.40.3.352>
- Kumar N, NK Chandan, GC Wakchoure and NP Singh. 2020. Synergistic effect of zinc nanoparticles and temperature on acute toxicity with response to biochemical markers and histopathological attributes in fish. Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol. 229:108678. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108678>
- Lafont R and M Mathieu. 2007. Steroids in aquatic invertebrates. Ecotoxicology 16:109–130. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0113-1>
- Lee KW, WJ Shim, OY Kwon and JH Kang. 2013. Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. Environ. Sci. Technol. 47:11278–11283. <https://doi.org/10.1021/es401932b>
- Liu T, CK Daniels and S Cao. 2012. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. Pharmacol. Ther. 136:354–374. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.014>
- Liu Z, M Cai, P Yu, M Chen, D Wu, M Zhang and Y Zhao. 2018. Age-dependent survival, stress defense, and AMPK in *Daphnia pulex* after short-term exposure to a polystyrene nanoplastic. Aquat. Toxicol. 204:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.08.017>
- Livak KJ and TD Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu Y, Y Zhang, Y Deng, W Jiang, Y Zhao, J Geng, L Din and H Ren. 2016. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. Environ. Sci. Technol. 50:4054–4060. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00183>
- Luo S, S Jin, L Su and J Wang. 2017. Effect of water temperature on reproductive performance and offspring quality of rare minnow, *Gobiocypris rarus*. J. Therm. Biol. 67:59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.05.002>
- Magnani F and A Mattevi. 2019. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. Curr. Opin. Struct. Biol. 59:91–97. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.001>
- Mailloux RJ. 2020. An update on mitochondrial reactive oxygen species production. Antioxidants 9:472. <https://doi.org/10.3390/antiox9060472>
- Marcial HS and A Hagiwara. 2007. Multigenerational effects of 17 $\beta$ -estradiol and nonylphenol on euryhaline cladoceran *Daphnosoma celebensis*. Fish. Sci. 73:324–330. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01338.x>
- Mayer MP and B Bukau. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cell. Mol. Life Sci. 62:670–684. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>
- Niwa YS and R Niwa. 2016. Transcriptional regulation of insect steroid hormone biosynthesis and its role in controlling timing of molting and metamorphosis. Dev. Growth Diff. 58:94–105. <https://doi.org/10.1111/dgd.12248>
- Oghbaei H, L Hosseini, F Farajdokht, SR Aghsan, A Majdi, S Sadigh-Eteghad, SS Shotorani and J Mahmoudi. 2021. Heat stress aggravates oxidative stress, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in the cerebellum of male C57 mice. Mol. Biol. Rep. 48:5881–5887. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06582-9>
- Pandi P, J Madhuvandhi, KK Priya, R Thiagarajan, S Gopalakrishnan, S Elumalai and H Thilagam. 2022. Weathered polyethylene microplastics exposure leads to modulations in glutathione-S-transferase activity in fish. Front. Mar. Sci. 9:990351. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.990351>
- Park JC and HG Park. 2010. Optimum salinity and temperature condition for mass culture of the brackish water flea, *Diaphanosoma celebensis*. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 43:139–145. <https://doi.org/10.5657/kfas.2010.43.2.139>
- Park K and IS Kwak. 2014. The effect of temperature gradients on endocrine signaling and antioxidant gene expression during *Chironomus riparius* development. Sci. Total Environ. 470:1003–1011. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.052>
- Patra RW, JC Chapman, RP Lim, PC Gehrke and RM Sunderam. 2015. Interactions between water temperature and contaminant toxicity to freshwater fish. Environ. Toxicol. Chem. 34:1809–1817. <https://doi.org/10.1002/etc.2990>
- Rahman MS and MS Rahman. 2021. Effects of elevated temperature on prooxidant-antioxidant homeostasis and redox status in the American oyster: Signaling pathways of cellular apoptosis during heat stress. Environ. Res. 196:110428. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110428>
- Rico-Martínez R and SI Dodson. 1992. Culture of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. Aquaculture 105:191–199. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90130-D](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90130-D)
- Serra T, A Barcelona, N Pous, V Salvadó and J Colomer. 2020. Synergistic effects of water temperature, microplastics and ammonium as second and third order stressors on *Daphnia magna*. Environ. Pollut. 267:115439. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115439>
- Sussarellu R, M Suquet, Y Thomas, C Lambert, C Fabioux, MEJ Pernet, NL Goïc, V Quillien, C Mingant, Y Epelboin, C Corporeau, J Guyomarch, J Robbens, I Paul-Pont, P Soudant and

- A Huvet. 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113:2430–2435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519019113>
- Trestrail C, D Nugegoda and J Shimeta. 2020. Invertebrate responses to microplastic ingestion: Reviewing the role of the antioxidant system. *Sci. Total Environ.* 734:138559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138559>
- Wong LL and DT Do. 2017. The role of heat shock proteins in response to extracellular stress in aquatic organisms. pp. 247–274. In: *Heat Shock Proteins in Veterinary Medicine and Sciences* (Asea A and P Kaur, eds.). Springer. Berlin, Germany. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-73377-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-73377-7_9)
- Xie SP, C Deser, GA Vecchi, J Ma, H Teng and AT Wittenberg. 2010. Global warming pattern formation: Sea surface temperature and rainfall. *J. Clim.* 23:966–986. <https://doi.org/10.1175/2009JCLI3329.1>
- Xu DX, S Zhou and H Yang. 2018. RNA-seq based transcriptional analysis reveals dynamic genes expression profiles and immune-associated regulation under heat stress in *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 78:169–176. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.037>
- Yoo JW, H Cho, MJ Jeon, CB Jeong, JH Jung and YM Lee. 2021. Effects of polystyrene in the brackish water flea *Daphnosoma celebensis*: Size-dependent acute toxicity, ingestion, egestion, and antioxidant response. *Aquat. Toxicol.* 235:105821. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105821>
- Yoo JW, MJ Jeon, KW Lee, JH Jung, CB Jeong and YM Lee. 2022. The single and combined effects of mercury and polystyrene plastic beads on antioxidant-related systems in the brackish water flea: Toxicological interaction depending on mercury species and plastic bead size. *Aquat. Toxicol.* 252:106325. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106325>
- Yoon SJ and JH Park. 2022. Behavioral responses and tolerance limits of wild goldeye rockfish *Sebastes thompsoni* to high temperature exposure. *Korean J. Environ. Biol.* 40:247–254. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2022.40.3.247>
- Yu H, L Shi, P Fan, B Xi and W Tan. 2022. Effects of conventional versus biodegradable microplastic exposure on oxidative stress and gut microorganisms in earthworms: A comparison with two different soils. *Chemosphere* 307:135940. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135940>
- Zbyszewski M, PL Corcoran and A Hockin. 2014. Comparison of the distribution and degradation of plastic debris along shorelines of the Great Lakes, North America. *J. Gt. Lakes Res.* 40:288–299. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.02.012>
- Zhang C, J Wang, Z Pan, S Wang, L Zhang, Q Wang, Q Ye, A Zhou, S Xie, F Zeng, G Xu and J Zou. 2021. A dosage-effect assessment of acute toxicology tests of microplastic exposure in filter-feeding fish. *Fish Shellfish Immunol.* 113:154–161. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.04.010>
- Zhou J, L Wang, Y Xin, WN Wang, WY He, AL Wang and Y Liu. 2010. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. Therm. Biol.* 35:284–289. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.06.004>
- Zhu J, L Chen, G Sun and AS Raikhel. 2006. The competence factor  $\beta$ Ftz-F1 potentiates ecdysone receptor activity via recruiting a p160/SRC coactivator. *Mol. Cell. Biol.* 26:9402–9412. <https://doi.org/10.1128/MCB.01318-06>