

수은 노출에 대한 기수산 물벼룩 *Diaphanosoma celebensis*의 항산화 반응

배철희 · 이영미*

상명대학교 자연과학대학 생명과학과

Antioxidant Responses in Brackish Water Flea *Diaphanosoma celebensis* - Exposed to Mercury

Chulhee Bae, Young-Mi Lee*

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Sangmyung University, Seoul 03016, Korea

Corresponding Author

Young-Mi Lee

Department of Life Science, College of
Natural Sciences, Sangmyung University,
Seoul 03016, Korea

E-mail : ymlee70@smu.ac.kr

Received : November 30, 2018

Revised : December 05, 2018

Accepted : December 10, 2018

수은은 다양한 산업활동에 사용되어 해양 환경 내에 지속적으로 유입되며 먹이사슬을 따라 축적되며 생물체 내로 유입 시 해양 생물의 성장, 발생, 생식, 대사 등에 악영향을 미칠 수 있다. 본 연구에서는 기수산 물벼룩 *Diaphanosoma delbensis*에 대한 수은의 급성 독성과 산화적 스트레스 지표(총 glutathione 함량, GST, GR, GPx 활성)를 이용한 항산화 반응을 조사하였다. 24시간 수은을 노출시킨 결과 생존율이 농도 의존적으로 감소하는 양상을 보였으며, 24시간 LC₅₀ 값은 0.589 mg/l (95% C.I. 0.521~0.655 mg/l)로 나타났다. 수은(0.08과 0.4 mg/l)을 24시간 노출시킨 *D. celebensis*에서 총 glutathione 함량은 유의하게 감소하는 양상을 보였으며, GST, GR, GPx 활성은 유의하게 증가하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 수은 노출에 의해 *D. celebensis*에서 산화적 스트레스가 유도되었음을 의미하며, 이들 산화적 스트레스 지표의 변화는 세포 내에서 방어기전으로 작용하였음을 나타낸다. 본 연구는 *D. celebensis*에서 수은 독성의 분자 메커니즘을 이해하는데 도움이 되며, 중금속 오염된 해양 생태계 모니터링과 해양 생물의 건강성 평가에서 이들 분자지표의 활용 가능성을 제시한다.

Mercury (Hg) poses a threat to marine ecosystem due to continuous inflow from various industries and bioaccumulation to higher trophic level via food web. Mercury can adversely affect growth, development, reproduction and metabolism to aquatic organisms. In the present study, acute toxicity and oxidative stress markers (total glutathione content, and activities of GST, GR and GPx) were investigated in brackish water flea *Disphanosoma celebensis* exposed to HgCl₂ for 24 h. As results, Hg showed negative effect in survival of *D. celebensis*. 24 h-LC₅₀ value was determined as 0.589 mg/l (95% C.I. 0.521~0.655 mg/l). After exposure to Hg (0.08 and 0.4 mg/l) for 24 h, total glutathione content was significantly decreased, whereas GST, GPx and GR activities were enhanced. These findings indicate that Hg induced oxidative stress in *D. celebensis*, and oxidative stress markers may be involved in cellular defense against Hg - mediated toxicity. This study provides a better understanding of molecular mode of action of Hg toxicity in this specie and potent of molecular markers for heavy metal monitoring in marine ecosystem.

Keywords: Acute toxicity(급성독성), Antioxidant enzyme(항산화효소) *Diaphanosoma celebensis*, Mercury(수은), Oxidative stress(산화적 스트레스)

서론

수은은 자연계에 존재하며 환경 중에서 순환하는데, 화석연료의 연소과정 중에 방출되며 그 외 페인트, 전자기기, 펄프 산업,

의료 등 다양한 산업 분야에 사용되면서 환경 내로 지속적으로 유입되고 있다(Boening, 2000). 수은은 화학적 형태에 따라 금속 형태(Hg), 무기수은(HgCl₂), 유기수은(CH₃HgCl)로 분류하며, 환경 중으로 배출되는 수은의 형태는 대부분 금속원소 형태나 무기수

은 형태이다(Joe et al., 2018). 해양 환경 내로 유입되는 수은은 주로 인접한 육상을 통해 유입되어 퇴적물 내에 축적되어 미생물에 의해 독성이 강한 메틸수은(MeHg)으로 변형될 수 있으며(Domagalski, 2001; Valko et al., 2007), 해양 생물체 내에 축적되어 생리적, 생화학적 변이를 유발하여 성장, 생식, 대사 등에 영향을 미칠 수 있다(Coen et al., 2001; Kidd and Batchelar, 2012; Hudspith et al., 2017). 한반도 전 연안 표층퇴적물에 대한 수은의 분포 농도는 0.21~2,020 µg/kg(평균 68.8 + 230 µg /kg)으로 넓은 범위를 나타냈다(Joe et al., 2018).

수은과 같은 비필수금속(non-essential metal)은 redox active metals(예, 구리, 철 등)과 같이 직접적으로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하기 보다는 세포 내 -SH (thiol group)을 갖는 GSH나 단백질(e.g. 항산화 효소)을 공격하여 활성을 떨어뜨려 간접적으로 산화적 스트레스를 야기한다(Buchwalter, 2001; Rooney, 2007). 장기적인 산화적 스트레스는 세포 내 DNA, 단백질 및 지질의 산화를 유도하여 결과적으로 생물의 노화, 질병 및 죽음을 초래할 수 있다(Lushchak, 2011).

GSH는 비효소성 항산화물질로 -SH기를 통해 활성산소종이나 친전자성 대사산물 제거에 중요한 역할을 담당하기 때문에 세포 내에서 GSH의 양은 항산화 능력에 중요한 지표가 된다. GSH는 이러한 물질과 결합하며 산화형 GSSG 형태로 바뀌고 다시 glutathione reductase (GR)에 의해 환원형 GSH의 형태로 변환된다. GSH는 또한 친전자성 물질의 제거에 관여하는 glutathione S-transferase (GST)와 과산화수소(H₂O₂)의 제거에 관여하는 glutathione peroxidase (GPx)의 기질로 사용될 수 있어 세포 내 활성산소종 및 친전자성 물질이 지속적으로 유지될 경우 GSH 양의 감소를 유발하여 세포의 항산화 효율이 감소될 수 있다. 따라서 GSH 및 GSH 관련 효소의 활성 변화는 다양한 생물에서 산화적 스트레스에 대한 지표로 사용되어 왔다(Valavanidis et al., 2006).

무척추 생물은 해양 생태계 내에서 1차 소비자로서 에너지 전달자로, 특히 수은과 같이 생물농축되어 먹이사슬 상위 포식자에게 전달되는 물질을 생태계 내에 전파하는데 주요 역할을 담당한다. 그럼에도 불구하고 수은에 대한 독성은 주된 인간의 식량원인 어류와 대형 갑각류에 집중되어 있고, 반면 해양 무척추 생물에 대해서는 일부 이매패류(Chen et al., 2013)와 요각류(Lee et al., 2017) 등에서만 일부 보고되어 있다.

지각목(Cladocera)은 다양한 물질에 대한 독성 평가에 주로 사용되어 왔다(Freitas and Rocha, 2011). 특히 지각목의 대표종인 담수산 물벼룩(*Daphnia magna*)는 다양한 화학물질에 대한 민감성 때문에 생태독성평가의 모델종으로 사용되어 왔다(Poynton et al., 2007; Jemec et al., 2016). 그러나 해양 환경을 평가할 수 있는 생물종은 상대적으로 부족한 실정이다. 현 연구에서 사용된 기수산 물벼룩 *Diaphanosoma celebensis*는 지각목에 속하며 태평양 연안에 열대지역에 분포하고 광염성을 나타내어 연안 생태계 모니터링을 위한 모델 종으로 적합하다(Korovchinsky, 1989). 또한 생활사

가 짧고, 실험실 내에서 사육이 용이하며, 단성생식으로 유전적 동일성이 높아 독성 실험에 적합한 종이다(Marcial and Hagiwara, 2007). 최근 *D. celebensis* 전사체 분석 결과 담수산 물벼룩 *D. magna*와 유전자 정보의 유사성이 매우 높은 것으로 나타나 향후 유전자 수준에서의 다양한 연구에 활용 가능하다고 판단된다(Kim et al., 2018).

따라서 본 연구에서는 기수산 물벼룩 *D. celebensis*에 무기수은을 처리하여 급성 독성을 조사하였고, 총 glutathione 함량 및 GSH 관련 효소들(GR, GST, GPx)의 활성을 측정하였다. 본 연구의 목적은 수은에 대한 산화적 스트레스 기전을 분자적 수준에서 이해하고자 하며, 수은 오염에 대한 모니터링을 위한 분자 마커로서 이들 유전자의 활용성을 평가하는 것이다.

재료 및 방법

1. 배양

기수산 물벼룩 *D. celebensis*는 한국해양과학기술원 이균우 박사에게 분양 받아 상명대학교 유전학 실험실에서 배양되고 있는 것을 사용하였다. 배양 조건은 여과된 15 psu 인공해수에서, 25°C, 12시간:12시간의 광주기를 유지하였다. 배양수 1 ml당 1개체가 되도록 하며, 배양 먹이는 *Chlorella vulgaris*를 4.0×10^7 cells/l씩 일주일에 3회 제공하였다.

2. 수은 노출 실험

모든 시약은 분자생물학 등급을 사용하였으며 특별한 언급이 없는 한 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mo, USA)으로부터 구입하였다. 수은의 stock solution (1 g/l)은 HgCl₂를 증류수에 녹여서 제조하였다. 아치 농도를 결정하기 위하여 OECD 가이드라인 TG202 (OECD, 2004)에 따라 일부 수정하여 급성독성시험을 실시하였다. 각각 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/l 농도의 수은이 포함된 배지를 넣은 6-well plate에 *D. celebensis* 성체를 농도당 5마리씩 넣고 24시간 노출시켰고, 모든 실험은 4반복(총 20개체/농도)으로 수행하였다. 이때 10초간 움직이지 않는 개체를 죽은 것으로 간주하였다. 대조군의 사망률은 5%를 넘지 않았다. 결과 값으로부터 ToxRat™ Professional software를 이용하여 lethal concentration (LC) values와 95% 신뢰구간을 결정하였다. 항산화물질의 분석을 위하여 상기 결과를 토대로 수은의 처리 농도는 LC₁₀과 1/5 LC₁₀으로 선정하였다.

3. 총 glutathione 함량 분석

총 glutathione 함량은 OxiSelect™ Total Glutathione (SSG/GSH) assay kit (Cell Biolabs, INC, USA)를 사용하여 측정하였다. *D. cele-*

bensis 성체 300마리에 HgCl_2 를 0.08과 0.4 mg/l를 24시간 처리한 후 모아 차가운 5% metaphosphoric acid (MPA)에 넣어 균질화 한 시료를 원심분리하여 상층액만 모아 분석에 사용하였다. Glutathione reductase와 NADPH를 추가한 후 VersaMax ELISA Microplate Reader (molecular Devices, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 glutathione 함량은 glutathione standard curve를 통해 계산하였고, 대조군에 상대적인 값으로 표시하였다.

4. GSH-related antioxidant enzyme activity 분석

GR 활성은 GR activity assay kit (BioVision, USA), 그리고 GPx 활성은 GPx colorimetric activity assay kit (BioVision, USA)를 사용하여 분석하였다. *D. celebensis* 성체 300마리에 Hg를 0.08과 0.4 mg/l를 24시간 처리한 후 모아 assay buffer를 넣고 균질화 균질화 한 시료를 원심분리하여 상층액만 모아 분석에 사용하였다. GR 분석의 경우 상층액을 3% H_2O_2 와 혼합한 후 5분간 incubation 시켰다. 이후 catalase를 추가 처리한 후 다시 5분간 incubation 시켜 준비하였다. 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)를 기질로 사용하였다. GPx 분석을 위해 상층액을 NADPH, GR, GSH와 혼합한 후 15분간 incubation 시켜 준비하였다. Cumene Hydroperoxide 용액을 GPx 반응을 개시하기 위해 추가하였다. 반응은 VersaMax ELISA Microplate Reader (molecular Devices, USA)를 사용하여 GST와 GPx는 340 nm, GR은 405 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다.

5. 통계 분석

데이터는 3반복의 평균 \pm 표준편차(S.D.)로 나타내었다. 상대적인 활성의 차이는 Turkey's test 후 one-way analysis of variance (one-way ANOVA)으로 비교하였다. 통계 분석은 PASW statistics 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하였고, 0.05보다 낮은 p 값을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 수은의 급성 독성

본 연구에서는 수은에 24시간 노출된 기수산 물벼룩 *D. celebensis*에서 생존률이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 이를 토대로 24 h-LC₅₀ 값은 0.589 mg/l (95% C.I.: 0.521~0.655 mg/l)였고, 24 h-LC₁₀ 값은 0.406 mg/l (95% C.I.: 0.260~0.481 mg/l)로 계산되었다. 이를 토대로 항산화물질의 함량 및 활성 분석을 위한 수은의 노출 농도는 LC₁₀ 값과 1/5 LC₁₀ 값으로 결정하였다.

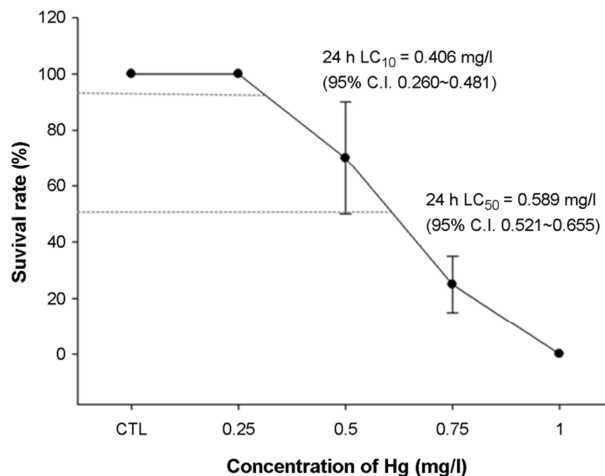


Fig. 1. Survival rate (%) of adult *Diaphanosoma celebensis* exposed to HgCl_2 (0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 mg/l) for 24 h. 24h-LC₁₀ and LC₅₀ values, and 95% confidence interval (C.I.) were determined by ToxRat™ Professional software.

2. 수은 노출에 의한 항산화물질의 함량 및 활성 변화

수은에 24시간 노출한 *D. celebensis*에서 총 glutathione의 함량은 대조군과 비교하여 실험군에서 유의하게 감소하는 양상을 보였다($p < 0.05$; Fig. 2A). GR 활성의 경우 0.4 mg/l 수은 처리 그룹에서 유의하게 증가되었다($p < 0.05$; Fig. 2B). GST 활성의 경우 0.08 mg/l의 수은을 처리했을 때 약 2.5배 가량 유의하게 증가하는 양상을 보였다($p < 0.05$; Fig. 2C). 한편 GPx 활성은 0.08 mg/l에서 약간 증가하였으나 통계적으로 유의한 결과를 얻지 못했다($p > 0.05$; Fig. 2D).

고 찰

수은은 인간의 활동을 통해 환경 내로 끊임없이 유출되고 있어 그 위험성으로 인해 국제협약을 통해 수은 사용 및 제조에 대한 규제를 강화하였지만 환경 내에서 지속적으로 검출되고 있다 (Klaassen et al, 1986; NIER, 2016). 인간에 대한 수은 독성의 관심이 높아 수서 생물의 경우 어류와 갑각류 등의 영향 연구에 주로 집중되었다. 그러나 해양 생태계에서 먹이 생물이 중요한 역할을 담당하는 동물플랑크톤에 대한 수은의 독성 작용 메커니즘에 대한 연구는 상대적으로 부족한 실정이다.

본 연구에서 무기수은을 기수산 물벼룩에 24시간 노출시킨 결과 LC₅₀ 값은 0.589 mg/l로 나타났다(Fig. 1). 다양한 수서 무척추동물의 수은에 대한 LC₅₀ 값을 Table 1에 비교하였다. 대부분의 보고된 갑각류(Crustacean)의 경우 성체는 3,300~10,000 $\mu\text{g/l}$ (48 h

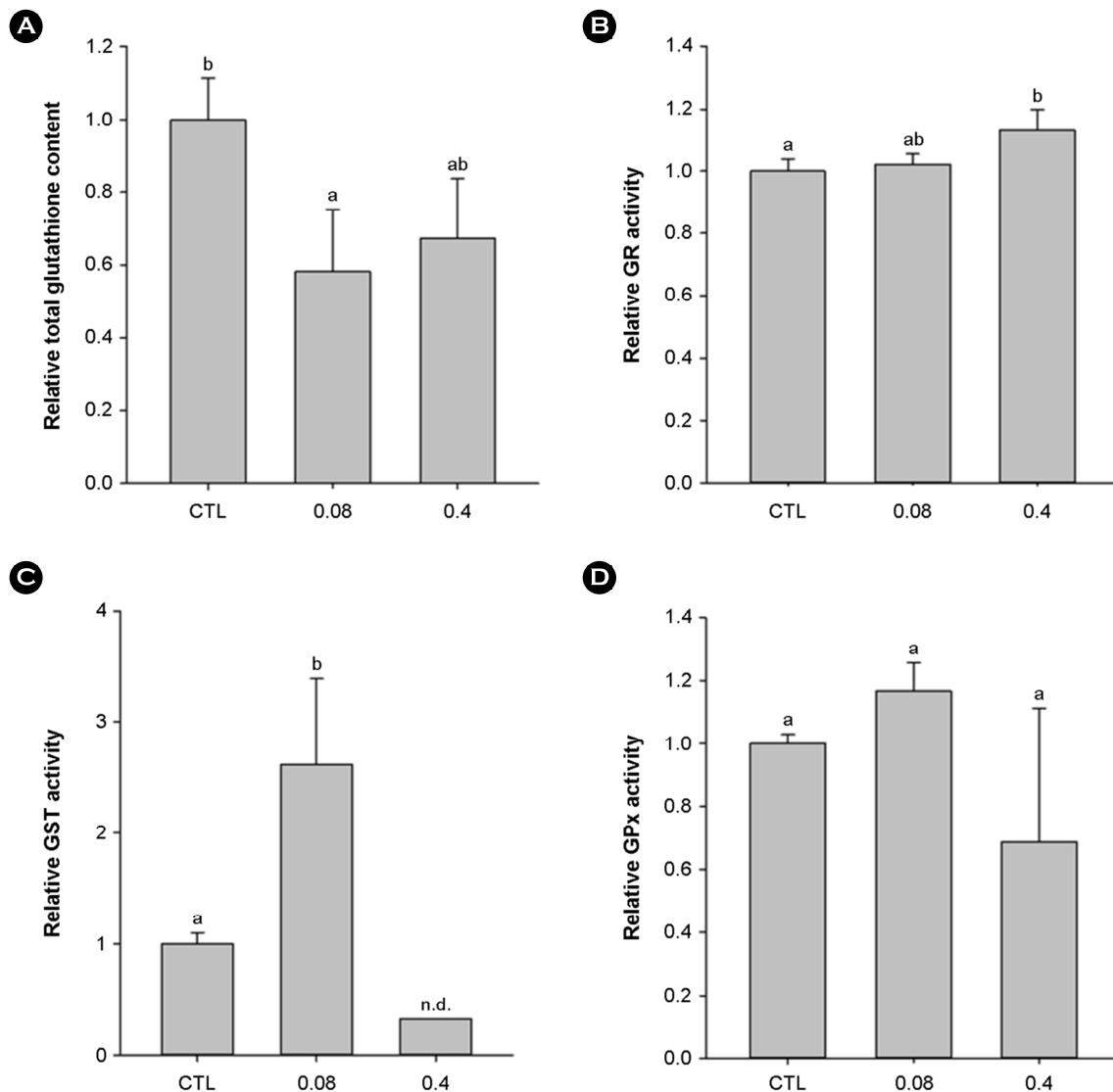


Fig. 2. Modulation of oxidative stress markers in *Diaphanosoma celebensis* exposed to HgCl_2 (0.08 and 0.4 mg/l) for 24 h. (A) total glutathione content, (B) GR activity, (C) GST activity, and (D) GPx activity. Data are shown as means \pm S.D. of three replicates. Significant differences between different concentrations were determined by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Turkey's test, and are indicated using lowercase letter. n.d. (not detected).

LC_{50} ; Brown shrimp), 930~2,200 $\mu\text{g/l}$ (24 h LC_{50} ; Crab) 등으로 다양한 범위를 보였다(WHO, 1989). 또한 Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)의 96 h LC_{50} 값도 1.23 mg/l로 (Frias-Espicueta et al., 2001) 다소 크기가 큰 종들에 비해서는 *D. celebensis*의 수은에 대한 민감도가 상대적으로 더 높았다. 해양 요각류인 *Calanoid copepod*에 속하는 *Calanus glacialis*와 *C. finmarchicus*의 수은에 대한 48시간 LC_{50} 값은 각각 73.7 $\mu\text{g/l}$ 와 72.4 $\mu\text{g/l}$ 로 나타났다 (Øverjordet et al., 2014). Verslycke et al. (2003)은 해양에 분포하는 mysid *Neomysis integer*와 *Americamysis bahia*에 대한 수은의

96시간 LC_{50} 값을 각각 6.9 $\mu\text{g/l}$ 와 3.5 $\mu\text{g/l}$ 로 보고하였다.

한편 서로 다른 조건에서 12~55 $\mu\text{g/l}$ 의 24시간 반수치사농도를 보인 같은 지각류(Cladoceran)에 속하는 담수종인 *Daphnia magna* 보다는 민감도가 낮았다(Tsui and Wang, 2006). 또 다른 Cladoceran에 속하는 담수종 4종(*Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia laevis*, *D. pulex*, *D. similis*)들의 수은 민감도를 비교한 Sarma와 Nandini (2006)에 따르면, 수은에 대한 24시간 LC_{50} 값이 가장 높은 종은 *D. laevis*로 neonate에서 약 20 $\mu\text{g/l}$, adult에서 약 40 $\mu\text{g/l}$ 를 보였으며 4종에서 모두 발생 단계에 따른 민감도의 차이를 보였다.

Table 1. LC₅₀ values (µg/l) of HgCl₂ for aquatic invertebrates

Species	Exposure time, developmental stage	LC ₅₀ value	Reference
Pink shrimp (<i>Pandalus montagu</i>)	48 h, adult	75	WHO (1989)
Brown shrimp (<i>Crangon crangon</i>)	48 h, adult	3,300~10,000	WHO (1989)
Whiteleg shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	96 h, postlarvae	1,230	Frias-Espéricueta et al. (2001)
Hermit crab (<i>Pagurus longicarpus</i>)	24 h, adult	2,200	WHO (1989)
Crab (<i>Scylla serrata</i>)	24 h, adult	930	WHO (1989)
Copepod (<i>Calanus glacialis</i>)	48 h, Copepodite stage V	73.7	Øverjordet et al. (2014)
Copepod (<i>Calanus finmarchicus</i>)	48 h, Copepodite stage V	72.4	Øverjordet et al. (2014)
Mysid (<i>Neomysis integer</i>)	96 h, Juvenile	6.9	Verslycke et al. (2003)
Mysid (<i>Americanysis bahia</i>)	96 h, Juvenile	3.5	Verslycke et al. (2003)
Cladoceran (<i>Diaphanosoma celebensis</i>)	24 h, adult	589	This study
Cladoceran (<i>Daphnia magna</i>)	24 h	12.4~54.7	Tsui and Wang (2006)
Cladoceran (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	24 h, neonates 24 h, adult	≈ 5 ≈ 8	Sarma and Nandini (2006)
Cladoceran (<i>Daphnia laevis</i>)	24 h, neonates 24 h, adult	≈ 17 ≈ 42	Sarma and Nandini (2006)
Cladoceran (<i>Daphnia pulex</i>)	24 h, neonates 24 h, adult	≈ 7 ≈ 13	Sarma and Nandini (2006)
Cladoceran (<i>Daphnia similis</i>)	24 h, neonates 24 h, adult	≈ 9 ≈ 30	Sarma and Nandini (2006)

상기 결과는 급성 독성 실험의 노출 시간, 배양 조건, 그리고 실험 방법 등의 차이를 보여 직접적인 비교를 하기는 어렵지만, 수온에 대한 민감도는 종, 개체의 크기, 발생 단계, 배양 환경, 노출 조건 등에 따라 다양하게 나타날 수 있음을 나타낸다(Boening, 2000; Tsui and Wang, 2006). 이는 해양 환경에 존재하는 수온에 대한 영향을 평가하는데 있어 다양한 종과 발생 단계를 포함하는 연구가 다각적으로 필요하다는 것을 의미한다.

수온과 같이 생물체 내로 유입되어 산화적 스트레스를 유발하는 환경오염물질에 대한 방어 메커니즘으로 생물체는 다양한 항산화 방어 시스템을 진화적으로 발전시켜 왔다. Redox inactive metal인 수은은 세포 내에서 sulfhydryl 기(-SH)를 갖는 GSH 및 항산화 효소와 결합하여 이들의 방어 기작을 방해하는 것으로 알려져 있다(Buchwalter, 2001). 본 연구 결과에서는 24시간 아치사 농도의 수온에 노출된 *D. celebensis*에서 총 glutathione 함량은 감소한 반면, GR와 GST 활성은 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2). 그러나 glutathione 함량과 GSH-related antioxidant enzymes의 활성은 항상 일관된 양상을 보이지는 않는 것 같다. 예를 들어, 수온에 노출

된 golden grey mullet (*Liza aurata*)에서는 총 glutathione 함량과 GPx, GR, 그리고 GST의 활성이 모두 유의하게 감소했다(Mieiro et al., 2010). 저자들은 이에 대해 수온이 항산화 시스템을 저해함으로써 *L. aurata*의 뇌에서 나타나는 신경 독성을 유발했을 것으로 추측하였다. 특히 본 연구에서 총 glutathione 함량의 감소는 수온의 타겟이 -SH기를 갖는 분자라는 점과 일치하는 결과라고 판단되며, 추가적인 요인으로 glutathione을 기질로 사용하는 GST 활성의 증가가 glutathione 함량의 고갈에 기여했을 것이라 생각된다. 또한 glutathione의 감소는 사용된 환원형 glutathione을 회복하기 위해 GR 활성을 증가시켰을 것으로 보인다.

반면, 수온을 96시간 노출시킨 crab *Carcinus maenas* (Elumalai et al., 2007)에서 GST 활성이 유의하게 증가하였고, tropical freshwater fish *matrinxã*에서는 GSH 함량이 증가하였다(Monteiro et al., 2010). 한편, 48시간 노출시킨 *D. magna*에서도 총 GSH 함량과 GST 활성이 모두 유의하게 증가하는 양상을 보였다(Kim et al., 2017). 특히 이들은 48시간 수온 처리 농도(0.08과 2 µg/l)에서 모두 활성산소 수준이 유의하게 감소하는 양상을 보고하였다. 이

러한 결과와 관련하여 저자들은 세포 내 GSH:GSSG 비율의 균형을 유지하기 위해 GSH가 증가한 것으로 보이며(Monteiro et al., 2010), GSH 함량과 GST 활성의 증가는 ROS 수준을 감소시키는데 관여했을 것이라 제시하였다(Kim et al., 2017). 상기 결과들을 토대로 수은에 대한 GSH와 GSH 관련 항산화 효소의 관계는 수은에 대한 종의 민감도와 실험 조건의 차이 등에 따라 서로 다른 결과를 나타낼 수 있는 것으로 판단된다.

본 연구에서는 기수산 물벼룩 *D. celebensis*에 수은을 노출시킨 결과 생존율에 영향을 미쳤으며 이를 토대로 수은 노출에 따른 24시간 반수치사농도를 결정하였다. 아치사 농도의 수은 처리 후 총 glutathione 함량은 감소하는 경향을 보였고, GST와 GR의 활성은 증가되는 양상을 보였다. 결과에서 산화적 스트레스 지표의 변화는 수은 노출에 의해 *D. celebensis*에서 산화적 스트레스가 유발되었음을 의미하며 이들 항산화물질이 세포 내에서 방어기전으로 작용하였음을 나타낸다. 또한 이러한 분자 지표는 수은과 같은 중금속에 오염된 해양 생태계의 생물 건강성을 평가하는데 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Boening DW. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40: 1335-1351.
- Buchwalter DB. 2001. Metals. in *Molecular and Biochemical Toxicology* (eds Smart, R. C. & Hodgson, E.) 413-439 (Wiley, USA).
- De Coen WM, Janssen CR, Segner H. 2001. The Use of Biomarkers in *Daphnia magna* Toxicity Testing V. *In Vivo* Alterations in the Carbohydrate Metabolism of *Daphnia magna* Exposed to Sublethal Concentrations of Mercury and Lindane. *Ecotoxicol Environ Saf* 48: 223-234.
- Chen L, Chen J, Ren Z. 2013. Tissue-specific effect of mercury on antioxidant defense system and protective role of selenium on mercury-induced oxidative stress in blue mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819). *Fresenius Environ Bull* 22: 1831-1836.
- Domagalski J. 2001. Mercury and methylmercury in water and sediment of the Sacramento River Basin, California. *Appl Geochem* 16: 1677-1691.
- Elumalai M, Antunes C, Cuilhermino L. 2007. Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. *Chemosphere* 66: 1249-1255.
- Freitas EC, Rocha O. 2011. Acute Toxicity Tests with the Tropical Cladoceran *Pseudosida ramosa*. The Importance of Using Native Species as Test Organisms. *Arch Environ Contam Toxicol* 60: 241-249.
- Frias-Espicueta MG, Voltolina D, Osuna-Lopez JL. 2001. Acute toxicity of cadmium, mercury, and lead to whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Bull Environ Contam Toxicol* 67: 580-586.
- Hudspith M, Reichelt-Brushett A, Harrison PL. 2017. Factors affecting the toxicity of trace metals to fertilization success in broadcast spawning marine invertebrates: A review. *Aquat Toxicol* 184: 1-13.
- Jemec A, Horvat P, Kunej U, Bele M, Kržan A. 2016. Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environ Pollut* 219: 201-209.
- Joe D, Choi M, Kim C. 2018. Distribution of total mercury in Korean coastal sediments. *J Korean Soc Oceanogr* 23: 76-90.
- Kidd K, Batchelar K. 2012. Mercury. in *Fish Physiology-Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals* 2nd Edn (eds Wood, C. M., Farrell, A. P. & Brauner, C. J.) 238-284 (Elsevier, Netherlands).
- Kim BM, Kang S, Kim RO, Jung JH, Lee KW, Rhee JS, Lee YM. 2018. De novo transcriptome assembly of brackish water flea *Diaphanosoma celebensis* based on short-term cadmium and benzo[a]pyrene exposure experiments. *Hereditas* 155: 36. <https://doi.org/10.1186/s41065-018-0075-3>
- Kim H, Kim JS, Lee YM. 2017. Changes in Activity and Transcription of Antioxidant Enzymes and Heat Shock Protein 90 in the Water Flea, *Daphnia magna* - Exposed to Mercury. *Toxicol Environ Health Sci* 9: 300-308.
- Klaassen CD, Amdur MO, Doull J. 1986. *Toxicology, III ed. The Basic Science of Poisons*, Macmillan, New York, NY.
- Korovchinsky NM. 1989. Redescription of *Diaphanosoma celebensis* Stingelin, 1900 (Crustacea, Cladocera). *Hydrobiologia* 184: 7-22.
- Lee YH, KIM DH, Kang HM, Wang M, Jeong CB, Lee JS. 2017. Adverse effects of methylmercury (MeHg) on life parameters, antioxidant systems, and MAPK signaling pathways in the rotifer *Brachionus koreanus* and the copepod *Paracyclopina nana*. *Aquat Toxicol* 190: 181-189.
- Lushchak VI. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101: 13-30.
- Marcial HS, Hagiwara A. 2007. Multigenerational effects of 17β-estradiol and nonylphenol on euryhaline cladoceran *Diaphanosoma celebensis*. *Fish Sci* 73: 324-330.
- Mieiro CL, Ahmad I, Pereira ME, Duarte AC, Pacheco M. 2010. Antioxidant system breakdown in brain of feral golden grey mullet (*Liza aurata*) as an effect of mercury exposure. *Eco-*

- toxicology 19: 1034-1045.
- Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin A. 2010. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology* 19: 105-123.
- National Institute of Environmental Research (NIER). 2016. Introduction of Minamata Convention on Mercury. NIER.
- OECD. 2004. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on biotic systems: Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute immobilization test. OECD publishing.
- Øverjordet IB, Altin D, Berg T, Jenssen BM, Gabrielsen GW, Hansen BH. 2014. Acute and sub-lethal response to mercury in Arctic and boreal calanoid copepods. *Aquat Toxicol* 155: 160-165.
- Poynton HC, Varshavsky JR, Chang B, Cavigliolo G, Chan S, Holman PS, Loguinov AV, Bauer DJ, Komachi K, Theil EC, Perkins EJ, Hughes O, Vulpe CD. 2007. *Daphnia magna* Ecotoxicogenomics Provides Mechanistic Insights into Metal Toxicity. *Environ Sci Technol* 41: 1044-1050.
- Rooney JPK. 2007. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology* 234: 145-156.
- Sarma SSS, Nandini S. 2006. Review of Recent Ecotoxicological Studies on Cladocerans, *J Environ Sci Health B* 41: 1417-1430.
- Tsui MT, Wang W-X. 2006. Acute toxicity of mercury to *Daphnia magna* under different conditions. *Environ Sci Technol* 40: 4025-4030.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64: 178-189.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
- Verslycke T, Vangheluwe M, Heijerick D, Schamphelaere KD, Sprang PV, Janssen CR. 2003. The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. *Aquat Toxicol* 64: 307-315.
- World Health Organization (WHO) 1989. Mercury-Environmental Aspects. WHO, Geneva, Switzerland.