

중견연구 최종보고서

① 부처사업명(대)	기초연구사업	보안등급(보안, 일반)	일반					
② 사업명(중)	중견연구	공개가능여부(공개, 비공개)	공개					
③ 세부사업명(소)	중견연구							
④ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초	④-1 실용화 대상여부(실용화, 비실용화)	비실용화					
⑤ 연구개발과제명	국문	유기염색질 흡착제 개발을 위한 선택적 흡착과 비선택적 장내 마이크로바이옴의 상관관계 및 분자적 기작 규명						
	영문	Influence of organic polymers adsorbed-microbiota on microbiome in the marine media <i>Oryzias latipes</i>						
⑥ 주관연구개발기관	한국해양과학기술원							
⑦ 연구책임자	성명	강혜민	직급(직위) 선임연구원					
	소속부서	해양자원본부 해양생명공학연구센터	전공 이학					
⑧ 연구개발비 및 참여연구원수 (단위: 천원, M·Y)								
연도	정부지원 연구개발비 (A)	기업체부담금			정부외 출연금 (B)	상대국 부담금 (F)	합계 G=(A+B+E)	참여 연구원수
		현금 (C)	현물 (D)	소계 E=(C+D)				
1년차	10,000			0			10,000	3
2년차	10,000			0			10,000	1
3년차	10,000			0			10,000	1
4년차				0			0	
5년차				0			0	
합계	30,000	0	0	0	0	0	30,000	5
⑨ 총연구개발기간	2019. 03. 01 ~ 2022. 02. 28 (36개월)							

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재 처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 03월 28일

연구책임자 : 강혜민

주관연구개발기관의 장 : 김웅서

과학기술정보통신부장관 귀하

※ 전자접수이므로 연구책임자 및 주관연구개발기관의 장 서명(인, 직인)은 생략

〈 연구결과 요약문 〉

연구개요	본 과제에서는 마이크로바이옴분석을 기반으로 유기오염원 흡착 미세플라스틱에 의해 유발되는 바다송사리 (<i>Oryzias melastigma</i>)의 미생물 조성변화에 대한 연구와 변화된 장내미생물의 조성에 따른 물리적, 생리적 이상과 분자적 기작에 대한 연구를 수행함					
연구 목표대비 연구결과	<p>1) 유기오염원의 미세플라스틱 흡착 재현 및 독성평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미세플라스틱과 유기오염원의 흡착 방법 및 섭취 가능 여부 확인 - 미세플라스틱 처리에 따른 생체지표 영향 확인 - 조직학적 분석을 통한 물리적손상과 면역학적 손상을 확인 - 마이크로바이옴 분석을 위한 바다송사리 시료 실험조건 확립 <p>2) 바다송사리 장내의 미생물 조성 변화 분석 기법 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 16s rRNA sequencing 분석을 통해 변화된 장내 미생물 조성 파악 - 산화적 스트레스 및 장내 불균형 관련 생화학 지표와 조직형태학적 영향 파악 <p>3) 마이크로바이옴 분석을 바탕으로 흡착미세플라스틱 분자반응 기작 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 흡착율과 노출영향평가를 통해 상승된 독성기전 확인 - 처리 시 변화되는 대사산물과 관련 미생물 규명 - 처리 시 장내불균형에 따른 분자신호전달 기작 확인 					
연구개발성과의 활용 계획 및 기대효과 (연구개발결과의 중요성)	<p>1) 미세플라스틱 독성평가의 선구적 역할수행</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미세플라스틱의 위해성 평가 및 메커니즘 분석은 수많은 연구를 통해 규명되었지만, 미세플라스틱을 매개체로 하는 유기오염물질과 미세플라스틱의 동반독성영향의 경우 명확한 메커니즘이 알려지지 않았기에 장내 미생물 변화를 활용한 동반독성영향평가 방법을 제시 <p>2) 해양어류에 장내 미생물 데이터베이스 구축 및 미생물 새로운 기능 도출</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존 모델생물종인 zebrafish 및 일부 담수 어류에 한정적으로 구축된 어류 미생물 데이터베이스를 기반으로 해양어류의 데이터베이스 구축에 정보 제공이 용이하며 이를 통해 마이크로바이옴 영역을 해양으로 넓히고 보다 다방면의 분석이 가능해질 것으로 예상하며, 유의하게 변화된 미생물 자료를 제공함으로써 새로운 기능을 가진 미생물 연구에 도움을 줄 수 있음 <p>3) 독성평가 지표로서의 활용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 마이크로바이옴 변화를 독성 지표의 endpoint로 설정함으로써 실제 환경농도 기반의 낮은 독성에 대한 영향평가가 가능해질 것으로 사료되며 독성발현경로 구축의 cellular level에서의 연구에 새로운 방향 제시가 가능함 <p>4) 멀티오믹스 활용</p> <p>장내 미생물 군집 변화와 대사체의 상관관계 분석 자료를 제공함으로써 멀티 오믹스 측면의 활용이 가능하며, 해양 생물에 활용 가능한 분석방법을 제시</p>					
중심어	국문	바다송사리	마이크로바이옴	유기오염원	미세플라스틱	대사체
중심어	영문	Marine medaka	Microbiome	Organic pollutant	Microplastics	Metabolome

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	04
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용	04
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	05
4. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도	14
5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	15
6. 참고문헌	15
<붙임1 세부 정량적 연구개발성과>	16
<붙임2 연구책임자 대표적 연구실적 및 증빙(요약문 및 사본)>	17
<붙임3 연구개발성과 활용계획서>	28

1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발의 최종목표

마이크로바이옴(microbiome)분석을 기반으로 유기오염원 흡착 미세플라스틱에 의해 유발되는 바다송사리(*Oryzias melastigma*)의 미생물 조성의 변화에 대해 연구하고, 변화된 장내 미생물의 조성에 따른 물리적, 생리적 이상에 대한 연구 진행 및 분자 기작 규명

2) 연구개발의 필요성 및 범위

- **필요성:** 미세플라스틱의 주요 노출 경로가 섭취를 통한 장내 농축임에도 불구하고 장내 마이크로바이옴 연구, 특히 유기오염물질을 흡착한 미세플라스틱에 대한 장내 미생물 변화에 따른 생리학적 영향과 위해성 평가에 대한 연구가 미비함

- **범위:**

연차별	주요 연구 목표	연구 범위
1차년도	유기오염물질의 미세플라스틱 흡착 재현 및 독성평가	- 미세플라스틱의 유기오염물질 흡착 방법 규명 - 유기오염원 종류 선정 - 유기오염원 및 미세플라스틱 노출 영향 평가 수행 - 바다송사리의 조직화학적 분석을 통한 비교 독성 평가 진행
2차년도	바다송사리 장내의 미생물 조성 변화 분석 기법 구축	- Phylum/Genus level에서의 바다송사리 장내 미생물 변화 측정
3차년도	마이크로바이옴 분석을 바탕으로 흡착미세플라스틱의 분자 반응 기작 연구	- 유기오염원의 대사산물 분석 및 관련 미생물 규명 - 흡착미세플라스틱 노출에 따른 장내불균형에 대한 분자신호전달 기작 구축

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

[1차년도]

- 연구를 수행하기 위해 바다송사리를 실험생물종으로 섭취가능여부의 플라스틱 사이즈를 문헌조사를 통해 선정하고, 선정된 2가지 사이즈인 미세플라스틱 0.05µm와 45µm의 섭취 가능 여부를 확인함
- 사이즈의 따른 미세플라스틱 영향을 평가하기 위해 2주간 플라스틱 처리 후 생체지표와 조직학적 분석을 수행함
- 마이크로바이옴 분석을 위해 기본적인 실험조건 확립과 시퀀싱 분석을 위해 예비실험을 수행함

[2차년도]

- 두 종류의 사이즈인 미세플라스틱 0.05 μm 와 45 μm 를 각각 2주간 처리 후 마이크로바이옴 분석을 위해 장과 간 조직을 각각 샘플링 진행함
- 16s RNA sequencing 기법을 활용하여 마이크로바이옴 분석을 수행하고 R 소프트웨어와 통계 프로그램을 활용하여 데이터를 해석함
- 생리학적 영향을 확인하기 위해 장에서는 형태학적 및 생화학적 분석을 수행하였으며, 추가적으로 간에서 산화적 스트레스 지표를 확인함
- 산화적 스트레스 지표는 활성산소종 및 항산화 관련 효소로 실험을 진행하였으며, 장내 불균형을 위한 생화학적 지표로는 장내 미생물의 대사와 장벽의 손상도를 측정할 수 있는 D-lactate와 Diamine oxidase(DAO)로 선정하여 실험 수행함

[3차년도]

- 유기오염원 흡착 미세플라스틱 영향을 알아보기 위해 유기오염원 흡착 미세플라스틱을 제조하여 노출영향평가를 수행함
- 16s RNA sequencing을 통해 장내 마이크로바이옴 분석을 수행하였으며, LC-MS/MS 분석을 통해 대사산물 분석을 수행함
- 흡착미세플라스틱 노출에 따른 장내 불균형에 대한 분자신호전달 기작 확인을 위해 장내미생물/대사체 분석을 바탕으로 유의미한 pathway를 분석하고자 함

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 수준

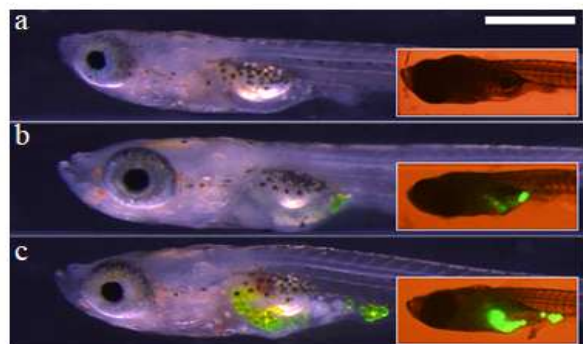
1) 정성적 연구개발성과(연구개발결과)

[1차년도]

■ 흡착을 규명하기 위한 사이즈 선정과 사이즈별 섭취여부 조사

-미세플라스틱의 영향을 평가하기 위해 나노사이즈인 0.05 μm 와 마이크로사이즈인 45 μm 플라스틱을 선정하여 섭취여부를 형광플라스틱을 사용하여 형광현미경 또는 일반현미경을 통해 관측함 (그림 1)

-섭취여부를 확인한 후, 바다송사리에서의 미세플라스틱 영향을 확인하기 위해 예비 실험 및 선행연구를 통해 농도 (환경기반의 농도: 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 노출기간 (2주)를 설정하여 장내의 농축된 기간별로 확인해 본 결과, 시간이 지남에 따라 농축된 미세플라스틱의 양이 증가하는 것을 확인함 (그림 2)



a: control, b: 0.05 μm , c: 45 μm ; bar=500 μm ; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

그림 1. 바다송사리의 크기별 미세플라스틱의 섭취

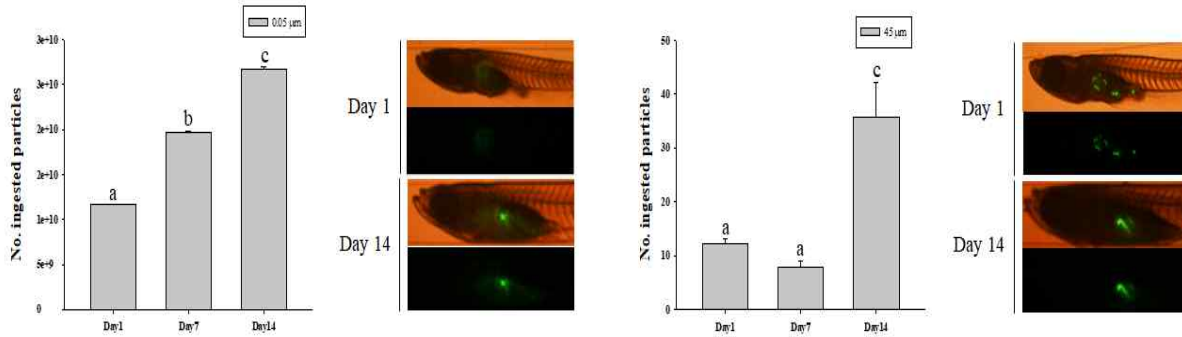


그림 2. 노출기간별 크기별 미세플라스틱 농축

■ 미세플라스틱 노출 영향 평가 수행

-미세플라스틱의 생체지표 영향을 확인하기 위해 노출기간별로 (1일, 7일, 14일) 샘플링 하여 성장지표인 몸의 길이와 무게를 측정한 결과 각 군의 유의적인 차이를 확인할 수 없었음 (그림 3)

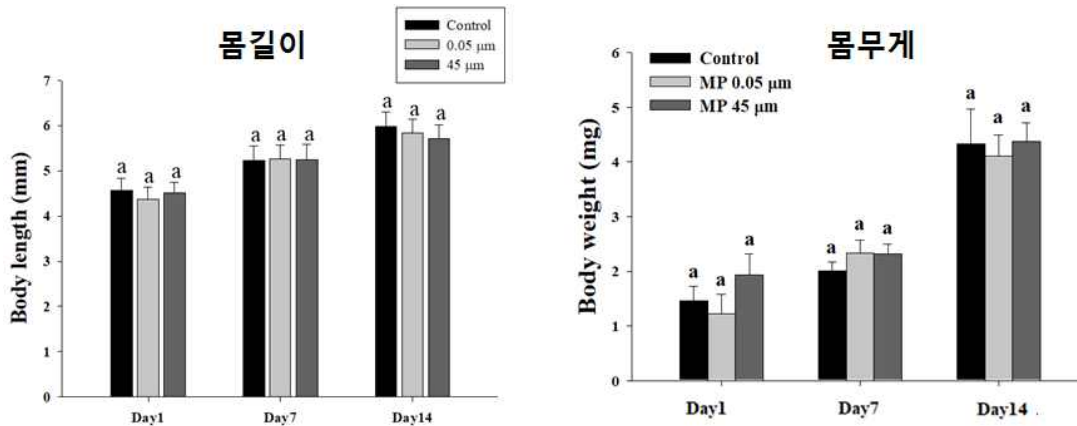


그림 3. 미세플라스틱 노출에 따른 바다 송사리 성장지표 (몸길이, 몸무게)

▶ 본 결과를 통해 미세플라스틱이 장내에 주로 농축되는 것을 확인하였지만 주된 영향평가 지표인 성장지표에서 어떠한 영향도 발견할 수 없었기에 장내 손상에 대한 조사가 필요하여 다음 실험을 수행함

■ 바다송사리의 조직화학적 분석을 통한 비교 독성평가 진행

-미세플라스틱의 주된 축적조직인 장의 조직화학적 분석을 진행하기 위해 H&E염색과 alcian blue (AB)-PAS 염색을 시행함. 장내 손상도를 확인하는 염색기법인 H&E염색 결과 대조군 대비 유의한 손상정도를 파악할 수 없었지만 반면에 면역이상을 확인할 수 있는 AB-PAS 염색의 경우 처리군에서 대조군에 대비하여 유의한 결과를 확인함 (그림 4)

▶ 본 결과를 통해 미세플라스틱과 장과의 상관관계가 있을 것이라는 가설을 세울 수 있으며 미세플라스틱을 처리하여 마이크로바이옴 분석 진행

■ 마이크로바이옴 분석을 위한 예비실험 진행

-바다송사리에서 마이크로바이옴 분석이 처음 시행되는 것이기 때문에 기본적인 실험조건 확립과 장내 미생물을 분포도를 확인하기 위해 예비실험을 진행함

-장내미생물의 실험의 경우 배양되는 조건이 가장 중요하기 때문에 처리시 같은 조건에서 여러 처리군을 두어 차이를 줄이려고 하였으며, 처리 전에 2주 이상의 안정화 기간이 필요한 것을 확인함

-대조군과 미세플라스티처리군을 3마리씩 샘플링 하여 DNA 추출을 진행한 후 마이크로바이옴을 분석한 결과 각 군간의 차이가 심하게 나타나는 것을 확인할 수 있었고 (그림 5), 추후 한마디 당의 마이크로바이옴을 5군씩 비교하는 조건을 확립함

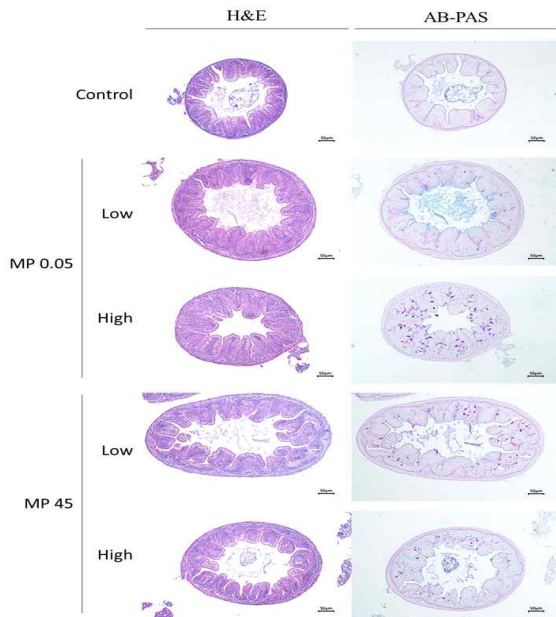


그림 4. 조직형태학적 분석

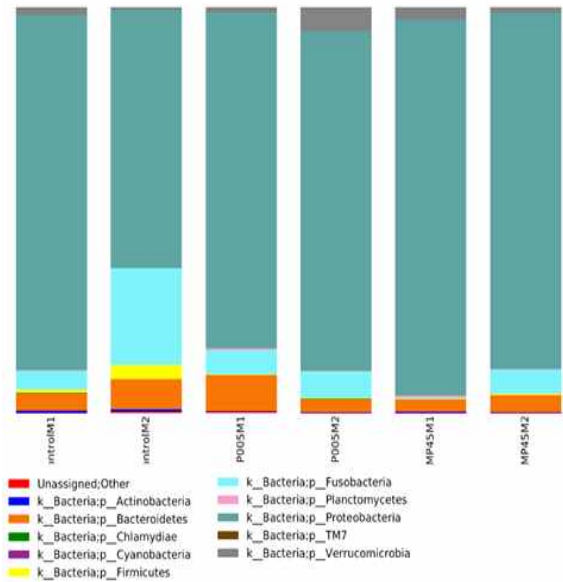


그림 5. 마이크로바이옴 예비실험결과

[2차년도]

■ 16s rRNA sequencing 을 통한 phylum level 및 genus level에서의 바다송사리 장내 미생물 변화 측정

- 바다송사리에 사이즈가 다른 두 종류의 미세플라스티크을 처리하여 16s rRNA sequencing을 수행함

- Chao1 및 Shannon에 대한 다양성 변화 분석 및 주성분 분석을 통해 각 군간 변화된 미생물을 확인하였으며, 플라스틱 처리군에서 미생물 군집 다양성 증가를 발견함 (그림 6)

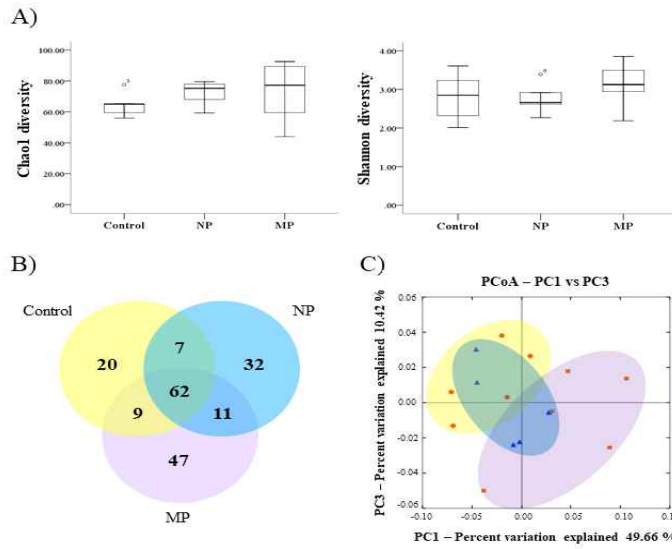


그림 6. 미생물 군집 다양성

- phylum level에서는 *Bacteroidetes*의 군간 유의한 감소를 확인하였으며, genus level에서는 6종 (*Vicinus*, *Shewanella*, *Lewinella*, *Pseudomonas*, *Thalassospira*, *Parahaliea*)의 유의한 증감을 확인하였음 (그림 7)

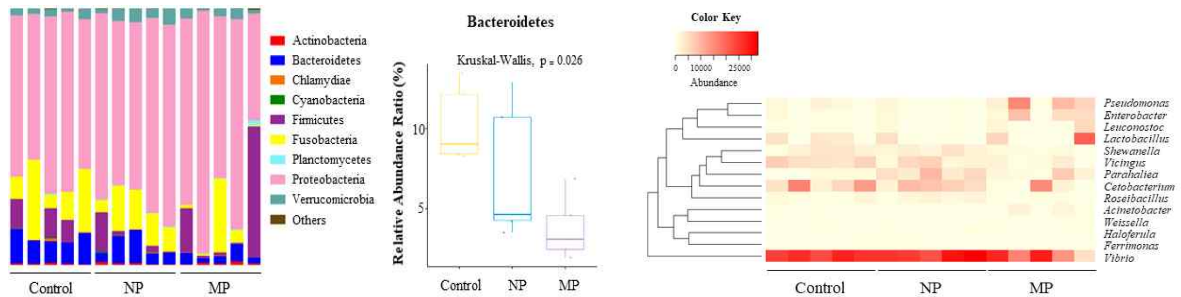


그림 7. Phylum level 및 genus level에서의 장내 조성 변화 및 발현량 추이

▶ 미세플라스틱 노출시 장내 미생물 군집 조성이 확인되었으며, 미세플라스틱 사이즈에 따라서도 유의한 차이를 보임

■ 산화적 스트레스 및 장내 불균형 관련 생화학 분석

- 장내 불균형 지표 분석 결과, 45 um의 경우, D-lactate와 DAO 수준이 다른 군에 비해 유의하게 증가하는 것을 확인함 (그림 8)

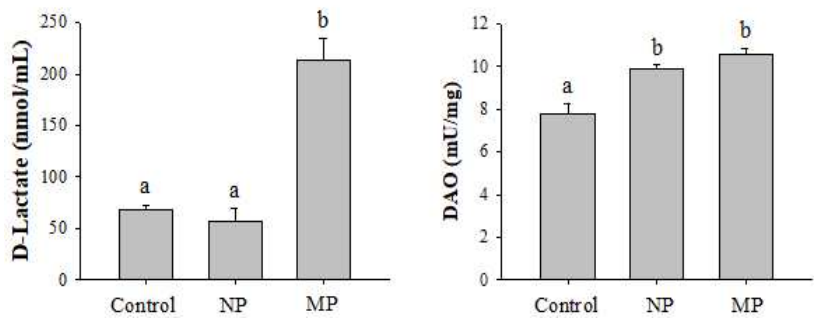


그림 8. 장내 불균형 지표

- 산화적 스트레스 지표 분석 결과, 0.05 um 사이즈의 미세플라스틱을 처리하였을 때 간과 장기관의 산화적 스트레스 마커 및 항산화 효소의 활성이 증가하는 것으로 확인되었으며, 이는 플라스틱 사이즈에 따른 다른 독성학적 메커니즘이 관여한다는 것을 의미함 (그림 9)

▶ 사이즈가 큰 미세플라스틱의 경우 장내 미생물 군집에 대한 영향을 주며 사이즈가 작을수록 산화적 메커니즘의 활성이 유도됨

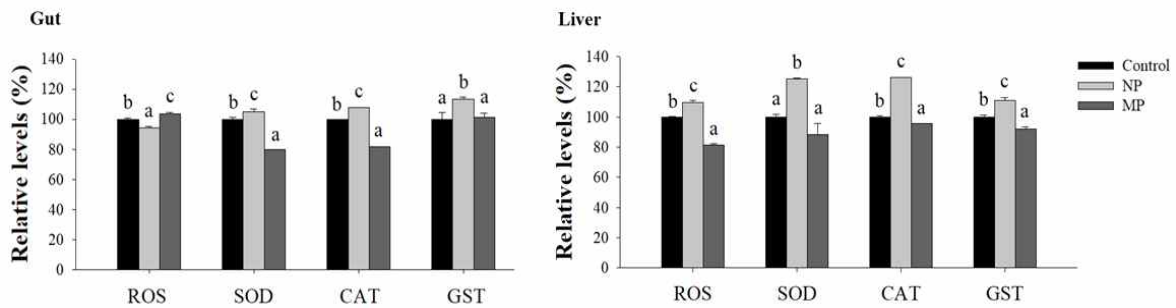


그림 9. 산화적 스트레스 관련 지표 및 효소 활성

■ 산화적 스트레스 관련 조직형태학적 분석 수행

- 산화적 스트레스에 의해 유도되는 자기사멸세포를 탐지함

-TUNNEL assay를 활용하여 조직형태학적 형광염색을 통해 실험을 수행한 결과, 0.05 um사이즈인 미세플라스틱에서 확인한 자기사멸과정이 유도된 것을 확인하였음 (그림 10)

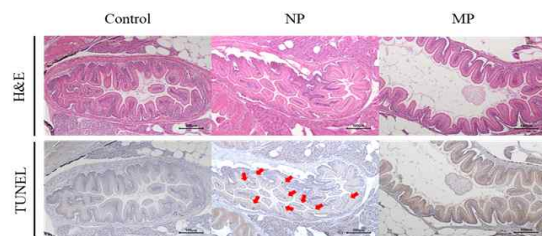


그림 10. 장내 불균형 지표

[3차년도]

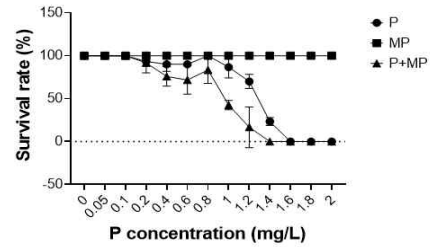
■ 유기오염원 및 흡착미세플라스틱 흡착률 및 노출 영향 평가수행

- 유기오염원인 페난트렌과 흡착미세플라스틱의 노출영향을 확인하기 위해 24시간동안 45µm 사이즈 플라스틱에 페난트렌 흡착을 진행하였으며 55%의 흡착율을 확인하였음

▶ 본 연구결과는 플라스틱과 유기오염원의 강한 흡착율을 보고한 다른 선행연구와 일치함 유기오염원과의 흡착률을 보여주는 이전 선행연구와 일치함 (Wang et al., 2019)

- 총 6개의 군으로 선정하여 실험을 진행하였으며 군은 다음과 같음: 대조군, 단일 노출군 3군 (P: 페난트렌 처리군, ML: 0.45µm 저농도 처리군 [2.5 µg/l], MH: 0.45µm 고농도 처리군 [2.5 mg/l])와 흡착 노출군 2군 (PML: 페난트렌흡착 저농도 플라스틱, PMH: 페난트렌흡착 고농도 플라스틱)

A) 24 h exposure



B) 48 h exposure

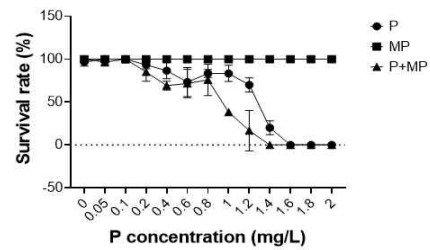


그림 11. 생존율 곡선

-성장지표인 몸의 길이와 무게를 측정한 결과 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 24시간과 48시간의 급성독성을 수행한 결과 단독 처리군에 비해 흡착플라스틱처리군에서 낮은 생존율이 확인됨 (그림 11)

▶ 이는 흡착 처리 시 각각의 단독 처리 군에 비해 독성이 증가한다는 것을 의미하며 동반 독성이 유발되는 것을 시사하는 결과임

■ 유기오염원의 대사산물 분석 및 관련 미생물 규명

- LC-MS/MS를 통해 대사산물 분석을 수행하였으며, 노출군간 상관관계 분석 결과 모든 노출군은 독립적으로 분포하며 특히 페난트렌이 포함된 처리군과 그 외의 군과의 차이를 확립함 (그림 12)

-대조군과 비교 결과, 플라스틱 단독 처리군들은 큰 변화를 보이지 않은 반면 페난트렌 처리군에서는 다양한 대사물의 증감이 확인됨. 페난트렌 단독처리군은 784개의 대사물이 증가하였고, 1,282개의 대사물이 감소하였음. 또한 흡착노출군에서는 862개의 대사물의 증가와 1261개의 대사물의 감소가 PML군에서 확인되었으며, 746개의 대사물의 증가 및 1365개의 대사물의 감소가 확인됨

▶ 이는 페난트렌이 플라스틱에 비해 대사체의 영향을 많이 주는 것으로 해석되며 흡착처리 시 더 많은 대사산물을 변화시키는 것을 시사함

- 마이크로바이옴 분석을 통해 관련 미생물 분석 결과, 대사체와 유사하게 플라스틱 처리군에 비해 페난트렌 처리군들에서 유의한 증감 변화가 확인됨(그림 13)

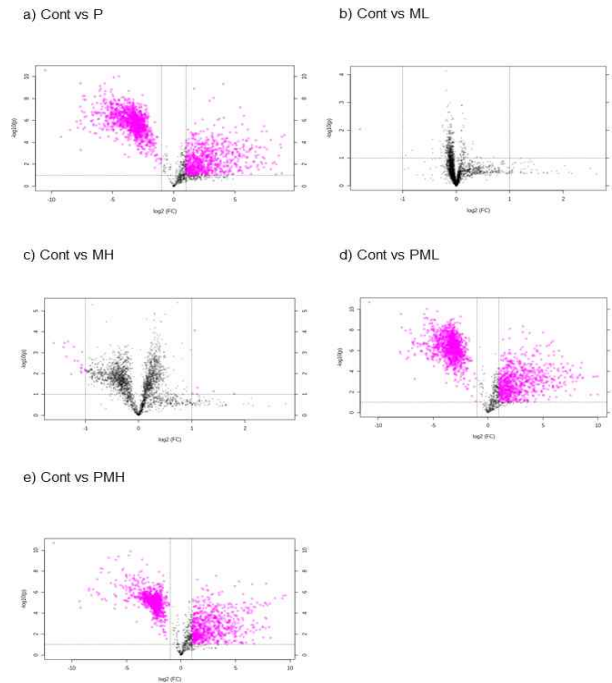


그림 12. 대사체 volcano plot

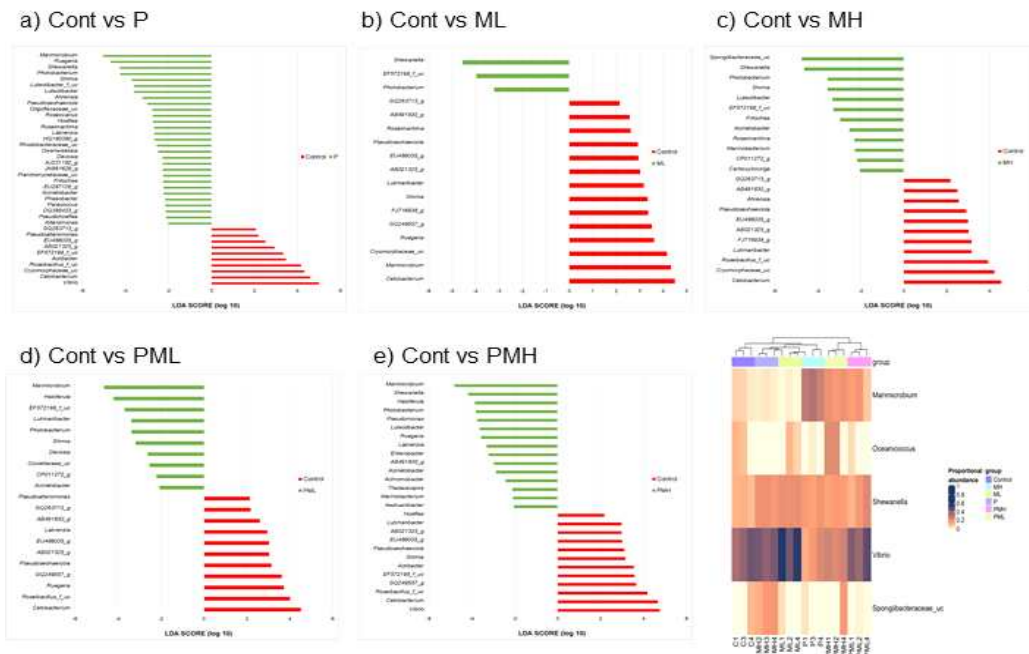


그림 13. 장내미생물 군집 변화 분석

-플라스틱처리시, spongiibacteraceae_uc, Fritschea, Acientobacter, Marinobacterium, CP011272_g, Caboxylicivirga의 미생물이 대조군에 대비 증가하였음

-흡착플라스틱군에서는 플라스틱의 농도에 따라서 페난트렌에 따른 미생물 영향에 다른 영향을 미친다는 것을 확인하였는데, 저농도의 경우 Shewanella 미생물의 억제 및 4종의 새로운 미생물의 증감을 유도함

-고농도의 경우, 페난트렌과 동반 처리시 단독처리시 증가하였던 Shimia 미생물이 감소하는 것을 확인하였으며, 새로운 7개 미생물에 대한 증가를 확인함

■ 흡착미세플라스틱 노출에 따른 장내불균형에 대한 분자신호전달 기작 구축

-장내미생물분석을 통한 결과를 바탕으로 메타지놈을 추론하여 신호전달 기작을 예측함 (표 1)

-PICRUSt 분석법 사용 시 총 20개의 pathway의 유의미한변화를 확인하였으며, MinPath 분석시 14개의 유의미한 변화를 확인함

▶ 두 분석법에 대한 결과가 상이하기에 추후 대사체와의 비교 결과를 통한 분자신호전달 기작 연구가 필요함

표 1. 장내 미생물 군집 변화에 따른 신호전달 기전

PICRUSt		MinPath	
Pathway	Definition	Pathway	Definition
ko01110	Biosynthesis of secondary metabolites	ko00650	Butanoate metabolism
ko01120	Microbial metabolism in diverse environments	ko00983	Drug metabolism - other enzymes
ko01130	Biosynthesis of antibiotics	ko04214	Apoptosis - fly
ko02020	Two-component system	ko00770	Pantothenate and CoA biosynthesis
ko01200	Carbon metabolism	ko00270	Cysteine and methionine metabolism
ko02010	ABC transporters	ko02060	Phosphotransferase system (PTS)
ko01230	Biosynthesis of amino acids	ko01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids
ko05111	Biofilm formation - Vibrio cholerae	ko02025	Biofilm formation - Pseudomonas aeruginosa
ko00230	Purine metabolism	ko00540	Lipopolysaccharide biosynthesis
ko01212	Fatty acid metabolism	ko03030	DNA replication
ko02024	Quorum sensing	ko04723	Retrograde endocannabinoid signaling
ko02040	Flagellar assembly	ko00471	D-Glutamine and D-glutamate metabolism
ko02030	Bacterial chemotaxis	ko00290	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
ko00640	Propanoate metabolism	ko00140	Steroid hormone biosynthesis
ko00240	Pyrimidine metabolism		
ko00620	Pyruvate metabolism		
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism		
ko02026	Biofilm formation - Escherichia coli		
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism		
ko00071	Fatty acid degradation		

■ 조직형태학적 분석

-1차년도와 같은 방식으로 조직학적 분석을 위해 H&E염색과 alcian blue(AB)-PAS 염색을 시행한 결과 장내 손상정도의 유의미한 변화를 찾을 수 없었음 (그림 14)

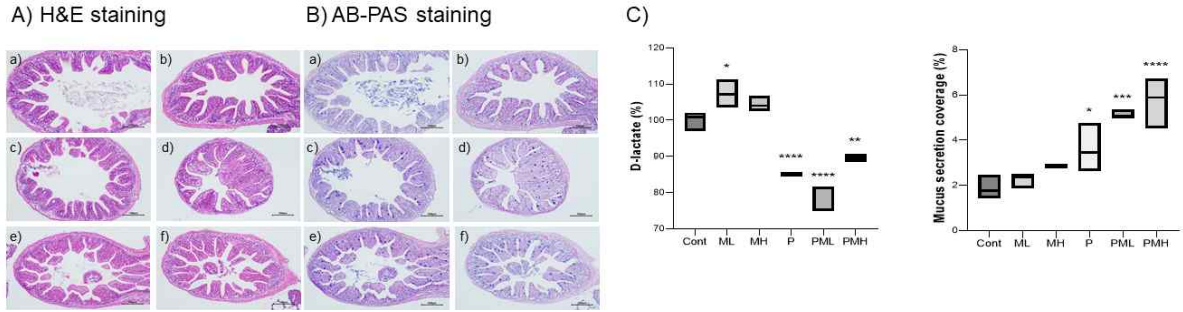


그림 14. 조직학적 분석 및 장내 미생물 변화 지표

-반면에 면역이상에 대한 유의미한 결과를 확인하였는데, D-lactate 지표의 경우 페난트렌 처리군 모두에서 감소되는 현상이 발견되었으며, mucus secretion coverage의 경우 페난트렌 처리군 모두에서 대조군과 플라스틱 단독처리군에 비해 유의하게 증가함

2) 세부 정량적 연구개발성과: [붙임1] 참조

3) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도 (%)
1차년도: 유기오염물질의 미세플라스틱 흡착 재현 및 독성평가	-흡착 규명하기 위한 사이즈 선정과 사이즈별 섭취 확인 - 미세플라스틱 노출 영향평가 - 조직학적 분석을 통한 비교 독성평가 -마이크로바이옴 예비실험을 통한 조건 확립(추가로 분석함)	100
2차년도: 바다송사리 장내의 미생물 조성 변화 분석 기법 구축	-16s rRNA sequencing 을 통한 phylum level 에서의 바다송사리 장내 미생물 변화 측정 -산화적 스트레스 및 장내 불균형 관련 생화학 분석(추가로 분석함) -산화적 스트레스 관련 조직형태학적 분석(추가로 분석함)	100
3차년도: 마이크로바이옴 분석을 바탕으로 흡착미세플라스틱의 분자 반응 기작 연구	-유기오염원 및 흡착미세플라스틱 흡착율 및 노출 영향평가 수행(추가로 분석함) -유기오염원의 대사산물 분석 및 관련 미생물 규명 -흡착미세플라스틱노출에 따른 장내불균형에 대한 분자신호전달 기작 구축 -조직형태학적 분석(추가로 분석함)	100

4. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도(연구개발결과의 중요성)

1) 미세플라스틱 독성평가의 선구적 역할 수행

- 본 연구 결과는 유기오염원과 미세플라스틱 각각의 독성 메커니즘을 규명하고 유기오염원 흡착 플라스틱의 변화된 메커니즘을 제시해줌으로 동반 독성 메커니즘에 대한 이해를 도와 줄 수 있음
- 현재까지 미세플라스틱과 유기오염원의 동반독성에 대한 메커니즘은 크게 저감효과와 상승 효과로 상반된 결과들로 제시되고 있음 (Xia et al., 2020). 저감효과의 경우 플라스틱이 바이오캡슐 역할을 수행하며 보다 빠르게 체내 밖으로 배출시켜주는 역할을 할 것이라 보고되었으며 상승효과의 경우 플라스틱에 농축된 유기오염원이 고농도로 체내에 침투하여 더 큰 독성을 유발할 것이라는 보고됨
- 연구를 시작하였던 연도인 2019년도에는 미세플라스틱의 위해성 평가 및 메커니즘 분석은 수많은 연구를 통해 규명되었지만, 미세플라스틱과 장내 마이크로바이옴과의 상관관계는 미세플라스틱의 주된 농축기관이 장임에도 불구하고 연구가 미비한 상황이었기에 본 관련 분야에서 선구적 지위를 차지할 수 있었음
- 현재는 연구 분야의 중요성과 장내마이크로바이옴과 미세플라스틱간의 상관관계 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이에 따라 본 연구 논문의 경우 2021년도에 출판되었음에도 불구하고 23번 인용(web of science 기준)되었기에 본 분야에서의 참고문헌으로써 활용도가 높을 것으로 기대됨

2) 해양어류에 장내 미생물 데이터 베이스 구축 및 미생물의 새로운 기능 도출

- 기존 모델생물종인 zebrafish 및 일부 담수 어류 한정적으로 구축된 어류 미생물 데이터베이스를 기반으로 해양어류의 데이터베이스를 구축함으로써, 담수 어종에서만 진행되었던 마이크로바이옴의 영역을 해양으로 넓히고 보다 다방면의 분석이 가능해질 것으로 예상되어짐
- 추가적으로 해양어류의 미생물 데이터 베이스 제공과 함께 플라스틱 관련 미생물 도출을 통해 플라스틱 분해 미생물 연구에 활용할 수 있는 데이터를 제공함

3) 독성평가로써의 새로운 지표 제시

- 일반적으로 물고기의 in vivo 독성을 확인하기 위해서는 높은 농도의 독성물질 처리가 요구되어지나, 마이크로바이옴의 변화를 endpoint로 설정하여 실험을 진행 시, 실제 환경농도에 기반하여 연구를 진행 할 수 있을 것으로 예상됨
- 인비보 독성이 나타나지 않은 환경오염원의 위해성 평가를 위한 새로운 기법으로 마이크로바이옴의 활용 가능성이 높음

- 최근 독성평가기법인 AOP pathway에서 cellular level에서의 연구에 새로운 방향을 제시 할 수 있음

5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

1) 후생유전학 측면에서의 활용

- 마이크로바이옴의 변화는 생식력 및 생식활동 능력에도 영향을 준다고 보고 되었으며, 후생유전학 측면에서 다음세대로의 영향에 관한 새로운 관점이 추구 연구 분야로 대두되고 있기에, 후생 유전학 측면에서의 활용도 가능함.

2) 숙주-미생물 상관관계 규명 연구 활용

- 해양생물 장내 미생물 기능 규명 연구에 활용이 가능하며 이를 통해 장내미생물 변화에 의해 초래되는 다양한 질병 치료에 활용 잠재력을 높일 수 있으며 임상 적용을 위한 기초 자료로 활용될 수 있음. 또한 있는 마이크로바이옴 공학을 해양생물에 접목시켜 연구를 수행함으로써 양식산업에 기여할 수 있다고 예상함

3) 멀티오믹스 활용

- 장내 미생물 군집 변화와 대사체의 상관관계 분석 자료를 제공함으로써 멀티 오믹스 측면의 활용이 가능하며, 장 마이크로바이옴 뿐 아니라 피부, 폐, 구강 등 신체 다른 마이크로바이옴에 대한 확장 연구가 가능함

6. 참고문헌

- Wang, J., Liu, X., Liu, G., Zhang, Z., Wu, H., Cui, B., et al. (2019). Size Effect of Polystyrene Microplastics on Sorption of Phenanthrene and Nitrobenzene. *Ecotoxicology Environ. Saf.* 173, 331-338
- Su, Y., Qi, H., Gao, M., Li, J., Cai, M., Zhu, X., et al. (2022). Combined Effects of Microplastics and Benzo [a] pyrene on the Marine Diatom *Chaetoceros muelleri*. *Front. Mar. Sci.*, 2136.
- Kang, H. M., Byeon, E., Jeong, H., Kim, M. S., Chen, Q., et al. (2021). Different effects of nano- and microplastics on oxidative status and gut microbiota in the marine medaka *Oryzias melastigma*. *J. Hazard. Mater.*, 405, 124207.

[붙임1] 세부 정량적 연구개발성과

사업명	(유형1-1)중견연구	연구책임자	강혜민	주관기관	한국해양과학기술원
과제번호	2019R1A2C1007963	과제명	유기오염물질 흡착 미세플라스틱 섭취와 바다송사리 장내 마이크로바이옴의 상관관계 및 분자적 기작 규명		

※산학강좌,기술이전 및 기술평가는 현재 입력 받지 않는 항목입니다.

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)													
전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)							
학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
0	0	0	0	0	0	0	0

국제협력(단위 :명,건)					
과학자교류		국제협력기반			학술회의개최
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	학술회의개최(국내,국제 통합)
0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)							
기술확산			연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)				
기술실시계약(기술이전 등)	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료	기타목적활용	기술마케팅
0	0	0	0	0	0	0	0

기타 성과(단위 : 건)					
언론보도 성과	생명자원/신품종/화합물	원자력연구개발사업실적(원자력연구개발사업에한함)			
		기술보고서	설계문서	장비구축 및 개발	분석방법개발
0	0	0	0	0	0

[붙임2-1] <연구책임자(해당 시 참여연구자(공동) 포함) 대표적 연구실적>

○ 논문 및 특허 실적(최대 5개 작성)

번호	구분 (논문/특허)	논문명/특허명	소속기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	논문게재일 /특허등록일	특기사항 (I.F. 등)
1	논문	Different effects of nano- and microplastics on oxidative status and gut microbiota in the marine medaka <i>Oryzias melastigma</i>	한국해양과학기술원	제1저자	JOURNA OF HAZARDO US MATERIAL S	2021.03	IF 10.588 Environm ental sciences 분야 상위 5% 이내 저널
2	논문	Interspecific biotransformation and detoxification of arsenic compounds in marine rotifer and copepod	성균관대학교	교신	JOURNA OF HAZARDO US MATERIAL S	2020.06	IF 10.588 Environm ental sciences 분야 상위 5% 이내 저널
3	논문	Generation of albino via SLC45a2 gene targeting by CRISPR/Cas9 in the marine medaka <i>Oryzias melastigma</i>	성균관대학교	제1저자	Marine pollution bulletin	2020.05	Marine & Fresh water Biology 분야 상위 3% 이내

○ 기타 실적(논문 및 특허 외 기타 실적 입력)

22년 3월 현대해양에 ‘플라스틱의 유용성과 위험성’ 주제로 기고

[붙임2-2] 주관연구책임자(해당 시 참여연구자(공동) 포함) 대표적 논문·특허실적 요약문>

연구실적 유형		논문(√) 특허()		
연구책임자/참여연구자(공동) 구분 및 성명		연구책임자(강혜민)		
논문/특허명		Different effects of nano-and microplastics on oxidative status and gut microbiota in the marine medaka <i>Oryzias melastigma</i>		
논문실적정보 <input type="checkbox"/>	게재지(저널명)	JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS		
	SCI 등재 여부	등재	Impact Factor 및 인용횟수(SCI)	10.588 (23회)
	SCOPUS 등재 여부	미등재	인용횟수(SCOPUS)	
	ISSN	0304-3894	게재년월	202103
	역할(제1, 교신, 참여)	제1	참여자수	6명
특허실적정보 <input type="checkbox"/>	구분		등록(출원) 국가	
	등록(출원) 번호		등록(출원)일	
	등록(출원)자 성명		발명자 성명	
요 약 문				
<p>Plastic is regarded as a major environmental concern. In particular, nanoplastics and microplastics (NMPs) are attracting global attention due to their potential impact on aquatic organisms. Here, we examined the effects of NMPs (50 nm polystyrene microbead nanoplastics [NPs] and 45 μm microplastics [MPs]) on oxidative status and gut microbiota in the marine medaka <i>Oryzias melastigma</i>. The NP-exposed group exhibited stronger oxidative stress with higher activation levels of antioxidants compared to the MP-exposed group. However, the MP-exposed group demonstrated induction of intestinal damage (e.g., increased mucus ratio) with further alterations of gut microbiota, compared to the NP-exposed group. In particular, MPs caused more significant alterations of microbiota composition at both phylum and genus levels. Thus, in this study we show distinct toxicity pathways of NPs and MPs, an oxidative stress-mediated pathway (e.g., antioxidants) induced by NP exposure and dysbiosis of gut microbiota in association with immune dysfunction induced by MP exposure. Our results are helpful for expanding our knowledge about the impacts of NMPs as potentially harmful substances in the aquatic environment.</p>				
연구 목표 및 연구내용과의 연관성		기대성과 및 파급 효과		
미세플라스틱을 처리하여 바다송사리내에서 발생하는 미생물군집 변화와 생리학적 영향을 확인한 논문으로 바다송사리 내 미생물 군집을 파악하고자 하는 연구목표와 연관성이 높음		미세플라스틱에 따른 바다송사리 내 미생물 군집 영향을 파악하며 바다송사리 미생물 라이브러리를 구축함		

연구실적 유형		논문(√) 특허()		
연구책임자/참여연구자(공동) 구분 및 성명		연구책임자(강혜민)		
논문/특허명		Interspecific biotransformation and detoxification of arsenic compounds in marine rotifer and copepod		
논문실적정보 <input type="checkbox"/>	게재지(저널명)	JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS		
	SCI 등재 여부	등재	Impact Factor 및 인용횟수(SCI)	10.588 (10회)
	SCOPUS 등재 여부	미등재	인용횟수(SCOPUS)	
	ISSN	0304-3894	게재년월	202006
	역할(제1, 교신, 참여)	교신	참여자수	7명
특허실적정보 <input type="checkbox"/>	구분		등록(출원) 국가	
	등록(출원) 번호		등록(출원)일	
	등록(출원)자 성명		발명자 성명	
요 약 문				
<p>The toxicity of arsenic (As) has been reported to be different depending on their chemical forms. However, its toxicity mechanisms largely remain unknown. In this study, to investigate toxicity mechanism of As in marine zooplanktons, namely, the rotifer <i>Brachionus plicatilis</i> and the copepod <i>Paracyclopsina nana</i>, metabolites of As were analyzed by using a high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry with in vivo toxicity and antioxidant responses in response to inorganic As, including arsenate (AsV) and arsenite (AsIII). While AsIII was more toxic than AsV in both organisms, the rotifer <i>B. plicatilis</i> exhibited stronger tolerance, compared to the copepod <i>P. nana</i>. The As speciation analysis revealed differences in biotransformation processes in two species with <i>B. plicatilis</i> having a more simplified process than <i>P. nana</i>, contributing to a better tolerance against As in the rotifer <i>B. plicatilis</i> compared to <i>P. nana</i>. Moreover, the levels of GSH content and the regulation of omega class glutathione S-transferases were different in response to oxidative stress between <i>B. plicatilis</i> and <i>P. nana</i>. These results suggest that the rotifer <i>B. plicatilis</i> has a unique survival strategy with more efficient biotransformation and antioxidant responses, compared to <i>P. nana</i>, conferring higher tolerance to As.</p>				
연구 목표 및 연구내용과의 연관성		기대성과 및 파급 효과		
해양생물에서의 대사체 분석을 위해 활용되는 LC/MS 전처리 조건 확립과 연관성이 있음		작은 해양 생물 내에서의 LC/MS 분석방법과 결과 해석 능력을 확보하여 바다송사리 뿐 아니라 해양생물에서 생리활성 연구 분야 활용이 가능함		

연구실적 유형		논문(√) 특허()		
연구책임자/참여연구자(공동) 구분 및 성명		연구책임자(강혜민)		
논문/특허명		Generation of albino via SLC45a2 gene targeting by CRISPR/Cas9 in the marine medaka <i>Oryzias melastigma</i>		
논문실적정보 <input type="checkbox"/>	게재지(저널명)	Marine pollution bulletin		
	SCI 등재 여부	등재	Impact Factor 및 인용횟수(SCI)	5.553 (3회)
	SCOPUS 등재 여부	미등재	인용횟수(SCOPUS)	
	ISSN	0025-326X	게재년월	202005
	역할(제1, 교신, 참여)	제1	참여자수	9명
특허실적정보 <input type="checkbox"/>	구분		등록(출원) 국가	
	등록(출원) 번호		등록(출원)일	
	등록(출원)자 성명		발명자 성명	
요 약 문				
<p>To produce albinism in the marine medaka <i>Oryzias melastigma</i>, we disrupted the solute carrier family 45 (SLC45a2) gene by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 with a single guide RNA (sgRNA). Selected sgRNAs were able to target a SLC45a2 gene as confirmed by genotyping and heteroduplex mobility assay (HMA). Of the survived embryos after injection, 54.2% and 60.0% embryos exhibited albinism phenotype by sgRNA1 and sgRNA2, respectively. Deep sequencing at the on-target sites showed different insertion and deletion (indel) mutation profiles near the DNA cleavage sites, indicating high efficacy of producing SLC45a2 knock-out mutants by this method. Moreover, HMA at the potential off-target sites revealed that off-target activity would be induced at a low rate, or not induced at all. This albino marine medaka will be a good model for marine molecular ecotoxicology in establishment of diverse in vivo endpoints, and the application of this efficient gene targeting method in the marine medaka would be useful tool for mechanistic approaches.</p>				
연구 목표 및 연구내용과의 연관성		기대성과 및 파급 효과		
바다송사리의 유전자 조작 기술 확보를 연구 목표로 한 논문으로 본 연구에서 유의미하게 관찰한 미생물 메커니즘 연구와 관련이 있음		유기오염원과 플라스틱 노출 시 유의하게 변화하는 미생물을 대상으로 미생물과 호스트의 상관관계 규명을 위해 활용이 가능함		



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat



Research Paper

Different effects of nano- and microplastics on oxidative status and gut microbiota in the marine medaka *Oryzias melastigma*

Hye-Min Kang^{a,1}, Eunjin Byeon^{b,1}, Haksoo Jeong^b, Min-Sub Kim^b, Qiqing Chen^c,
Jae-Seong Lee^{b,*}

^a Marine Biotechnology Research Center, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Busan 49111, South Korea

^b Department of Biological Sciences, College of Science, Sungkyunkwan University, Suwon 16419, South Korea

^c State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University, Shanghai 200062, China



ARTICLE INFO

Keywords:

Gut microbiota
Microbiome analysis
Microplastics
Marine Medaka

ABSTRACT

Plastic is regarded as a major environmental concern. In particular, nanoplastics and microplastics (NMPs) are attracting global attention due to their potential impact on aquatic organisms. Here, we examined the effects of NMPs (50 nm polystyrene microbead nanoplastics (NPs) and 45 μm microplastics (MPs)) on oxidative status and gut microbiota in the marine medaka *Oryzias melastigma*. The NP-exposed group exhibited stronger oxidative stress with higher activation levels of antioxidants compared to the MP-exposed group. However, the MP-exposed group demonstrated induction of intestinal damage (e.g., increased mucus ratio) with further alterations of gut microbiota, compared to the NP-exposed group. In particular, MPs caused more significant alterations of microbiota composition at both phylum and genus levels. Thus, in this study we show distinct toxicity pathways of NPs and MPs, an oxidative stress-mediated pathway (e.g., antioxidants) induced by NP exposure and dysbiosis of gut microbiota in association with immune dysfunction induced by MP exposure. Our results are helpful for expanding our knowledge about the impacts of NMPs as potentially harmful substances in the aquatic environment.

1. Introduction

Plastics are dominant materials for the manufacture of daily necessities and widely used due to their desirable properties (e.g., high durability) (Andrady and Neal, 2009; Sudhakar et al., 2008). Since the first production of plastic in 1907, plastic production has increased approximately 200-fold from 1950 to 2015 (Geyer et al., 2017). Due to such exponential increases of plastic production, microplastics (MPs) have been detected in the ocean all around the globe, including South Korea (1.12–4.74 particles/ m^3) (Kwon et al., 2020), the surface layer of North Atlantic Gyre (1.69 particles/ m^3) (Reisser et al., 2016), and Arctic Ocean (up to 234 particles/ m^3) (Obbard et al., 2014), becoming one of the gravest of modern environmental problems (Yarsley and Couzens, 1945; Ritchie and Roser, 2020). It is of particular concern that the numbers of plastic particles in the marine environment are expected to increase, as plastics are non-degradable but typically split into smaller particles (Yamada-Onodera et al., 2001) from nano- to micro-sized by undergoing photo-degradation and weathering processes in the ocean,

leading to long-lasting deleterious effects upon the aquatic environment (Laist, 1997; Ryan et al., 2009). Of the diverse sizes of plastics, nanoplastics (NPs) and MPs (herein referred as NMPs), which are defined as plastic particles less than 1 μm and 5 mm in size, respectively, are the most concerning.

The major route of NMPs uptake in aquatic organisms is ingestion (Roch et al., 2020). When ingested NMPs reach the gut, they seem to be able to translocate to other tissues more readily as particle diameter becomes smaller, causing tissue damage and inhibition of biological functions (Browne et al., 2008; Jeong et al., 2018). For example, in the marine rotifer *Brachionus koreanus*, NMPs induced size-dependent negative effects and NP was shown to induce cellular membrane damage by inducing oxidative stress, resulting in altered membrane permeability (Jeong et al., 2016, 2018). In this aspect, considering that the gut would be a first line of organ facing NMPs ingestion, it is likely a primary organ to be affected by NMPs. The gut contains a diverse and vast microbial community, the gut microbiome, which plays an important role in maintaining biological homeostasis of the host (El Aidy et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: jslee2@skku.edu (J.-S. Lee).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124207>

Received 6 August 2020; Received in revised form 11 September 2020; Accepted 5 October 2020

Available online 15 October 2020

0304-3894/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

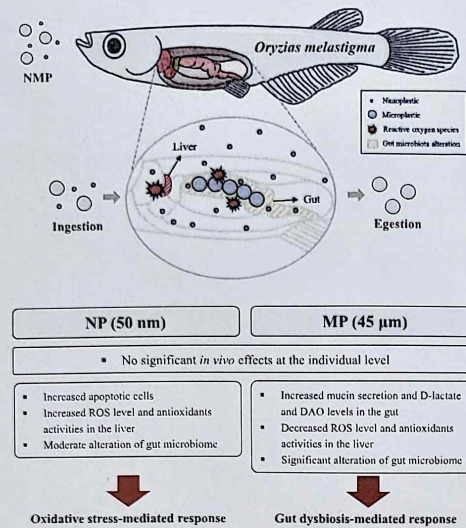


Fig. 6. Schematic summary of this study.

significant effects shown by MPs upon the gut microbiota, whereas NPs induced stronger oxidative stress. Thus, we suggest that NMPs exposure induces adverse effects by two different mechanisms in marine medaka, which are associated with gut dysbiosis and oxidative stress related to MP and NP exposure, respectively.

CRedit authorship contribution statement

Jae-Seong Lee and Hye-Min Kang designed and supervised the project. Eunjin Byeon, Haksoo Jeong, Min-Sub Kim, and Qiqing Chen collected and generated the data. Jae-Seong Lee and Hye-Min Kang wrote the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the National Research Foundation of Korea (2019R1A2C1007963) funded to Hye-Min Kang.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124207.

References

- Ahrendt, C., Perez-Venegas, D.J., Urbina, M., Gonzalez, C., Echeveste, P., Aldana, M., Pulgar, J., Galbán-Malagón, C., 2020. Microplastic ingestion cause intestinal lesions in the intertidal fish *Girella laevis*. *Mar. Pollut. Bull.* 151, 110795. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110795>.
- El Aidy, S., Hovioeld, G., Tremaroli, V., Bäckhed, F., Kleerebezem, M., 2013. The gut microbiota and mucosal homeostasis: colonized at birth or at adulthood, does it matter? *Gut Microb.* 4, 118–124. <https://doi.org/10.4161/gmic.23362>.

- Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 1977–1984. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ. Sci. Technol.* 42, 5026–5031. <https://doi.org/10.1021/es800249a>.
- Chen, J.C., Chen, M.Y., Fang, C., Zheng, R.H., Jiang, Y.L., Zhang, Y.S., Wang, K.J., Bailey, C., Segner, H., Bo, J., 2020. Microplastics negatively impact embryogenesis and modulate the immune response of the marine medaka *Oryzias melastigma*. *Mar. Pollut. Bull.* 158, 111349. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111349>.
- Cornick, S., Tawiah, A., Chadee, K., 2015. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers* 3, e982426. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.982426>.
- David, R., 2010. Symbiosis: A helping hand from *Bacteroides fragilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 534. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2413>.
- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., Ren, H., 2017. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci. Rep.* 7, 46687. <https://doi.org/10.1038/srep46687>.
- Ding, J., Zhang, S., Razaanajato, R.M., Zou, H., Zhu, W., 2018. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Pollut.* 238, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.001>.
- Dong, S., Kang, M., Wu, X., Ye, T., 2014. Development of a promising fish model (*Oryzias melastigma*) for assessing multiple responses to stresses in the marine environment. *Biomed. Res. Int.* 2014, 563131. <https://doi.org/10.1155/2014/563131>.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., Ross, R.P., 2018. The gut microbiota of marine fish. *Front. Microbiol.* 9, 873. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>.
- Espinosa, C., Esteban, M.A., Cuesta, A., 2019. Dietary administration of PVC and PE microplastics produces histological damage, oxidative stress and immunoregulation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 95, 574–583. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.072>.
- Fjellheim, A.J., Klinkenberg, G., Skjermo, J., Aasen, I.M., Vadstein, O., 2010. Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Vet. Microbiol.* 144, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.032>.
- Fukudome, I., Kobayashi, M., Dabanaka, K., Maeda, H., Okamoto, K., Okabayashi, T., Baba, R., Kumagai, N., Oba, K., Fujita, M., Hanazaki, K., 2014. Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats. *Med. Mol. Morphol.* 47, 100–107. <https://doi.org/10.1007/s00795-013-0055-7>.
- Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3, e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., Patterson, P.H., Mazmanian, S.K., 2013. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155, 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>.
- Huang, J.N., Wen, B., Zhu, J.G., Zhang, Y.S., Gao, J.Z., Chen, Z.Z., 2020. Exposure to microplastics impairs digestive performance, stimulates immune response and induces microbiota dysbiosis in the gut of juvenile guppy (*Poecilia reticulata*). *Sci. Total Environ.* 733, 138929.
- Jeffery, I.B., O'Toole, P.W., Öhman, L., Claesson, M.J., Deane, J., Quigley, E.M., Simrén, M., 2012. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 61, 997–1006. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301501>.
- Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Kim, D.-H., Han, J., Hwang, D.-S., Souissi, S., Lee, S.-J., Shin, K.-H., Park, H.G., Lee, J.-S., 2017. Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Sci. Rep.* 7, 41323. <https://doi.org/10.1038/srep41323>.
- Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, Y.H., Kim, M.-S., Lee, J.-S., Seo, J.S., Wang, M., Lee, J.-S., 2018. Nanoplastic ingestion enhances toxicity of persistent organic pollutants (POPs) in the monogonont rotifer *Brachionus koreanus* via multixenobiotic resistance (MXR) disruption. *Environ. Sci. Technol.* 52, 11411–11418. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03211>.
- Jeong, C.-B., Won, E.-J., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Hwang, D.-S., Hwang, U.-K., Zhou, B., Souissi, S., Lee, S.-J., Lee, J.-S., 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>.
- Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., Fu, Z., 2018. Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environ. Pollut.* 235, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.088>.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 252–310.
- Kim, B.-M., Kim, J., Choi, I.-Y., Raisuddin, S., Au, D.W.T., Leung, K.M.Y., Wu, R.S.S., Rhee, J.-S., Lee, J.-S., 2016. Omics of the marine medaka (*Oryzias melastigma*) and its relevance to marine environmental research. *Mar. Environ. Res.* 113, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.12.004>.
- Kim, H.-S., Lee, B.-Y., Han, J., Jeong, C.-B., Hwang, D.-S., Lee, M.-C., Kang, H.-M., Kim, D.-H., Lee, D., Kim, J., Choi, I.-Y., Lee, J.-S., 2018. The genome of the marine medaka *Oryzias melastigma*. *Mol. Ecol. Resour.* 18, 656–665.



Interspecific biotransformation and detoxification of arsenic compounds in marine rotifer and copepod

Eunjin Byeon^{a,1}, Cheolho Yoon^{b,1}, Jin-Sol Lee^a, Young Hwan Lee^a, Chang-Bum Jeong^{a,c},
Jae-Seong Lee^{a,*}, Hye-Min Kang^{a,*}

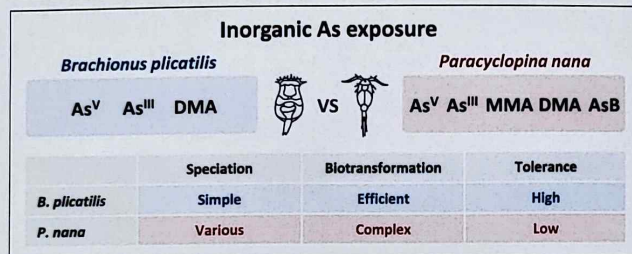
^a Department of Biological Science, College of Science, Sungkyunkwan University, Suwon 16419, South Korea

^b Korea Basic Science Institute, Seoul Center, Seoul 02841, South Korea

^c Department of Marine Science, College of Nature Science, Incheon National University, Incheon 22012, South Korea



GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Editor: R. Debra

Keywords:

Arsenic speciation
Arsenic bioconcentration
Arsenate
Arsenite
Marine invertebrates

ABSTRACT

The toxicity of arsenic (As) has been reported to be different depending on their chemical forms. However, its toxicity mechanisms largely remain unknown. In this study, to investigate toxicity mechanism of As in marine zooplanktons, namely, the rotifer *Brachionus plicatilis* and the copepod *Paracyclopsina nana*, metabolites of As were analyzed by using a high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry with *in vivo* toxicity and antioxidant responses in response to inorganic As, including arsenate (As^V) and arsenite (As^{III}). While As^{III} was more toxic than As^V in both organisms, the rotifer *B. plicatilis* exhibited stronger tolerance, compared to the copepod *P. nana*. The As speciation analysis revealed differences in biotransformation processes in two species with *B. plicatilis* having a more simplified process than *P. nana*, contributing to a better tolerance against As in the rotifer *B. plicatilis* compared to *P. nana*. Moreover, the levels of GSH content and the regulation of omega class glutathione S-transferases were different in response to oxidative stress between *B. plicatilis* and *P. nana*. These results suggest that the rotifer *B. plicatilis* has a unique survival strategy with more efficient biotransformation and antioxidant responses, compared to *P. nana*, conferring higher tolerance to As.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: jslee2@skku.edu (J.-S. Lee), hmkang@skku.edu (H.-M. Kang).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122196>

Received 19 December 2019; Received in revised form 23 January 2020; Accepted 26 January 2020

Available online 30 January 2020

0304-3894/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

with ROS depletion with the increased activity of antioxidant enzymes in response to multi-walled carbon nanotube (Kim et al., 2016). On the other hand, the increased of ROS levels and antioxidant enzyme activity without *in vivo* effects was shown in *B. plicatilis* (Poljsak et al., 2013); the increased level of ROS is responsible for not only the generation of cellular damage but also often responsible for the beneficial effects by maintaining a balance between oxidative stress and antioxidant mechanisms, as a result of hormesis. In addition, this difference in the oxidative response would be a result of lineage-specific kinetics of oxidative processes as suggested by Jeong et al. (2019) that rotifer may have shorter oxidative cycles, compared to copepod. Taken together, the optimal balance between oxidative stress and antioxidant systems is necessary to prevent oxidative damage and it could explain our results for the marine rotifer *B. plicatilis*. In addition, under stressful conditions, more energy is required for the cost of homeostasis, DNA repair, and defense. Thus, utilization of limited energy budget is critical to an organism for survival. In this regard, more activated antioxidant mechanisms of *B. plicatilis* are possibly associated with reallocation of energy budget from more efficient As biotransformation process, compared to *P. nana*.

In conclusion, considering the diverse evolutionary mode of marine invertebrates, understanding the evolutionarily lineage-specific molecular responses in response to toxicants is critical studying in ecotoxicology. In this aspect, our results clearly show the different As toxicity and biotransformation mechanism in two marine invertebrates, *B. plicatilis* and *P. nana*. This study is helpful for a better understanding of As toxicity and also provide a better insight into interspecific-detoxification in marine invertebrates.

Credit author statement

J.-S.L. and H.-M. K. designed and supervised the project. E.B., J.-S.L. and Y.H.L. collected and generated the data, and C.Y. performed the analytical analyses. J.-S.L., C.-B.J., and H.-M. K. wrote the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments

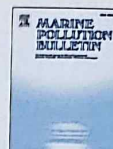
This work was supported by a grant from the Development of Techniques for Assessment and Management of Hazardous Chemicals in the Marine Environment program of the Korean Ministry of Oceans and Fisheries to Jae-Seong Lee and was also supported by a grant from the National Research Foundation (2019R1A2C1007963) to Hye-Min Kang.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122196>.

References

- Allen, T., Rana, S.V.S., 2003. Oxidative stress by inorganic arsenic: modulation by thyroid hormones in rat. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 135 (2), 157–162. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00086-3).
- Bagnyukova, T.V., Luzhna, L.I., Pogribny, I.P., Lushchak, V.I., 2007. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environ. Mol. Mutagen.* 48 (8), 658–665. <https://doi.org/10.1002/em.20328>.
- Caumette, G., Koch, I., Estrada, E., Reimer, K.J., 2011. Arsenic speciation in plankton organisms from contaminated lakes: transformations at the base of the freshwater food chain. *Environ. Sci. Technol.* 45 (23), 9917–9923. <https://doi.org/10.1021/es2025992>.
- Clowes, L.A., Francesconi, K.A., 2004. Uptake and elimination of arsenobetaine by the mussel *Mytilus edulis* is related to salinity. *Comp. Biochem. Physiol. C* 137 (1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.11.003>.
- Dahms, H.U., Hagiwara, A., Lee, J.-S., 2011. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquat. Toxicol.* 101 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.006>.
- Datta, S., Ghosh, D., Saha, D.R., Bhattacharaya, S., Mazumder, S., 2009. Chronic exposure to low concentration of arsenic is immunotoxic to fish: role of head kidney macrophages as biomarkers of arsenic toxicity to *Clarias batrachus*. *Aquat. Toxicol.* 92 (2), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.01.002>.
- Davey, J.C., Nomikos, A.P., Wungliranirun, M., Sherman, J.R., Ingram, L., Batki, C., Lariviere, J.P., Hamilton, J.W., 2008. Arsenic as an endocrine disruptor: arsenic disrupts retinoic acid receptor- and thyroid hormone receptor-mediated gene regulation and thyroid hormone-mediated amphibian tail metamorphosis. *Environ. Health Perspect.* 116, 165–172. <https://doi.org/10.1289/ehp.10131>.
- Domracheva, I., Kanepe-Lapsa, I., Jackevica, L., Vasiljeva, J., Arsenyan, P., 2017. Selenopheno quinolones and coumarins promote cancer cell apoptosis by ROS depletion and caspase-7 activation. *Life Sci.* 186, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.011>.
- Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Arsenic speciation in tissues of the Mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (8), 1881–1887. <https://doi.org/10.1897/03-562>.
- Garbinski, L.D., Rosen, B.P., Chen, J., 2019. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environ. Int.* 126, 585–597. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4>.
- Gebel, T.W., 2002. Arsenic methylation is a process of detoxification through accelerated excretion. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205 (6), 505–508. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00177>.
- Hallauer, J., Geng, X., Yang, H.-C., Shen, J., Tsai, K.-J., Liu, Z., 2016. The effect of chronic arsenic exposure in zebrafish. *Zebrafish* 13 (5), 405–412. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1252>.
- Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133 (1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00084-X).
- Jankong, P., Chalhoub, C., Kienzl, N., Goessler, W., Francesconi, K.A., Visoottiviseh, P., 2007. Arsenic accumulation and speciation in freshwater fish living in arsenic-contaminated waters. *Environ. Chem.* 4 (1), 11–17. <https://doi.org/10.1071/EN06084>.
- Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Kim, D.-H., Han, J., Hwang, D.-S., Souissi, S., Lee, S.-J., Shin, K.-H., Park, H.G., Lee, J.-S., 2017. Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclopsina nana*. *Sci. Rep.* 7, 41323. <https://doi.org/10.1038/srep41323>.
- Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Byeon, E., Park, H.G., Lee, J.-S., 2019. Effects of polluted seawater on oxidative stress, mortality, and reproductive parameters in the marine rotifer *Brachionus koreanus* and the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat. Toxicol.* 208, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.019>.
- Jiang, Y., He, T., Chen, Y., Ruan, Y., Zhou, Y., Tang, B.Z., Qin, J., Tang, Y., 2017. Quantitative evaluation and *in vivo* visualization of mercury ion bioaccumulation in rotifers by novel aggregation-induced emission fluorogen nanoparticles. *Environ. Sci. Nano* 4, 2186–2192. <https://doi.org/10.1039/c7en00599g>.
- Kang, H.-M., Lee, J.-S., Lee, Y.H., Kim, M.-S., Park, H.G., Jeong, C.-B., Lee, J.-S., 2019. Body size-dependent interspecific tolerance to cadmium and their molecular responses in the marine rotifer *Brachionus* spp. *Aquat. Toxicol.* 206, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.10.020>.
- Ki, J.-S., Park, H.G., Lee, J.-S., 2009. The complete mitochondrial genome of the cyclopoid copepod *Paracyclopsina nana*: a highly divergent genome with novel gene order and atypical gene numbers. *Gene* 435, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.01.005>.
- Kim, J.-H., Kang, J.-C., 2015. The arsenic accumulation and its effect on oxidative stress responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to waterborne arsenic (As^{3+}). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39 (2), 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.01.012>.
- Kim, D.-H., Puthumana, J., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Jeong, C.-B., Han, J., Hwang, D.-S., Kim, I.-C., Lee, J.-W., Lee, J.-S., 2016. Adverse effects of MWCNTs on life parameters, antioxidant systems, and activation of MAPK signaling pathways in the copepod *Paracyclopsina nana*. *Aquat. Toxicol.* 179, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.016>.
- Kucuksözgin, F., Gönül, L.T., Tasel, D., 2014. Total and inorganic arsenic levels in some marine organisms from Izmir Bay (Eastern Aegean Sea): a risk assessment. *Chemosphere* 112, 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.071>.
- Kumari, B., Kumar, V., Sinha, A.K., Ahsan, J., Ghosh, A.K., Wang, H., DeBock, G., 2017. Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. *Environ. Chem. Lett.* 15 (1), 43–64. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0588-9>.
- Larsen, E.H., Francesconi, K.A., 2003. Arsenic concentrations correlate with salinity for fish taken from the North Sea and Baltic waters. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 83 (2), 283–284. <https://doi.org/10.1017/S0025315403007082>.
- Lee, B., Lee, D.G., 2018. Depletion of reactive oxygen species induced by chlorogenic acid triggers apoptosis-like death in *Escherichia coli*. *Free Radic. Res.* 52 (5), 605–615. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1456658>.
- Liao, V.H.C., Yu, C.W., 2005. *Caenorhabditis elegans* *gcs-1* confers resistance to arsenic-induced oxidative stress. *Biomaterials* 18 (5), 519–528. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-2996-3>.
- Maher, W., Waring, J., Krikowa, F., Duncan, E., Foster, S., 2018. Ecological factors affecting the accumulation and speciation of arsenic in twelve Australian coastal bivalve molluscs. *Environ. Chem.* 15 (2), 46–57. <https://doi.org/10.1071/EN17106>.
- Meharg, A.A., Shore, R.F., Broadgate, K., 1998. Edaphic factors affecting the toxicity and accumulation of arsenate in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (6), 1124–1131. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170620>.
- Mills, S., Alcantara-Rodríguez, J.A., Ciro-Pérez, J., Gómez, A., Hagiwara, A., Hinson Galindo, K., Jersabek, C.D., Malekzadeh-Vilayeh, R., Leasi, F., Lee, J.-S., Mark Welch, D.B., Papakostas, S., Riss, S., Segers, H., Serra, M., Shiel, R., Smolak, R., Snell, T.W., Stelzer, C.-P., Tang, C.Q., Wallace, R.L., Fontaneto, D., Walsh, E.J., 2017. Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera,



Generation of albino via *SLC45a2* gene targeting by CRISPR/Cas9 in the marine medaka *Oryzias melastigma*

Chang-Bum Jeong^{a,b,1}, Hye-Min Kang^{a,1}, Sung-Ah Hong^c, Eunjin Byeon^a, Jin-Sol Lee^a, Young Hwan Lee^a, Ik-Young Choi^d, Sangsu Bae^c, Jae-Seong Lee^{a,*}

^a Department of Biological Science, College of Science, Sungkyunkwan University, Suwon 16419, South Korea

^b Department of Marine Science, College of Nature Science, Incheon National University, Incheon 22012, South Korea

^c Department of Chemistry, College of Nature Sciences, Hanyang University, Seoul 04763, South Korea

^d Department of Agriculture and Life Industry, Kangwon National University, Chuncheon 24341, South Korea



ARTICLE INFO

Keywords:
CRISPR/Cas9
Marine medaka
Albinism
SLC45a2

ABSTRACT

To produce albinism in the marine medaka *Oryzias melastigma*, we disrupted the solute carrier family 45 (*SLC45a2*) gene by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 with a single guide RNA (sgRNA). Selected sgRNAs were able to target a *SLC45a2* gene as confirmed by genotyping and heteroduplex mobility assay (HMA). Of the survived embryos after injection, 54.2% and 60.0% embryos exhibited albinism phenotype by sgRNA1 and sgRNA2, respectively. Deep sequencing at the on-target sites showed different insertion and deletion (indel) mutation profiles near the DNA cleavage sites, indicating high efficacy of producing *SLC45a2* knock-out mutants by this method. Moreover, HMA at the potential off-target sites revealed that off-target activity would be induced at a low rate, or not induced at all. This albino marine medaka will be a good model for marine molecular ecotoxicology in establishment of diverse *in vivo* endpoints, and the application of this efficient gene targeting method in the marine medaka would be useful tool for mechanistic approaches.

The genome editing is one of the fascinating tools to examine the function of gene of interest in the genome. Of those tools, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 is the most powerful tool. In fish, gene knockout (KO) and knock-in (KI) systems by CRISPR/Cas9 have widely been used to examine the functional role of genes of interest. To date, small fish such as Japanese medaka and zebrafish have been widely used to target the genes to study in disease model (Lin et al., 2016; Witten et al., 2017; Takeuchi et al., 2017; Naert and Vleminckx, 2018) and functional genomics (Fang et al., 2018; Watakabe et al., 2018), but they are mostly freshwater species, which cannot be used for marine molecular ecotoxicological studies. Therefore, further study on small marine fish species using CRISPR/Cas9 system is required to clarify functional roles of genes of interest in marine fish, particularly in marine environmental issues such as hypoxia, emerging pollutants, ocean acidification, and other various stressors.

The marine medaka *Oryzias melastigma* possesses unique features as a marine ecotoxicological model species: a sequenced genome (~780 Mb) and JBrowse (<http://rotifer.skku.edu:8080/Om2>), small

size (~4 cm), short reproduction period (~3 months), and ease to maintain in the laboratory condition (Kim et al., 2015; Kim et al., 2016; Kim et al., 2018; Lee et al., 2019). To date, many studies have demonstrated evaluations on the effects of environmental stressors including hypoxia (Lai et al., 2016; Wang et al., 2016; Lai et al., 2018; Lai et al., 2019), emerging pollutants (Kim et al., 2014a; Kim et al., 2014b; Wang and Wang, 2014; Chen et al., 2015; Chen et al., 2016; Chen et al., 2017; Cong et al., 2017; Yi and Leung, 2017; Chen et al., 2018; Liu et al., 2018), ocean acidification (Wang et al., 2017; Lee et al., 2018), and water-accommodated fractions of crude oil (Kim et al., 2013; Rhee et al., 2013) with immune response (Bo et al., 2012; Dong et al., 2017; Ye et al., 2018; Zhang et al., 2018; Cui et al., 2019), using this model species. Thus, applications of CRISPR/Cas9 system are timely to comprehensively examine the role of genes of the defense-related pathways in response to hypoxia, emerging pollutants, ocean acidification, and others.

Solute carrier family 45 (*SLC45a2*) gene encodes a transporter mediating melanin synthesis-related protein. Previously, antigen in human melanoma (*AIM1*), a former name of *SLC45a2*, has been shown

* Corresponding author.

E-mail address: jslee2@skku.edu (J.-S. Lee).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111038>

Received 4 September 2019; Received in revised form 28 February 2020; Accepted 1 March 2020

Available online 12 March 2020

0025-326X/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 4
Mutagenesis induced by *SLC45a2* gene targeting.

		Total	Insertions	Deletions	Indel frequency
sgRNA1	WT	60,952	28	80	108 (0.2%)
	1	65,648	36	47,258	47,294 (72.0%)
	2	60,109	0	57,838	57,838 (96.2%)
	3	59,609	30,170	29,127	59,297 (99.5%)
	4	59,924	334	59,477	59,811 (99.8%)
	5	60,915	40	60,035	60,075 (98.6%)
sgRNA2	WT	63,702	4	63,602	63,606 (99.8%)
	1	65,039	4	19	23 (0.0%)
	2	62,195	20,463	38,713	59,176 (95.1%)
	3	59,769	9495	46,437	55,932 (93.6%)
	4	58,761	86	58,283	58,369 (99.3%)
	5	64,177	5298	58,811	64,109 (99.9%)
	6	65,575	88	65,360	65,448 (99.8%)
	6	63,477	15	63,387	63,402 (99.9%)

fertilization (hpf) (Iwamatsu, 2004) compared to the mouse embryo which occurs at 24 hpf (Kaufman, 1992). Likely, mosaicism can be more easily induced in fish due to their faster embryonic development as the genome editing, occurring after the first cell division or after the DNA replication in the cell, would lead to mosaic mutation. Thus, to overcome this problem, F1 progeny should be generated from founders having germline mutation.

To verify mutation at two target sites in *SLC45a2* gene, HMA was conducted (Fig. 2A) with further sequence validation via targeted deep sequencing near the DNA cleavage site (Fig. 2B and Table 4). Deep sequencing would be one of the most valid method to assess mutations in target sites, however, it would not be suitable for routine work as it is not relatively cost-effective in an ordinary laboratory, compared to PCR-based methods. Among those PCR-based methods, HMA has been proposed as one of the most effective methods to detect sequence alterations induced by targeted mutagenesis (Ansai et al., 2014; Ota et al., 2013). Thus, in the present study, HMA was conducted to screen mutations in the injected embryos in addition to the sequence analysis for representative embryos. As a result, multiple heteroduplex bands were observed by HMA from embryos injected with Cas9/sgRNA1 or Cas9/sgRNA2 RNP complex while a single band was shown in wild type embryos. Consistently, we found altered sequences with different types of mutations by sgRNA1 and sgRNA2. Accumulation of indel patterns with sgRNA1 and sgRNA2 was shown near three bases upstream of protospacer-adjacent motif (PAM) sequences (5'-NGG-3' for Cas9), suggesting that DNA cleavage was occurred at this site by Cas9 activity, and subsequently repaired via error prone DNA repair mechanisms (e.g., non-homologous end joining, microhomology-mediated end joining). These results clearly validate the induction of highly efficient Cas9 RNP-mediated gene editing in the marine medaka.

One of the concerning problem of CRISPR-mediated gene editing is off-target activity which induces mutations at non-targeted gene sequences having one or more base pair mismatches (Lin et al., 2014). Although we have taken care of this matter in designing of sgRNAs by using Cas-designer and Cas-OFFinder to reduce off-target mutations (Bae et al., 2014a, 2014b), we further conducted HMA at the potential off-target sites for each of sgRNAs that contain mismatches in their sequences (Fig. 2C), following the criteria described by Ansai and Kinoshita (2014). We found that the HMA exhibited only a single intact band with an expected amplicon size near the potential off-target site in the genome of *O. melastigma*. Previously, it has been reported that HMA is highly sensitive to detect 0.5% somatic mutation in the mouse and human cell lines (Zhu et al., 2014). Also in the frog *Xenopus tropicalis*, the detection limit of HMA was below 2.5% (Shigeta et al., 2016). Thus, our results indicate that off-target mutations were not induced by sgRNA1 or sgRNA2. Although off-target mutation was induced, their efficiency would be below 2.5% as mentioned in Shigeta et al. (2016). Taken together, our results clearly show that CRISPR-mediated genome

editing can be used as an efficient gene targeting technology with a low off-targeting activity in the marine medaka. Also, these albino mutants can be useful to examine internal organs as one of *in vivo* endpoints in marine molecular ecotoxicology and will improve the knowledge of playing the role of interested genes in marine medaka.

Albino medaka mutants generated in the present study have clearly shown the successful implantation of CRISPR/Cas9 technology and also can be a useful biological resource. Albino mutants are a useful model for understanding pigment cell biology, as genes involved in melanin synthesis in fish are highly conserved with mammals (reviewed by Cal et al., 2017). Also, taking advantages of transparency of albino mutants, more in-depth molecular approaches can be allowed to detect Cas9-mediated mutation spectra of targeted nucleotide sequences within a limited narrow window in developing embryonic stages due to the increasing pigmentation in late developmental stages. Furthermore, genetic modification incorporating the green fluorescent protein gene is also likely applicable for *in vivo* imaging experiment that uncovers the eye development. From this point on, although the marine medaka has been widely used as a model experimental species particularly in the field of marine environmental science to understand toxicity and defense mechanisms in marine organisms in response to environmental stressors (Kim et al., 2016), there has been limitation due to difficulties in mechanistic approaches. Thus, the application of CRISPR-mediated gene targeting technology in the marine medaka would allow to deeply investigate mechanistic aspects of marine environmental science.

CRedit authorship contribution statement

Chang-Bum Jeong: Investigation, Data curation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Hye-Min Kang**: Investigation, Data curation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Sung-Ah Hong**: Investigation, Data curation. **Eunjin Byeon**: Investigation, Data curation. **Jin-Sol Lee**: Investigation, Data curation. **Young Hwan Lee**: Investigation, Data curation. **Ik-Young Choi**: Writing - original draft, Writing - review & editing. **Sangsu Bae**: Writing - original draft, Writing - review & editing. **Jae-Seong Lee**: Conceptualization, Supervision, Investigation, Data curation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the Collaborative Genome Program of the Korea Institute of Marine Science and Technology Promotion (KIMST) funded by the Ministry of Oceans and Fisheries (MOF) [No. 20180430] and also supported by a grant of the National Research Foundation of Korea (NRF-2019R1A2C1007963) funded to Hye-Min Kang.

References

- Ansai, S., Kinoshita, M., 2014. Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. *Biol. Open* 3, 362–371.
- Ansai, S., Inohaya, K., Yoshitani, Y., Schartl, M., Uemura, N., Takahashi, R., Kinoshita, M., 2014. Design, evaluation, and screening methods for efficient targeted mutagenesis with transcription activator-like effector nucleases in medaka. *Develop. Growth Differ.* 56, 98–107.
- Bae, S., Kweon, J., Kim, H.S., Kim, J.-S., 2014a. Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nat. Methods* 11, 705–706.
- Bae, S., Park, J., Kim, J.-S., 2014b. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30, 1473–1475.

[붙임3] 연구개발성과 활용계획서

연구개발성과 활용계획서

1. 연구성과 및 활용 현황

※ 연구성과는 최종보고서 작성 시 각 전문기관 연구관리시스템(ex. 한국연구재단 **연구사업통합 지원시스템**, <http://ernd.nrf.re.kr>)에 입력했던 내용 중에서 해당 항목을 내려 받아 그대로 붙이거나 글자 크기 등을 편집하여 첨부함
 ※ accepted/in press인 논문은 필요하다고 판단되면 추가로 작성가능

가. 과학기술/학술적 연구성과

(단위: 건)

전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
							출원		등록			저역서	보고서
국내논문		국외논문			국내	국제	국내	국외	국내	국외			
SCI	비SCI	SCI	비SCI										
		3											

나. 전문학술지 논문게재 성과 정보

과제 번호	게재연월	논문제목	총저자명	출 처	학술지명	권(호)	학술지 구분	SCI 여부	IF	국제공동연구 논문여부	기여도
2019R1 A2C100 7963	202103	Different effects of nano-and microplastics on oxidative status and gut microbiota in the marine medaka <i>Oryzias melastigma</i>	Hye-Min Kang, Eunjin Byeon, Haksoo Jeong, Min-Sub Kim, Qiqing Chen, Jae-Seong Lee	SCI	JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS	405	국외	SCI등재	10.588	아니오	50
2019R1 A2C100 7963	202006	Interspecific biotransformation and detoxification of arsenic compounds in marine rotifer and copepod	Eunjin Byeon, Cheolho Yoon, Jin-Sol Lee, Young Hwan Lee, Chang-Bum Jeong, Jae-Seong Lee, Hye-Min Kang	SCI	JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS	391	국외	SCI등재	10.588	아니오	50
2019R1 A2C100 7963	202005	Generation of albino via SLC45a2 gene targeting by CRISPR/Cas9 in the marine medaka <i>Oryzias melastigma</i>	Chang-Bum Jeong, Hye-Min Kang, Sung-Ah Hong, Eunjin Byeon, Jin-Sol Lee, Young Hwan Lee, Ik-Young Choi, Sangsu Bae, Jae-Seong Lee	SCI	Marine pollution bulletin	154	국외	SCI등재	5.553	아니오	50

다. 지식재산권 성과 정보

과제 번호	출원등록 연월	재산권 구분	출원등록 구분	발명제목	출원 등록인	출원 등록국	발명자명	출원등록번호	활용형태	기여도

라. 산업지원 및 연구성과 활용

(단위: 건)

기술확산			연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)		
기술실시계약체결	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료

마. 국내외 기술료 징수 현황 (기업화 완료 또는 기술실시계약 체결 시 기재)

징 수 조 건	
징 수 현 황	백만 원(전년도말 현재)

바. 기업화 성과 (기업화 완료 또는 추진 중인 경우 반드시 기재)

업 체 명		기업화 완료[] 기업화 예정[]	년 월 일
제 품 명		제 품 용 도	
기업화이용유형 중 택일	신제품개발[], 기존제품 개선[], 신공정개발[], 기존공정개선[], 기타[]		

사. 경제적 파급 효과 (지난 1년간 실적)

수입대체 효과 (백만 원/년)	수출증대 효과 (백만 원/년)	매출증대 효과 (백만 원/년)	생산성향상 효과 (백만 원/년)	고용창출 효과 (인력양성 인원수)	그 밖의 효과

아. 향후 경제적 기대 효과

수입대체 효과 (백만 원/년)	수출증대 효과 (백만 원/년)	매출증대 효과 (백만 원/년)	생산성향상 효과 (백만 원/년)	고용창출 효과 (인력양성 인원수)	그 밖의 효과

2. 연구개발성과 활용 계획 (해당항목에 “○” 표시)

기술이전	기업화	후속연구 추진	타 사업 활용	그 밖의 목적 활용	연구결과 활용중단
		○	○		

가. 당해연도 활용계획 (6하 원칙에 따라 구체적으로 작성)

본 연구를 통해 확보한 연구기술을 다른 과제 연구 (“해양생물 마이크로바이옴 분석과 적용 연구를 통한 마린바이오텍스 개발”, “대사체 분석기법 활용 해양무척추생물 유용 대사물질 탐색을 위한 기초연구”) 참여 연구원으로서 연구를 수행하며 해양생물의 마이크로바이옴연구와 대사체 연구를 수행할 계획임

나. 활용방법

본 연구에서 바다송사리를 대상으로 구축한 마이크로바이옴과 대사체 전처리 조건과 분석 방법을 활용하여 다른 해양생물에 적용하여 수행하여 해양생물 마이크로바이옴과 대사체 데이터베이스 구축과 독성연구에서의 지표로서 활용하고자 함

다. 차년도 이후 활용계획 (6하 원칙에 따라 구체적으로 작성)

장내 마이크로바이옴의 중요성에도 불구하고 미생물의 기능, 상호작용관계, 메커니즘에 대한 이해는 아직도 많은 연구가 진행되어야 하는 실정임. 그러므로 본 연구를 활용하여 해양어류 장내 미생물 재구성을 위한 유전자 재조합 기초 시스템을 확립하고 이를 통해 미생물 기능, 숙주-미생물 상관관계 및 메커니즘을 규명하는 연구 과제를 수주할 계획임

3. 기대효과

- 해양생물의 마이크로바이옴 연구와 대사체 연구를 통해 해양생물에서의 오믹스 기술을 향상시킬 수 있으며, 상용화 가능한 유용물질 발굴에 용이 할 것으로 사료됨
- 해양생물의 특이성을 고려하여 해양생물을 활용한 마이크로바이옴 인력 양성과 고용분야가 창출될 것으로 기대함
- 사람의 건강과 농업 생산성 향상을 위해 연구되고 있는 마이크로바이옴 공학을 해양생물에 접목시켜 연구를 수행함으로써 양식산업에 기여할 수 있다고 예상함

4. 문제점 및 건의사항